

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

**HUMAN PAPILLOMAVİRUS (HPV) POZİTİF  
BİREYLERDE DNA ONARIM KAPASİTESİNİN VE  
GENOTOKSİK ETKİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ  
**EREN (CİVELEK) ÖZÇAĞLI**

TEZ DANIŞMANI  
PROF.DR.SEMRA ŞARDAŞ

ANKARA-2007

*SEVGİLİ BABAM'A,*

## TEŐEKKÜR

Birlikte çalıŐmaktan mutluluk duyduğum, sevgisi ve desteğini her zaman hissettiğim, yetiŐmemi sağlayan sevgili hocam Prof.Dr.Semra Şardaş'a,

ÇalıŐmamın her aşamasında değerli bilgileri ve yardımları için Prof.Dr.Ali Esat Karakaya ve Doç.Dr.Aydan Biri'ye,

İlgi ve destekleri için Prof.Dr.Sema Burgaz, Prof.Dr.İsmet ok, Prof.Dr.Bensu Karahalil ve Doç.Dr.Neslihan Aygün KocabaŐ'a,

Dostlukları ve yardımlarıyla yanımda olduklarını her zaman hissettiğim bÖlüm arkadaşlarım Dr.Ecz.Gonca akmak Demircigil, Uzm.Ecz.Ela Kadioğlu, Uzm.Ecz.AyŐe BaŐak Engin, Uzm.Ecz.Emre Durmaz, Uzm.Ecz.Erdem CoŐkun, Uzm.Ecz.Onur Kenan UlutaŐ, Ecz.Esra EmerceTufan'a,

HPV tiplmelerinin yapıldığı Gazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na, konu ile ilgili değerli bilgileri ve yardımları için Yrd.Doç.Dr.Gölendam Bozdayı ve Uzm.Dr.Bedia Din'e,

Teknik destekleri için Gazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı alıŐanlarına,

Bana her konuda destek olup güven veren sevgili aileme ve eŐime,

*TEŐEKKÜR EDERİM.*

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA
I.GİRİŞ VE AMAÇ	1
II.GENEL BİLGİLER	5
II.1. Human Papillomavirus ve viral karsinogenezis	5
II.1.1. Human Papillomavirus tarihçesi	5
II.1.2. Human Papillomavirus sınıflandırması	7
II.1.3. HPV'nin Toplumda görülme sıklığı	12
II.1.4. Virüsün yapısı	14
II.2. HPV Enfeksiyonu	20
II.2.1. HPV Replikasyonu ve entegrasyon	23
II.2.2. Patogenez	26
II.2.3. HPV Onkoproteinleri ve onkogenezis	27
II.3. Viral karsinogenezis ve Genotoksisite	32
II.3.1. HPV ve Genotoksisite ilişkisi	35
II.4. Serviks kanseri	40
II.4.1. Serviks kanserinin gelişimi	40
II.4.2. Servikal kanser sıklığı	42
II.4.3. Servikal kanserde rol alan risk faktörleri	43
II.4.4. Serviks kanserinde bireysel duyarlılığın önemi	52
II.4.5. Aşı Çalışmaları	55
II.4.6. Servikal izleme programları ve tarama yöntemleri	58
II.4.6.1. Sitolojik tanı yöntemleri	59
II.4.6.2. HPV Tiplerinin tespiti için kullanılan yöntemler	60

II.5. Genotoksisite testlerinin moleküler epidemiyoloji çalışmalarındaki yeri	65
II.5.1. Kromozomal aberasyon yöntemi	66
II.5.2. Comet Yöntemi	68
II.5.3. Challenge Yöntemi	69
III. GEREÇ ve YÖNTEM	72
III.1. Çalışma ve Kontrol Grubunun Seçilmesi	72
III.2. Biyolojik Materyallerin Toplanması	75
III.3. HPV tipleme	77
III.3.1. Yöntemde Kullanılan Aletler	77
III.3.2. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler	78
III.3.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	79
III.3.4. Yöntemin Uygulanışı	80
III.4. Kromozomal Aberasyon Yöntemi	86
III.4.1. Yöntemde Kullanılan Aletler	86
III.4.2. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler	86
III.4.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	87
III.4.4. Yöntemin Uygulanışı	87
III.5. Comet Yöntemi	89
III.5.1. Yöntemde Kullanılan Aletler	89
III.5.2. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler	89
III.5.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	90
III.5.4. Periferik Kan Lenfositlerinde Comet Yöntemi	
Uygulanışı	91
III.5.5. Servikal Sürüntü Hücrelerinde Comet Yöntemi	
Uygulanışı	92

III.6. Challenge Tekniği	93
III.6.1. Test İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler	93
III.6.2. Test İçin Kullanılan Alet ve Malzemeler	93
III.6.3. Test İçin Kullanılan özeltiler	93
III.6.4. Tekniğin Uygulanışı	93
III.7. İstatistiksel Analiz	95
IV. BULGULAR	96
IV.1. Periferal Kan Lenfositlerinde Comet Yöntemi Sonuçları	97
IV.2. Servikal Sürüntü Hücrelerinde Comet Yöntemi Sonuçları	99
IV.3. Kromozomal Aberasyon Yöntemi Sonuçları	101
IV.4. Challenge Tekniği Sonuçları	103
V. TARTIŞMA VE SONUÇ	112
VI. ÖZET	121
VII. SUMMARY	123
VIII.KAYNAKLAR	125

<b>TABLolar</b>		<b>SAYFA</b>
<b>Tablo II.1</b>	HPV tiplerinin risk kategorilerine göre sınıflandırılması	10
<b>Tablo II.2</b>	HPV tipleri ve ilişkili olduğu hastalıklar	11
<b>Tablo II.3</b>	HPV erken ve geç genlerinin fonksiyonlar	19
<b>Tablo II.4</b>	Karsinojenik insan virüsleri	33
<b>Tablo II.5</b>	Servikal kanser ile ilişkili risk faktörleri	43
<b>Tablo II.14</b>	Profektik aşilar ve etkili oldukları HPV tipleri	55
<b>Tablo III.1</b>	Deney ve Kontrol Grubunu oluşturan bireylerin genel özellikleri	75
<b>Tablo III.2</b>	Toplanan biyolojik materyallerde uygulanan yöntemler	76
<b>Tablo IV.1</b>	Toplam HPV pozitif, HPV 16 (+) ve HPV 18 (+) bireylerin periferal kan lenfositlerinde comet tekniği ile elde edilen kuyruktaki %DNA değerleri (ortalama±standart sapma)	98
<b>Tablo IV.2</b>	Toplam HPV pozitif, HPV 16 (+) ve HPV 18 (+) bireylerin servikal sürüntü hücrelerinde comet tekniği ile elde edilen kuyruktaki %DNA değerleri (ortalama±standart sapma)	100
<b>Tablo IV.3</b>	Toplam HPV pozitif, HPV 16 (+) ve HPV 18 (+) bireylerin periferal kan lenfositlerinde kromozomal aberasyon tekniği ile elde edilen %kromozomal aberasyon/metafaz değerleri (ortalama±standart hata)	102
<b>Tablo IV.4</b>	Toplam HPV pozitif, HPV 16 (+) ve HPV 18 (+) bireylerin periferal kan lenfositlerinde comet tekniği ile kombine edilerek elde edilen %DNA onarım kapasitesi değerleri (ortalama±standart sapma)	104

<b>Tablo IV.5</b>	HPV 16 pozitif gruba ait bireysel özellikler ve genel bulgular	109
<b>Tablo IV.6</b>	HPV 18 pozitif gruba ait bireysel özellikler ve genel bulgular	110
<b>Tablo IV.7</b>	Kontrol grubuna ait bireysel özellikler ve genel bulgular	111



<b>ŞEKİLLER</b>		<b>SAYFA</b>
<b>Şekil II.1</b>	118 adet insan ve hayvan Papilloma virüslerinin yer aldığı filogenetik ağaç	8
<b>Şekil II.2</b>	Dünya genelinde Skuamöz hücre servikal karsinomaya sebep olan HPV tiplerinin görülme sıklığı	13
<b>Şekil II.3</b>	Üç boyutlu HPV Modeli	15
<b>Şekil II.4</b>	HPV 16'nın genomik haritası.	16
<b>Şekil II.5</b>	HPV enfeksiyonu	21
<b>Şekil II.6</b>	Onkogenik bir HPV ile enfeksiyon sonrası gelişen servikal farklılaşma	22
<b>Şekil II.7</b>	HPV'nin yaşam döngüsü	24
<b>Şekil II.8</b>	Çembersel HPV DNA organizasyonu ve konakçı hücre DNA'sına integrasyonu	25
<b>Şekil II.9</b>	DNA hasarı sonrasında P53 aktivasyonu	29
<b>Şekil II.10</b>	E6 ve E7 proteinlerinin tümör süpresör genleri ve hücre döngüsü ile etkileşimi	30
<b>Şekil II.11</b>	HPV enfeksiyonu sonucunda p53 inaktivasyonu	31
<b>Şekil II.12</b>	Viral etkene maruziyet sonrası malign farklılaşma.	34
<b>Şekil II.13</b>	Yaşa bağlı serviks kanseri gelişimi	46
<b>Şekil II.14</b>	Serviks kanseri gelişiminde duyarlılık faktörlerinin etkisi	53
<b>Şekil II.15</b>	Moleküler epidemiyolojinin kanser araştırmalarında sağladığı açılımlar	65

<b>Şekil III.1</b>	Real- Time PCR'da HPV tip 16 erime eğrisi.	84
<b>Şekil III.2</b>	Real Time PCR'da HPV 16 dışındaki tiplerin erime eğrisi	85
<b>Şekil III.3</b>	Challenge yönteminin uygulanışı ve %DNA onarım kapasitesi hesabı	94

## I. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde insanlarda gözlemlenen tüm kanserin yaklaşık %20'sinin viral kökenli olduğu bilinmektedir. Viral enfeksiyonlar kanser gelişiminde önlenabilir risk faktörlerinden birisi olarak gösterilmekte ve viral karsinogenezisin üzerinde önemle durulmaktadır<sup>1,2</sup>.

Human Papillomavirus (HPV) enfeksiyonu dünya genelinde en yaygın cinsel yolla bulaşan hastalıklardandır<sup>3</sup>. Tüm dünyada her yıl yaklaşık olarak 30 milyon yeni genital HPV enfeksiyonu tanısı konulmaktadır<sup>4</sup>.

Günümüzde 120'den fazla HPV tipi tanımlanmıştır<sup>5</sup>. Farklı HPV tipleri birçok patolojik durumdan sorumlu tutulmaktadır. Mukozal tip HPV'ler anogenital karsinoma sebep olabilecek intraepitel neoplazi ile ilişkili olup olmamasına göre düşük riskli, olası yüksek riskli ve yüksek riskli tipler olmak üzere üç alt grupta incelenir<sup>6,7</sup>. Tanımlanan HPV tiplerinden yaklaşık 40 tanesi genital bölge epitelini etkiler, bunların da yaklaşık yarısı yüksek riskli tipler olarak tanımlanır<sup>8</sup>.

Dünya genelinde servikal kanser kadınlarda meme kanserinden sonra hastalık ve ölüm sıklığı incelendiğinde en yaygın malignansidir ve yeni kanser vakalarının da yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır<sup>9,10</sup>. Bugün servikal kanser vakalarının %80-99'unda HPV DNA'sı tespit edilmektedir. Bu oranın yüksekliğinde yüksek riskli HPV tiplerinin büyük katkısı söz konusudur<sup>11</sup>.

HPV tipleri dünyanın değişik bölgelerinde farklı insidans gösterir. HPV 16 tüm dünya genelinde en yaygın yüksek riskli tip olmakla birlikte diğer tiplerin dağılımı ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. HPV 16'dan sonra en yaygın ikinci yüksek riskli HPV tipi HPV 18 olarak belirlenmiştir<sup>8,12</sup>. HPV 16 dünya genelinde servikal kanserlerin

yaklaşık %50'sinde tespit edilmişken, HPV 18 servikal kanserlerin yaklaşık %15'inde tespit edilmiştir<sup>8,13</sup>.

Yüksek riskli HPV tipleri ile indüklenen tümörlerin çoğunda E6 ve E7 viral proteinlerinin ekspresyonu dikkat çekmiştir. Bu durum E6 ve E7 viral proteinlerinin hücrel transformasyonla direkt ilişkili olduğunu göstermiştir<sup>6</sup>. HPV ile ilişkili karsinogenezis daha çok eksprese edilen E6 ve E7 onkoprotein ve iki tümör baskılayıcı gen olan p53 ve pRB üzerinde yoğunlaşmıştır. HPV E6 proteinleri p53, E7 proteinleri ise Rb tümör baskılayıcı yollarını hedefler<sup>14</sup>. Tümör baskılayıcı genlerindeki inaktivasyon DNA hasarının onarılamamasına ve apoptozisin inhibisyonuna neden olur. Böylelikle mutasyonlar birikir ve karsinojenik aktivasyon gerçekleşir<sup>13</sup>.

Yaşam tarzı ve çevresel kofaktörlerin yanı sıra bireyin genetik duyarlılığı servikal kanser gelişiminde son derece önemlidir. Servikal kanser öncül lezyonlarının bazı bireylerde kendi kendine iyileşmesi bazı bireylerde kanser gelişimine sebep olması immün mekanizmaların etkinliğinin yanı sıra genetik duyarlılığın da servikal kanserdeki önemini doğrulamaktadır. Yüksek riskli HPV tipleriyle enfeksiyon servikal intraepitel neoplaziler ve servikal kanser için en önemli risk faktörü olmasına rağmen, HPV ile enfekte olan kadınların çok az bir kısmı servikal kanser geliştirmektedir. Birçok çevresel kökenli hastalıkta olduğu gibi servikal kanser gelişiminde de genetik, yaşam tarzı ve maruziyet hikayesi önem taşımaktadır. Ancak günümüzde genetik ve kazanılmış duyarlılık faktörlerinin servikal kanser gelişimi üzerine etkisine dair yeterli kanıt yoktur<sup>15</sup>.

HPV ile indüklenen genomik instabilite, erken dönemde servikal intraepitel öncül lezyonlarda oluşur ve karsinojenik süreç ile artar. Genel olarak HPV'nin sebep olduğu kromozomal instabilite, sayısal ve yapısal kromozomal aberasyonları içerir<sup>16</sup>.

Servikal izleme programlarının düzenli olarak uygulandığı gelişmiş ülkelerde servikal kanser insidansı ve mortalitesi düşmüştür<sup>17</sup>. Yüksek riskli HPV tipleri ile servikal kanser arasındaki güçlü bağlantı serviks kanserinden korunma programlarında HPV testlerinin izleme amaçlı uygulanması gerekliliğini gündeme getirmiştir. Servikal izleme programlarında klasik sitolojik yöntemlerin yanı sıra HPV DNA'sının tespiti klinik açıdan oldukça önemlidir. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR), bu amaçla kullanılır ve yüksek analitik duyarlılığa sahiptir<sup>18</sup>.

Genotoksisite çalışmalarında periferel kan lenfositlerinin hedef dokulardaki biyolojik etkileri temsil ettiği düşünülmektedir. Kromozomal hasar mekanizmasının farklı dokularda benzer olduğu düşünülürse, lenfositlerdeki hasar seviyesi kansere yatkın dokularını yansıtır kanser riskini belirlemede kullanılabilir<sup>19-21</sup>. Bu yüzden periferel kan lenfositleri, hedef dokuyu da yansıtır şekilde DNA hasarlarının değerlendirilmesini ve genotoksik riskin belirlenmesini mümkün kılar<sup>21</sup>.

Çalışmamızın hedeflerini temel olarak şu şekilde toplamak mümkündür:

- Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile HPV 16 ve 18 genotiplenmesi yapılarak HPV ile enfekte bireylerin ve kontrol grubunu oluşturacak HPV negatif bireylerin belirlenmesi,
- Periferel kan lenfositlerinde Comet tekniği uygulanarak HPV pozitif bireylerde ve kontrol grubunda DNA hasarının belirlenmesi,
- Periferel kan lenfositlerinde kromozomal aberasyon tekniği uygulanarak HPV pozitif bireylerde ve kontrol grubunda kromozomal hasarın belirlenmesi,
- Servikal sürüntü hücrelerinde Comet tekniği uygulanarak HPV pozitif bireylerde ve kontrol grubunda hedef hücre grubundaki DNA hasarını belirlemek,
- Duyarlılığın biyogöstergesi olan Challenge tekniğini uygulayarak, HPV pozitif bireylerde ve kontrol grubunda bireysel DNA onarım kapasitelerini

belirleyerek HPV enfeksiyonun DNA onarım kapasiteleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi

- DNA onarım kapasitesi ile genotoksik etki arasındaki ilişkinin araştırılması ve HPV enfeksiyonuna bağlı gelişebilecek prekarsinojenik öncül lezyonların ile bu parametrelerle ilişkisinin araştırılmasıdır.

## **II.GENEL BİLGİLER**

### **II.1 Human Papillomavirus ve viral karsinojenezis**

#### **II.1.1 Human Papillomavirus tarihçesi**

Human Papillomavirus (HPV) enfeksiyonu alt genital sistemin en yaygın cinsel yolla bulaşan hastalıklarından biridir. Yaygın doğasına karşılık, virüsün popülasyonlardaki sıklığı, tarihçesi, bulaşıcılığı, enfeksiyona bağlı gelişen prekanseröz ve kanseröz lezyonlar gibi belli başlı olgular tam olarak anlaşılammıştır. Tarihsel olarak papillomavirusler omurgalılarla birlikte evrim geçirmiştir. Tüm omurgalılarda siğil oluşumu görülür ve kutanöz siğiller binlerce yıldır tanımlanmaktadır<sup>3</sup>.

Eski Yunan ve Roma'dan beri genital siğiller (accuminate) bilinmektedir ve "kondilom" terimi genital siğillerin "incir benzeri" oluşumunu tanımlamaktadır. Bu terim günümüzde hem sifilis (condyloma lata), hem de HPV ile ilişkili lezyonların tanımlanmasında da kullanılmaktadır. Eski Yunan ve Romalılar, erkek homoseksüellerdeki yüksek siğil prevalansını kaydetmiş ve bunu seksüel maruziyetle ilişkilendirmişlerdir. Sifiliz ile condyloma lata arasındaki ilişki 16.yüzyılda saptanmış ve 1800'lerin sonlarına kadar genital siğillerin sifiliz ya da gonore ile ilişkili olduğu sanılmıştır. 20.yüzyılın ilk yıllarında deri siğilleri ile genital siğillerin çok benzer oldukları saptanmış, genital siğillerin zührevi özellikleri sorgulanmaya başlanmıştır<sup>22</sup>.

20.yüzyılın başlarında Ciuffo, siğil dokusundan alınan ve hücre içermeyen ekstraktı kullanarak insandan insana aktarımı göstermiş ve insan siğillerinin viral etiolojisinden söz etmiştir. 1933 yılında ise Shope ilk defa papillomavirusü pamuk kuyruklu tavşanda tanımlamıştır. Sonraki çalışmalarında ise kömür katranını promoter olarak kullanmak suretiyle kanser başlangıcını ve gelişimini stimule etmiş ve DNA tumor

virüsünün onkojenik özelliğinin ilk örneğini ortaya koymuştur<sup>3</sup>. 1940'ların sonunda hapishane gönüllülerine genital siğil ekstratı enjekte edilmiş, ekstragenital enjeksiyon bölgelerinde bulaşıcılığı kanıtlar şekilde siğil oluşumu tespit edilmiştir. Viruslerin zührevi doğasını doğrulayan bir diğer olay da Kore savaşından dönen askerlerde penil siğiller oluştuğu gözlemlenmesi ve eşlerinde de bir süre sonra vulvar siğil görülmesi olmuştur<sup>22</sup>. Bütün bu veriler ışığında genital siğillerin enfeksiyöz bir etkenle oluşabileceği düşünülmüş ve bireyden bireye bulaşıcılığı araştırılmaya başlanmıştır.

1960'lı yılların sonunda genital siğillerde viral partiküller elektron mikroskopu ile tespit edilmiş ve bu partiküllerin deri siğillerininkine büyük benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Böylece HPV'nin deri ve genital bölge siğillerinden sorumlu bulaşıcı bir ajan olduğu kabul edilmiştir<sup>3,22</sup>.

1970'li yılların ortalarına kadar insanlarda gözlemlenen bütün siğillere aynı tip papillomavirusün sebep olduğu düşünülmekteydi. Modern biyolojideki ilerlemelerle moleküler hibridizasyon tekniklerinin kullanılmaya başlaması ile birçok HPV tipinin varlığı keşfedilmiştir. O dönemde saptanan 60 tip HPV'den 20 tanesinin genital sistemle bağlantılı olduğu belirlenmiştir<sup>3,23</sup>.

HPV enfeksiyonunun sitolojik ve histolojik değişikliklerle karakterize olduğu ilk defa Koss ve Durfee tarafından 1956 yılında tanımlanmıştır. 1976 yılında Meisels ve Fortin, hemen arkasından 1977 yılında Purolo ve Savia, karakteristik hücresel değişikliklerini HPV enfeksiyonuna bağlayan kadar bu hücresel değişikliklerin siğillerle ilişkisi olmadığı düşünülmekteydi<sup>23</sup>.

1976 yılından itibaren kadın genital sisteminde HPV'nin indüklediği lezyonlar, sıklıkla servikal intra epitel neoplazi, karsinoma in situ ve invasive skuamöz hücre karsinomlarının sebep olduğu hücresel değişiklikler ışık mikroskopisinde



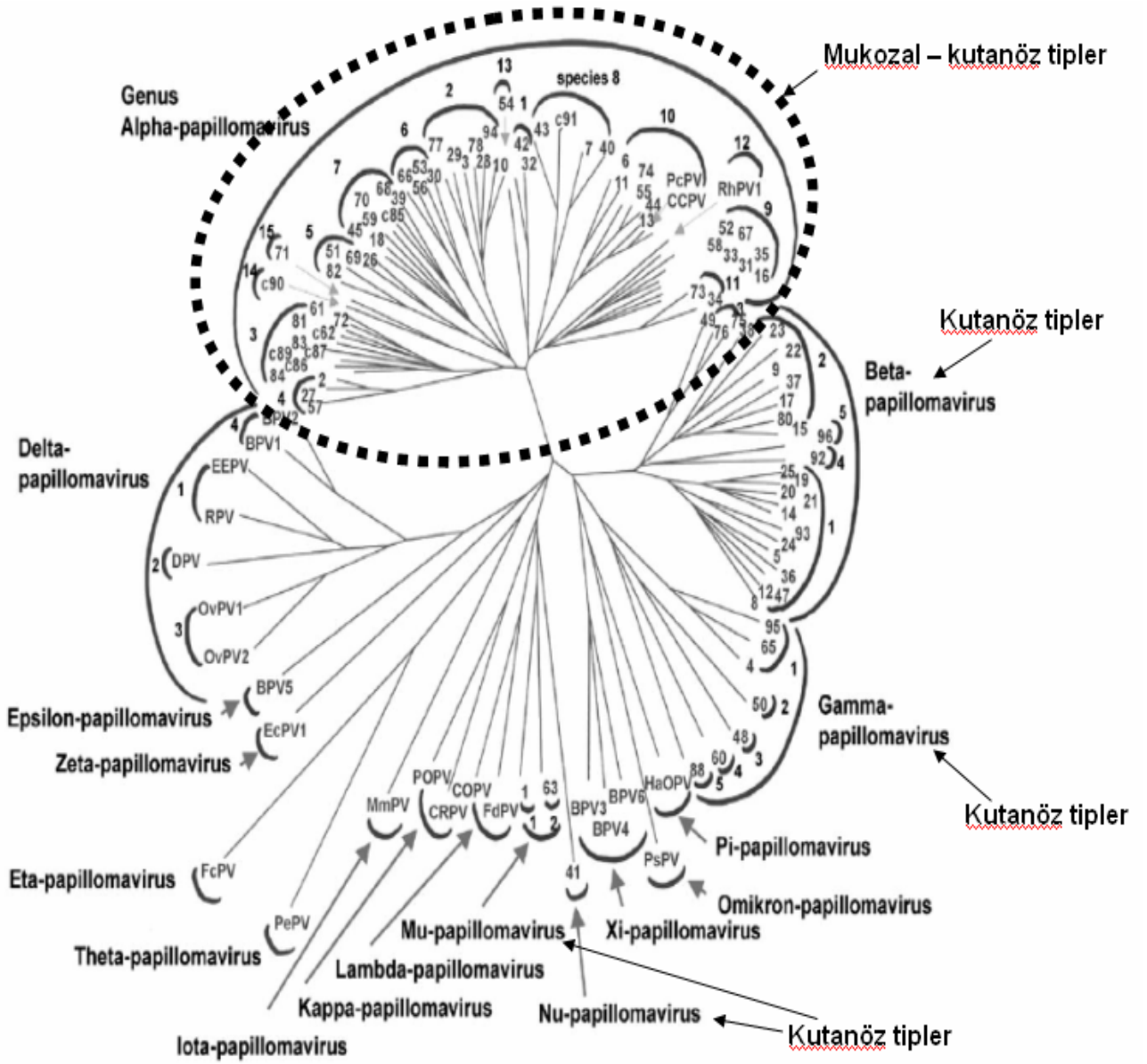
incelenmiştir. Böylece virusün varlığı klinik örneklerle gösterilmiş, virusün patogenezi hakkında daha çok fikir sahibi olunmuştur<sup>24</sup>.

### **II.1.2 Human Papillomavirus sınıflandırması**

HPV tipleri diğer birçok virusun aksine antijenik yapılarından çok DNA yapısına göre sınıflandırılır. HPV tipleri serotiplerine göre değil de genotiplerine göre sınıflandırılıp, keşfedildikleri sıraya göre numaralandırılmaktadırlar. Yeni bir HPV tipinden söz edebilmemiz için bilinen HPV tipleri ile karşılaştırıldığında seçilen genom bölgesindeki sekanslarda %10 farklılık bulunması gereklidir<sup>3</sup>. Günümüze kadar 120'den fazla HPV tipi belirlenmiş, ancak bunlardan yaklaşık 118 tanesi tam olarak sekanslanmış ve gruplandırılmıştır. Ancak hayvan virüsleri henüz kapsamlı bir şekilde çalışılmamıştır, her bir tür için sadece birkaç tip bilinmektedir<sup>5,8,25</sup>.

Bütün Papillomavirüsler, PApilloma, POlyoma ve VAcuolating virus ailelerinden oluşan PAPOVA (Papovaviridae) virüs ailesinde sınıflandırılmışlardır. Bütün HPV tipleri epitelyotrofik ve kendilerine özgü deri ya da mukoz membranları etkilerler<sup>22,26</sup>.

Filogenetik ağaca göre (Şekil II.1) insan ve hayvan papillomavirüsleri 16 grupta toplanır. Bu alfa'dan pi'ye kadar sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma bir kapsid proteini olan L1'i kodlayan segmentin nükleotid sekansının karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Hayvan papillomavirüsleri yaygın olarak birçok grupta görülürken, insan papillomavirusleri (HPV) sınırlı sayıda grupta gözlemlenmektedir. Aynı grupta yer alan APV ve HPV'ler farklı gruptakilere göre birbirleriyle yakından bağlantılıdır. Mukozal-kutanöz (genital) tip HPV'ler alfa-PV grubunda lokalize olmuşlardır. PV tipleri için filogenetik ağaç oluşturmanın en büyük yararı PV tiplerinin viral özelliklerinin ve patolojik olarak ortak yönlerinin belirlenmesidir<sup>25</sup>.



Şekil II.1 118 adet insan ve hayvan Papilloma virüslerinin yer aldığı filogenetik ağaç<sup>25</sup>

HPV'ler genel olarak üç grupta incelenir<sup>23,27</sup>.

1- Kutanöz Tipler

2- Epidermodysplasia Verruciformis (EV) tipleri

3- Mukozal Tipler

a) düşük riskli HPV'ler

b) olası yüksek riskli HPV'ler

c) yüksek riskli HPV'ler

**1- Kutanöz tip HPV'ler:** (HPV-1,2,4) Anogenital bölge dışında siğil oluşumuna sebep olan HPV'ler bu grupta yer alır.

**2- Epidermodysplasia Verruciformis (EV) tipleri:** (HPV-5,8,20,22) Bu gruptaki HPV'ler, filogenetik ağaçta kutanöz tiplerle aynı grup altında bulunurlar ve EV'li bireylerde veya immunosüresyonlu bireylerde nongenital cilt lezyonları oluştururlar. EV'li hastaların yaklaşık 1/3'ünde görülen, çoğunlukla güneşe maruz kalan bölgelerdeki HPV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu belirlenen bazı siğiller cilt kanseri gelişimine sebep olabilir. EV siğillerinin kansere dönüşenlerinin çoğu HPV-5 ve 8 ile ilişkilidir. Bu yüzden, bu iki tip de yüksek riskli tipler olarak tanımlanmaktadır<sup>23</sup>.

**3- Mukozal tip HPV'ler:** Mukozal HPV'ler 40'tan fazla tipi içerir ve genital bölgeyi enfekte etmek suretiyle genital/nongenital mukozayı etkilerler. Bu grup HPV'ler anogenital sistemi (vulva, vagina, serviks, anal kanal ve penis) ve solunum-sindirim kanalıyla birlikte oral kaviteyi de etkiler. Genital mukozal tipler asemptomatik enfeksiyonlardan genital siğillere, malignansiye sebep olan kalıcı enfeksiyonlara kadar geniş bir aralıkta klinik sonuçlar doğurur<sup>7</sup>.

Mukozal tip HPV'ler anogenital karsinoma sebep olabilecek intraepitel neoplazi ile ilişkili olup olmamasına göre düşük riskli, olası yüksek riskli ve yüksek riskli tipler olmak üzere üç alt grupta incelenir<sup>6,7</sup>.

**a) Düşük riskli HPV tipleri:** Düşük riskli HPV'ler neoplazi ile bağlantılı değildir. Düşük riskli olarak tanımlanan HPV tiplerinin condyloma accuminata ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bu grup HPV'ler ile enfeksiyon sonucunda ya asemptomatik enfeksiyon gelişir ya da epitel hücrelerinin lokal proliferasyonu sonucu siğil oluşumu gibi kolaylıkla gözlemlenebilir lezyonlar oluşur. HPV 6 ve 11 primer olarak benign genital siğillerin veya condyloma accuminatumun en yaygın sebebidir. Bu iki virüs %90 kondilomda bulunmaktadır. Bunların 2/3'ünde etken HPV 6, 1/3'ünde ise etken HPV 11 olarak bulunmuştur. Bu iki HPV tipinden başka HPV 42, 43, 44 ve 55'in de condyloma accuminatum ile ilişkili olduğu belinmektedir<sup>3,23</sup>.

**b) Olası yüksek riskli HPV tipleri:** Kanser gelişimi açısından yüksek riskli olduğundan şüphelenilen, ancak malign oluşumlarla ilişkisi henüz yeteri kadar aydınlatılmamış HPV tipleri bu grupta yer alır.

**c) Yüksek riskli HPV tipleri:** HPV tiplerinden serviks kanseri ile ilişkili olanlar "yüksek riskli tipler" olarak karakterize edilmişlerdir. Anüs, vulva, penis ve serviks karsinomunu kapsayan anogenital kanserler yüksek riskli tiplerle ilişkilidir. Birçok yüksek riskli HPV tipi filogenetik ağaçta alfa-PV grubu'nunda bulunmaktadır<sup>3,25,27</sup>. Genital bölge epitelini etkileyen yaklaşık 40 HPV tipinin neredeyse yarısı yüksek riskli tipler olarak tanımlanır<sup>8</sup>.

Tablo 1'de HPV tipleri ve yereldikleri risk kategorileri gösterilmektedir.

**Tablo II.1** HPV tiplerinin risk kategorilerine göre sınıflandırılması<sup>28</sup>

Risk Kategorisi	HPV Tipi
Düşük riskli tipler	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81,
Olası yüksek riskli tipler	26, 53, 66, 68, 73, 82
Yüksek riskli tipler	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59

Hiperplazi ve hiperkeratozis HPV'nin deri enfeksiyonlarının major patolojisidir. Lezyon tipleri ve patolojiler ise değişik HPV tiplerine bağlıdır<sup>14</sup>. Farklı HPV tipleri birçok patolojik durumdan sorumlu tutulmaktadır. HPV tipleri ile ilişkili olduğu hastalıklar Tablo II.2'de gösterilmiştir.

**Tablo II.2** HPV tipleri ve ilişkili olduğu hastalıklar<sup>24,29,30</sup>

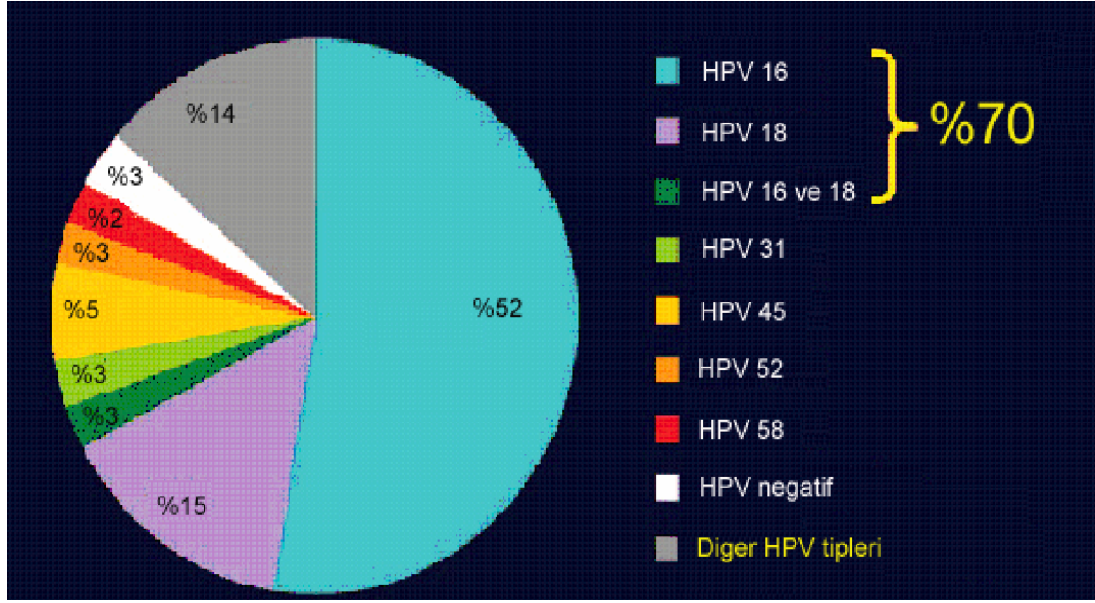
<b>Hedef Bölge</b>	<b>Hastalık</b>	<b>HPV tipi</b>
<b>Deri</b>	Deride siğil	1,2,3,4,7,10,26-29,41,48,60,63,65,78
	Epidermodysplasia verruciformis	3,5, 8, 9, 12, 14, 17, 19-25, 36, 46, 47, 49, 50
	Condyloma accuminatum	6, 11, 16, 18, 34, 54, 55, 70
<b>Anogenital sistem</b>	Servikal kanser ve neoplaziler	16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 56, 59, 65, 66
	Vajinal kanser	16, 18, 74
<b>Oral kavite baş-boyun tümörleri</b>	Oral ve larengeal papillomalar	6, 7, 11, 32, 34, 59, 69, 72, 73
	Özefagial papilloma	45
	Özefagial skuamöz hücreli kanser	73

### II.1.3 HPV'nin Toplumda görülme sıklığı

HPV enfeksiyonunun dünya genelinde kadınlarda görülme sıklığı tahminen %2 ile %44 arasında değişmektedir<sup>31</sup>. Bu geniş aralık çalışılan popülasyonların farklı yaş dağılımları ile veya HPV enfeksiyonunu tespit etmek için kullanılan tekniklerin duyarlılık farkları ile açıklanmaktadır<sup>23</sup>.

Tüm dünyada her yıl yaklaşık olarak 30 milyon yeni genital HPV enfeksiyonu tanısı konulmaktadır ve dünya genelinde en yaygın cinsel yolla bulaşan hastalık HPV'dir<sup>4</sup>. HPV tiplerinin de dünyanın değişik bölgelerinde farklı insidans gösterdiği bilinmektedir. HPV 16 tüm dünya genelinde en yaygın yüksek riskli tip olmakla birlikte diğer tiplerin dağılımı ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Örneğin; Batı Afrika'da HPV 45 çok yaygınken orta ve güney Amerika'da HPV 39 ve 59, ve Pasifik bölgesinde HPV 52 ve 58 baskındır<sup>12</sup>. Serviks kanseri vakaları incelendiğinde HPV 18'in Afrika ve Amerika'da Avrupa'ya göre daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. Tüm dünya genelinde HPV 18'in en yaygın tespit edildiği yer ise Amerika'dır. Ancak sınırlı sayıda örnekten elde edilen bu sonuçları popülasyon geneline uyarlamak ve değerlendirmek pek doğru değildir<sup>23</sup>.

HPV 16 ve 18, HPV enfeksiyonlarında ve servikal kanserlerde en yaygın rastlanan yüksek riskli tiplerdir. HPV 16 dünya genelinde servikal kanserlerin yaklaşık %50'sinde tespit edilmişken, HPV 18 servikal kanserlerin yaklaşık %15'inde tespit edilmiştir<sup>8,13</sup>. Şekil II.2'de dünya genelinde skuamöz hücre servikal karsinomaya sebep olan HPV tiplerinin görülme sıklığı gösterilmiştir.



**Şekil II.2** Dünya genelinde Skuamöz hücre servikal karsinomaya-sebep olan HPV tiplerinin görülme sıklığı<sup>8</sup>

Tipe özgü antikorların ölçümüyle kombine DNA tabanlı bu çalışmalar seksüel açıdan aktif kadınların %50'den fazlasının hayatlarının bir döneminde bir ya da birden fazla tip HPV ile enfekte olduğunu göstermiştir<sup>31</sup>. Winer ve arkadaşları, ilk seksüel birleşmeden sonra yaklaşık 48 ay sonra kadınların %50'sinden fazlasının HPV enfeksiyonu kazandığını belirtmiştir<sup>32</sup>.

Anogenital HPV enfeksiyonunun ABD'de en yüksek insidansa sahip cinsel yolla bulaşan hastalıktır<sup>33</sup>. ABD'de bulunan Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC)'ne göre yaklaşık 24 milyon Amerikalı HPV ile enfektedir. Heryıl ABD'de yaklaşık 6,2 milyon insanın HPV ile enfekte olacağı öngörülmektedir. HPV enfeksiyonlarının tahmini sıklığı yaşla yakından alakalıdır. Yaşların

karışık olarak alındığı tahmini sıklık hesaplamalarında %5-15 arası bir insidans elde edilir<sup>4,33</sup>.

HPV ile enfekte olan kadınların sıklığına bakılınca servikte malign hastalık geliştiren kadın sayısı çok azdır. Verilen en çok toplandığı ABD'de yapılan çalışmalar göstermiştir ki, 18-30 yaş arası kadınların %20-25'i onkojenik bir virüsle enfekte olduğu halde ABD'de yılda sadece 15 bin invaziv servikal kanser vakası 40'lı ve 50'li yaşlardaki kadınlarda tespit edilmektedir<sup>34</sup>.

ABD'de cinsel yönden aktif kadınların %50'sinin bir veya birden fazla HPV tipi ile enfekte olduğu yaklaşık %15'inde aktif enfeksiyon ve bunların %50-75'inin yüksek riskli tipler ile enfekte olduğu ve %1'inde genital siğillerin tespit edildiği belirtilmiştir<sup>35</sup>.

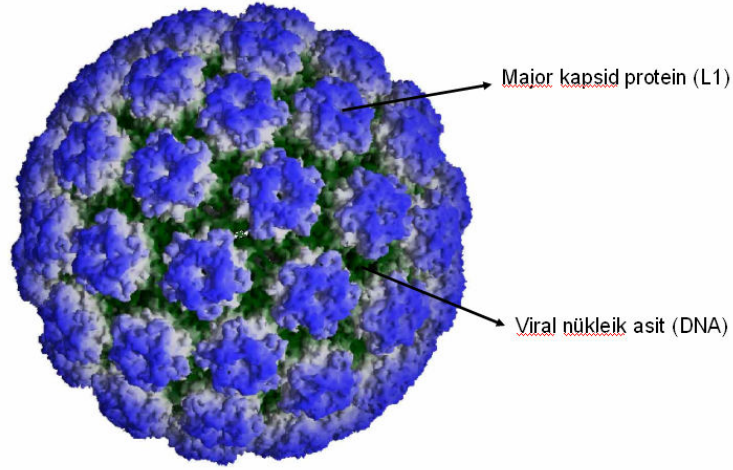
#### **II.1.4 Virüsün yapısı**

Bütün papillomavirüsler küçük, çift iplikli ısıya dayanıklı DNA virüsleridir. IHPV genomu 6800-8000 baz çiftinden oluşmuştur. Çift sarmallı çembersel DNA genomu 55 nm. çapında zarfsız, ikozahedral bir kapsitle çevrilidir. Organik solvanlara ve 56°C'lik sıcaklığa dayanıklıdır<sup>3,36,37</sup>.

Viral partikül ağırlığının %80-90'ı kapsid proteinlerinden oluşur. Virion 72 kapsomerden (60 hekzamerik + 12 pentamerik) oluşan ikozahedral bir kapsid ile çevrilidir. Viral kapsid 2 proteinden oluşur. Bu proteinler; L1 geni tarafından kodlanan major protein ve L2 geni tarafından kodlanan minor proteindir. Yaklaşık 56.000 Dalton molekül ağırlığındaki L1 major kapsid proteini virion ağırlığının %80'ini oluşturur<sup>26</sup>. Minör kapsid



proteininin ağırlığı ise yaklaşık 76.000 Dalton'dur. Şekil II.3'te üç boyutlu HPV modeli gösterilmektedir.



**Şekil II.3** Üç boyutlu HPV Modeli\*

Viral DNA;

1. Kodlanmamış düzenleyici bölge (URR, LCR)
2. Açık okuma alanı (Open reading frame=ORF)
  - a) erken gen bölgesi
  - b) geç gen bölgesi'nden oluşur.

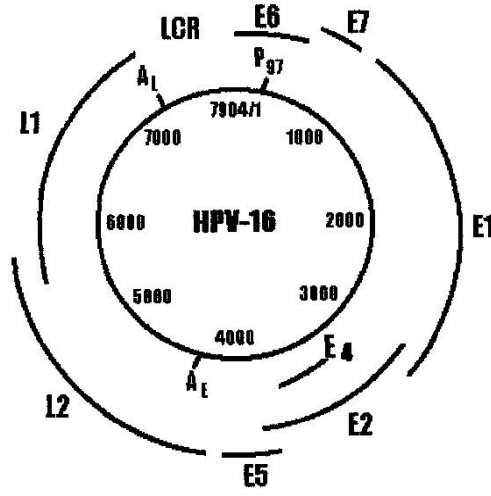
Viral DNA kodlanmamış düzenleyici bölge (URR veya LCR) ve açık okuma alanı (Open reading frame=ORF) olmak üzere iki bölümden oluşur ve tamamı tek bir DNA sarmalı üzerinde kodlanır<sup>10</sup>.

Kodlanmamış bölge yaklaşık 400-1000 baz çiftinden oluşur ve uzun kontrol bölgesi (URR veya LCR) diye de adlandırılır. Bu bölge p57 promotör bölgesini de içine alır. Aktivatör ve baskılayıcılar sayesinde, ORF'lerin transkripsiyonu da kontrol altında tutularak, DNA replikasyonu düzenlenir. Dolayısıyla, URR viral proteinlerin regülasyonunda önemli role sahiptir<sup>10,26</sup>.

\*Modis Y, Trus BL, Harrison SC, Atomic model of the papillomavirus capsid EMBO J., 21, 4754-62'den alınmıştır.

Açık okuma alanı (ORF), erken ve geç gen bölgesi olmak üzere iki bölgeyi kodlar. Toplam 10 fonksiyonel bölge vardır. Bunlardan 8 tanesi erken, 2 tanesi geç bölge genidir. Erken ORF'ler E1'den E8'e kadar numaralandırılmıştır ve viral replikasyon, enfeksiyon ve entegrasyonda major rol oynayan proteinleri kodlarlar. Erken ORF'ler E1, E2, E4, E5, E6, E7 olarak tanımlanır ve her birinin farklı bir fonksiyonu vardır. HPV'de E3 ve E8 ORF'nin bilinen bir fonksiyonu olmadığı için toplam erken ORF sayısı 6 olarak kabul edilmektedir. Geç ORF'ler ise L1 ve L2 olmak üzere iki tanedir<sup>3,27</sup>.

Genomik haritası en ayrıntılı belirlenmiş HPV tipi HPV 16'dır. Şekil II.4'te HPV 16'nın genomik haritasında görüldüğü üzere; çift sarmallı çembersel DNA molekülü 7904 baz çiftinden oluşmuştur. Transkripsiyon saat yönünde gerçekleşir. HPV 16 için haritalanmış olan tek transkripsiyonel promotor p97'dir. DNA sekansı sonucu ortaya çıkan ORF'ler E1-7, L1 ve L2 çembersel genomun dış tarafında gösterilmiştir. A<sub>E</sub> ve A<sub>L</sub> ile erken ve geç poliadenilasyon bölgelerinde gösterilmiştir. Viral uzun kontrol bölgesi (LCR) transkripsiyon ve replikasyon için düzenleyici elemanlar bulundurur<sup>27</sup>.



**Şekil II.4** HPV 16'nın genomik haritası<sup>27</sup>.

Herbir ORF; büyüklüğüne, çembersel genomdaki pozisyonuna ve erken /geç bölgede yer almasına göre kodlanır. Genomun erken bölgesi (E1-8) düzenleyici (regulatory) proteinleri kodlar. Bu proteinler, üretken olmayan enfekte hücrelerde ve transforme hücrelerde eksprese edilen transkripsiyon ve replikasyondan sorumlu proteinlerdir. Replikasyon sırasında önce erken bölge proteinleri, sonra geç bölge proteinleri sentez edilir<sup>3</sup>. Tablo II.3'te erken ve geç ORF'lerin fonksiyonları gösterilmektedir.

#### **Erken bölge ORF'leri:**

E1 ve E2 genomik replikasyonda görevli kritik proteinleri kodlar. E4'ün fonksiyonu tam olarak anlaşılamayan sitoplazmik fosfoproteini kodladığı ve sitokeratin yapısını bozduğu bilinmektedir. E5, E6 ve E7 onkogenler olarak tanımlanır. E5 proteini büyüme reseptörlerini membrana bağlanarak aktive eder. Son yıllarda yapılan çalışmalar E5'in DNA hasarını takiben apoptozisi önlediğine dikkati çekmektedir. Viral entegrasyon sırasında E5'in de içinde bulunduğu genomun büyük bir parçası silinir. Bu nedenle E5'in,

HPV ile ilişkili geç dönem karsinogeneziste önemli bir rolü olmadığı düşünülmektedir. E6 ve E7 hücre proliferasyonu ve transformasyonunu indükleyen proteinleri inaktive ederler (sırasıyla, p53 ve pRb). Her iki protein de tüm HPV ile ilişkili patolojilerde korunur ve eksprese edilirler. E6 ve E7 birbirinden bağımsız olarak çeşitli hücre tiplerini ölümsüzleştirme yeteneğine sahiptirler, ancak birarada eksprese edildiklerinde etkinlikleri daha yüksektir<sup>36</sup>.

E8'in de aynı E3 gibi fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Ancak son yıllarda E8'in E2 ile birlikte çalışarak HPV DNA'sının replikasyonunu düzenlediği düşünülmektedir<sup>38</sup>.

### **Geç bölge ORF'leri:**

L1 ve L2 olarak tanımlanmış iki adet geç bölge geni viral replikasyonun geç döneminde sentezlenir. Minör ve major viral kapsid proteinlerinin kodlanmasından sorumludurlar ve böylece virüsün kapsid yapısının oluşmasını sağlarlar.

L1, değişik tipler arasında yüksek düzeyde korunmuştur. Virusa antijenik özellik sağlayan major viral kapsid proteinlerini kodlar ve total proteinin yaklaşık %90'ını sentezler<sup>10,36</sup>.

L2 ise minor viral kapsid proteinlerini kodlar. Tipler arasında sekans değişimine uğramıştır ve tiplere özgü antikor hazırlanmasında antijen olarak kullanılır<sup>27</sup>. Her iki geç bölge ORF'si (L1,L2) de prekanseröz ve malign hücrelerde eksprese edilmez<sup>10</sup>. Ancak, geç bölge ORF'leri aşı geliştirilmesinde kullanımlarıyla son derece önemlidirler<sup>36</sup>.

**Tablo II.3** HPV erken ve geç genlerinin fonksiyonları<sup>3,27,39</sup>.

<b>GEN</b>	<b>FONKSİYONU</b>
E1	1. Viral DNA replikasyonu ve viral döngünün tamamlanmasında görevli proteinleri kodlar 2. Bu proteinler E2 ürünleri ile birlikte çalışırlar.
E2	1. Ekstrakromozomal DNA replikasyonu için iki protein gereklidir. 2. Bunlar E1 proteinleri ile birlikte çalışırlar. 3. Transregulator iki proteini kodlar. Full-length Protein, erken bölgenin transkripsiyonunu arttırmak için DNA'ya URR'den bağlanır. 4. Daha küçük protein ise, erken bölgenin transkripsiyonunu inhibe eder.
E4	1. Virüsün olgunlaşması ve replikasyonu açısından önemli bir proteindir. 2. Enfeksiyonun ileriki aşamalarında tanımlanmıştır.
E5	1. Konak hücrenin membran reseptörleriyle etkileşen bir proteindir. 2. Enfekte hücrede hücre proliferasyonunu stimule edebilir.
E6	1. Viral replikasyon, konak hücre ölümsüzleştirilmesi ve transformasyonu için kritik öneme sahip bir proteindir.

	2. p53 degradasyonunu stimule eder.
E7	1. Viral replikasyon, konak hücre ölümsüzleştirilmesi ve transformasyonu için kritik öneme sahip bir proteindir. 2. Rb proteinine bağlanır ve E2F-Rb kompleksini hücrenin genlerin transkripsiyonunu stimule ederek ayırır.
L1	1. Major kapsid proteinlerini kodlar 2. Major kapsid proteinleri tipler arasında farklılaşmamıştır.
L2	1. Minör kapsid proteinlerini kodlar. 2. Minör kapsid proteinleri tipler arasında sekans değişimine uğramıştır ve tiplere özgü antijen olarak kullanılır.

## II.2 HPV Enfeksiyonu

HPV ile enfeksiyonun oluşabilmesi için virüsün bazal tabaka hücrelerine ulaşabilmesi gerekir. Bu genellikle deride veya mukozada travma sonucu oluşan mikrolezyonlar sayesinde gerçekleşir<sup>34,36</sup>.

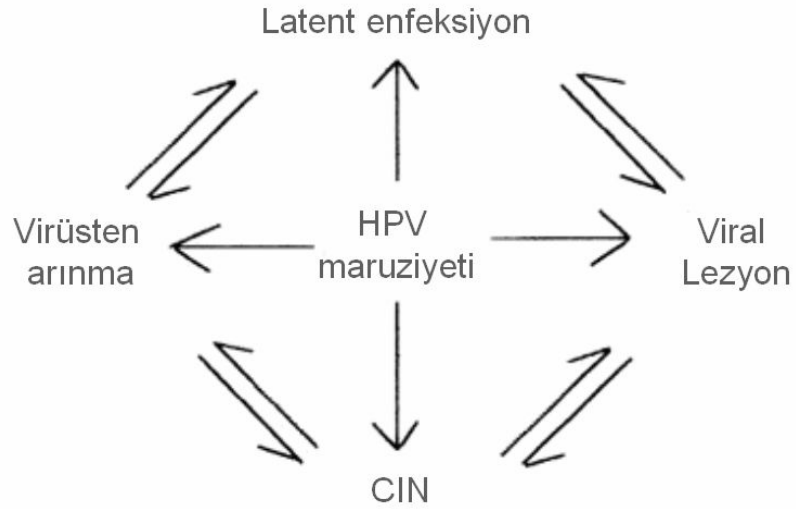
HPV enfeksiyonunun üç tipinden sözedilir:

**1) Latent enfeksiyonda**, moleküler biyolojik teknikleri kullanılarak HPV DNA tespit edilebilir ve herhangi bir klinik bulgu veya sitolojik değişiklik söz konusu değildir<sup>14,40</sup>. Latent enfeksiyonun doğru bir şekilde belirlenip tanımlanabilmesi gelişmiş moleküler biyoloji teknikleriyle sözkonusudur ve HPV enfeksiyonuna bağlı gelişebilecek olası klinik farklılaşmaların erken tespitinde çok önemlidir<sup>41</sup>.

**2) Subklinik enfeksiyonda**, kolposkopi veya mikroskopiyile patoloji tespit edilebilirken muayene yöntemleriyle tespit edilemez .

3) **Klinik enfeksiyon**, gözle görülebilir lezyonlar oluşmuştur ve artık klinik semptomlar tespit edilebilir<sup>14</sup>.

HPV maruziyeti sonrasında gerçekleşen latent enfeksiyon, viral lezyon, CIN gelişimi ve çeşitli mekanizmaların devreye girmesi sonucu virüsten arınma Şekil II.5'te gösterilmektedir.



**Şekil II.5** HPV enfeksiyonu<sup>22</sup>

Serviksin HPV ile enfeksiyonu sonucu kanser oluşumu çok basamaklı bir süreç gerektirir (Şekil II.6). Bazen enfeksiyon gerçekleşir gerçekleşmez hızlı bir şekilde temizlenir. Enfeksiyonun 1-10 yıl arası kalıcılık göstermesi sonucu çoğu zaman CIN III ve

prekanseröz dokular oluşur, ancak bazen konakçının immün sistemi bazen de farklı mekanizmalar bu aşamada da geri dönüşümü mümkün kılar. Geri dönüşümün gerçekleşmediği veya tedavinin yapılmadığı durumlarda ise kanser gelişimi kaçınılmazdır<sup>42</sup>.

Konakçı hücrenin HPV ile enfeksiyonu temelde iki sonuca sebep olur:

1. **Geçici enfeksiyon:** Geçici enfeksiyon viral siklusun olağan gidişatını takip eder. Sırasıyla; adsorbsiyon, penetrasyon, transkripsiyon, translasyon, DNA replikasyonu ve olgunlaşma. Ancak bağışıklık sistemi ve tam aydınlatılmamış birtakım mekanizmalarla virüs dokulardan silinebilir.

HPV enfeksiyonunun popülasyondaki yaygınlığına rağmen çoğu durumda virüsten arınmanın gerçekleştiği bilinmektedir. HPV ile enfeksiyonların %70'inin ilk 1 yıl içinde, %80'inin ilk 1,5 yıl içinde, %91'inin ise 2 yıl içinde temizlendiği bilinmektedir. Ancak bu temizlenmenin gerçekten virüsün tamamen elimine olması anlamına mı geldiği yoksa viral DNA'nın tespit edilmesi sırasında kullanılan yöntemlerin tayin sınırlarının altında viral yüke sahip olduğu için mi saptanamadığı bilinmemektedir<sup>31,33</sup>.

2. **Kalıcı enfeksiyon:** Yüksek riskli HPV tipleri ile kalıcı enfeksiyonun serviks kanseri için en önemli risk faktörü olduğu bilinmektedir. Kalıcı enfeksiyon için standart bir tanımlama yoktur, fakat ilk teşhisten sonra 4-6 aylık izleme periyodlarında 2 veya daha fazla kontrolde temizlenmeyen viral enfeksiyon veya yaklaşık 1,5 yıl süresince temizlenmeyen HPV enfeksiyonları genellikle kalıcı enfeksiyon olarak değerlendirilmektedir<sup>31,33</sup>.





**Şekil II.6** Onkojenik bir HPV ile enfeksiyon sonrası gelişen servikal farklılaşma<sup>42</sup>

### **II.2.1 HPV Replikasyonu ve entegrasyon**

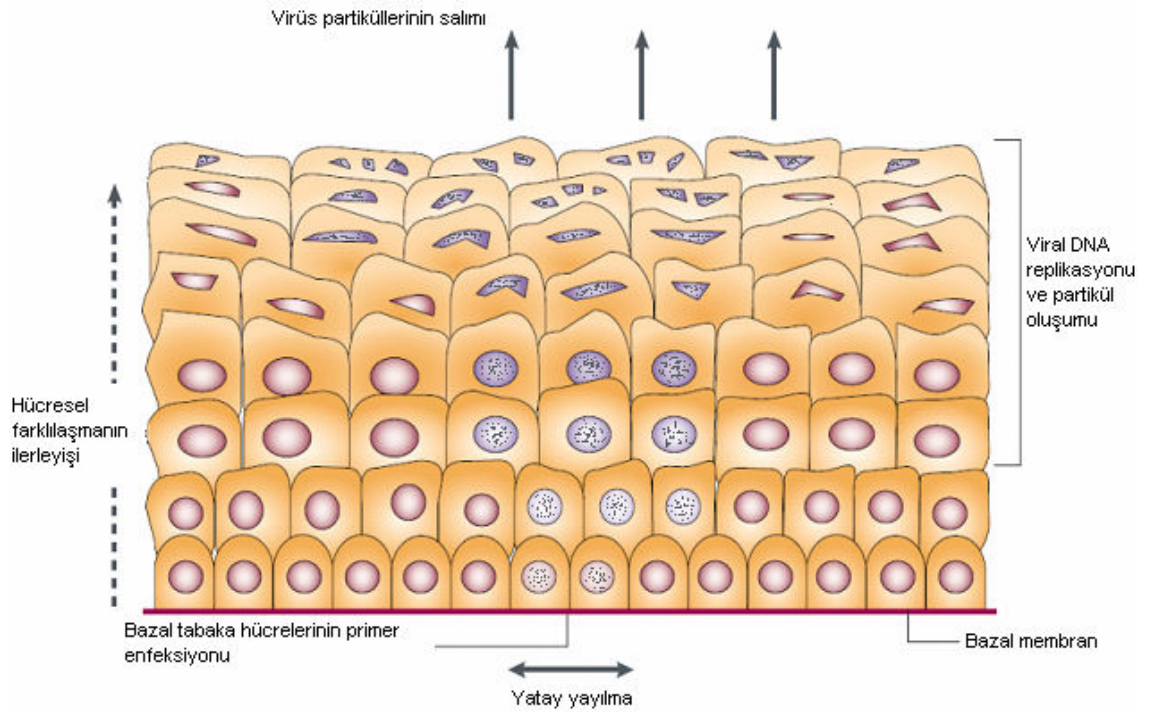
Diğer küçük DNA virüsleri gibi HPV de replikasyon için konakçı hücrenin DNA sentez mekanizmasına ihtiyaç duyar. HPV'ler epitelin bazal hücrelerini enfekte eder ve üst tabakadaki hücrelerde çoğalırlar. Yapılan çalışmalar viral replikasyonun hücre çekirdeğinde gerçekleştiğini göstermiştir<sup>14</sup>.

Replikasyonda sırasıyla erken ve geç proteinler sentezlenir. PV'ler tarafından sentezlenen E1ve E2 proteinleri viral replikasyon için gereklidir<sup>43</sup>. Suprabazal tabakaya girişten sonra geç viral gen ekspresyonu başlar; çembersel viral genom replike olur ve yapısal proteinler oluşur. Epidermis veya mukozanın üst tabakalarında tamamlanmış viral partiküller birleştirilip salıverilir. Bu sayede virüs diğer dokuları da enfekte edebilir<sup>36</sup>.

Deri veya mukozadaki mikrolezyonlar sayesinde virüs bazal epitel tabakasına ulaştığında, herbir hücre için 50-100 kopya oluşturulur. Bazal tabakadaki hücreler bölünebilir, üst tabakalara ilerler ve terminal farklılaşmaya uğrarlar. Farklılaşmış hücrelerin replikasyon yeteneği çok azdır veya hiç yoktur. Dolayısıyla, eğer hücreler

terminal farklılaşmaya uğrarlarsa virüs çoğalamayacaktır<sup>34</sup>. Enfekte yeni hücreler viral genlerin aktive, viral DNA'nın replike olduğu ve kapsid proteinlerin olduğu suprabazal hücre tabakalarına göç eder böylece viral partikül oluşumu devam eder<sup>36</sup>.

Şekil II.7'de, HPV'nin yaşam döngüsü, bazal epitel hücrelerinin enfeksiyonu, viral DNA'nın replikasyonu ve viral partiküllerin salınması hangi tabakalarda gerçekleştiği gösterilmiştir<sup>36</sup>.



Şekil II.7 HPV'nin yaşam döngüsü<sup>36</sup>

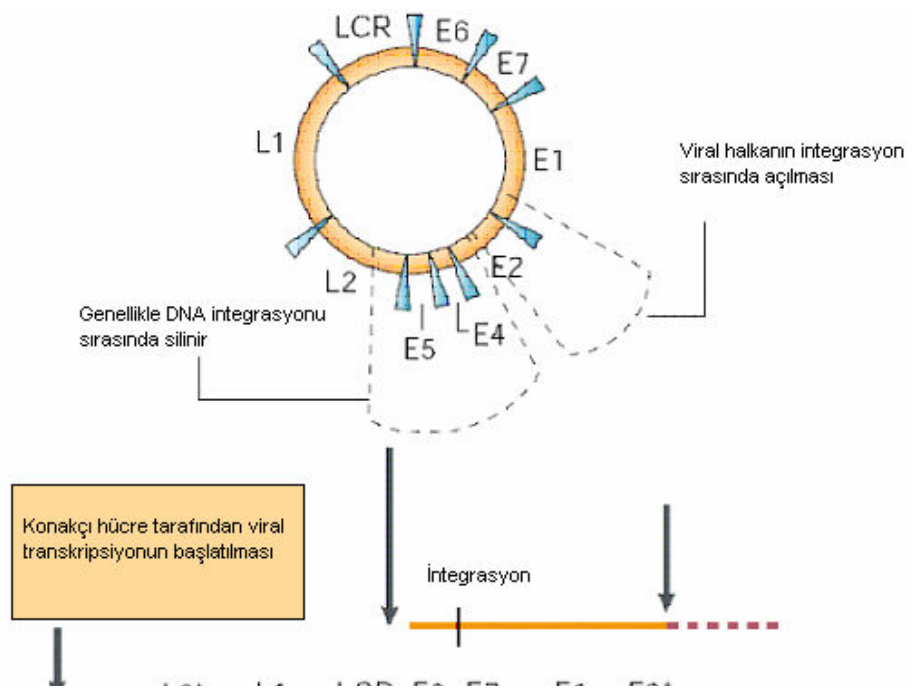
Virüs proteinleri erken enfeksiyon fazında bazal ve parabazal tabakalarda eksprese eder. G1'den S fazına geçişi stimule eden biyolojik özellikler bu hücrelerde bulunmaktadır. Bununla birlikte virüs bir miktar farklılaşmaya ihtiyaç duyar

çünkü mRNA kapsid proteininin transkripsiyonunu sağlayan erken promoterdan geç promotera geçiş, farklılaşmış hücrelerce sağlanır. Bu promoter değişimini sağlayan faktörler henüz tanımlanamamıştır. Farklılaşmaya duyulan bu ihtiyaç, kapsid protein sentezinin ve viral DNA amplifikasyonunun bazal epitel hücrelerinde hiçbir zaman gözlenmemiş olmasıyla açıklanabilir. Enfekte hücreler, epitelin yukarısına doğru hareket ettikçe ve kısmi olarak farklılaştıkça, viral DNA çoğalır ve böylece geç genlerin transkripsiyonu ve translasyonu gerçekleşir<sup>34</sup>.

Kanser gelişiminde viral DNA molekülü konakçı hücre DNA'sına entegre olur. HPV DNA'sı insan genomuna kırılğan bölgelerden entegre olur. Ancak, az sayıda entegrasyon bölgesi ayrıntılı şekilde haritalanmıştır<sup>44</sup>.

Viral genom E2 bölgesinden açılır ve bu genin devamlılığını bozar. E2 ve E2 ORF'sine yakın genler (E4, E5 ve L2'nin bir kısmı) viral entegrasyon gerçekleştikten sonra düzenli bir şekilde silinir<sup>36</sup>.

**Şekil II.8'de** çembersel HPV DNA'sının konakçı hücre DNA'sına integrasyonu entegrasyonun gerçekleştiği bölgelerle birlikte gösterilmektedir. Viral entegrasyonla birlikte silinen genler ise şekilde yıldızla gösterilmiştir.



**Şekil II.8** Çembersel HPV DNA organizasyonu ve konakçı hücre DNA'sına integrasyonu<sup>36</sup>

### II.2.2 Patogenez

PV'lerin yaşam döngüsü diğer virüs ailelerinden farklı olarak, enfeksiyonun gerçekleşebilmesi için çoğalabilme yeteneğine sahip hücrelere ihtiyaç duyar. Bu hücrelerde her ne kadar spesifik erken viral genlerin (E5,E6,E7 gibi) sınırlı ekspresyonu söz konusu olsa da enfekte hücrelerin artışı ve yatay yayılımı kaçınılmazdır<sup>36</sup>.

HPV'ler epidermal veya mukozal bazal tabaka hücrelerini enfekte eder ve replike olur. Diğer hücre tipleri HPV enfeksiyonuna karşı daha dirençlidir. Enfeksiyon sonrasında gerçekleşen hücresel farklılaşmalar papillomalara veya neoplazilere sebep olur<sup>22,26</sup>.

**Papillomalar:** Papillomalar birkaç haftadan birkaç aya değişen latent dönemi takiben ortaya çıkan benign epitelyal lezyonlardır. Papillomalar deride veya mukoz membranda oluşabilir. Deride bulduklarında siğil, genital bölgede bulduklarında kondiloma olarak adlandırılırlar. Lezyonlar aylarca ya da yıllarca kalabilir ve spontan olarak gerileyebilir. Kronik enfeksiyon oluşturmak için virüsün uzun dönem çoğalma kapasitesine sahip epitel hücrelerini enfekte ettiğine inanılmaktadır. Epitelin üst

tabakalarında minör bir travma inokulasyon için gereklidir. Bu tür travmalar çoğunlukla cinsel ilişki sırasında ortaya çıkar ki bu da cinsel temas sonrası yüksek orandaki HPV geçişini açıklar. Kişinin kendi HPV'si, enfekte olmayan bölgeleri de enfekte etmek için önemli bir kaynak oluşturur<sup>27</sup>.

Papillomalar kanca şeklinde uzantılar oluşturur ve kalınlaşmış epidermis (akantozis) ile karakterizedir. Epiderminin üst tabakalarındaki hücreler anormal çekirdek içerebilir (koilositozis), bunların çoğu viral partikül veya proteinlerle ilişkili değildir ve sitopatolojik değişikliklerin altında yatan mekanizmalar bilinmemektedir. Bu lezyonlar her ne kadar viral enfeksiyonun direkt sonucu olarak ortaya çıksada virüsün bu patolojik değişikliği hangi mekanizmalarla ortaya çıkardığı bilinmemektedir<sup>27</sup>.

Servikal siğillerde HPV DNA'sı epizomal formda bulunur ve genellikle konakçı genomuna entegre olmaz. Ancak servikal kanser hücrelerinde genellikle HPV DNA'sı ya genoma entegredir, ya da hem entegre hem de epizomal formda viral HPV DNA'sına sahiptirler<sup>44</sup>.

### **II.2.3 HPV Onkoproteinleri ve onkogenezis**

HPV ile indüklenen tümörlerin çoğunda E6 ve E7 viral proteinlerinin ekspresyonu dikkat çekmiştir. Bu durum E6 ve E7 viral proteinlerinin hücresel transformasyonla direkt ilişkili olduğunu göstermiştir<sup>6</sup>. Yaklaşık 160 aminoasitten oluşan E6 ve 100 aminoasitten oluşan E7 onkoproteinlerinin düzensiz ekspresyonunun hücre transformasyonuna ve sonuçta kansere sebep olduğu düşünülmektedir<sup>44,45</sup>.

HPV ile ilişkili karsinogenezis daha çok E6, E7 proteini ve iki tümör baskılayıcı gen olan p53 ve pRB üzerinde yoğunlaşmıştır. HPV E6 proteinleri p53, E7

proteinleri ise Rb tümör baskılayıcı yolakları hedefler. Birçok kanserde baskılanmış olan bu iki yolak hücre döngüsü ve apoptozisle ilişkilidir<sup>14</sup>.

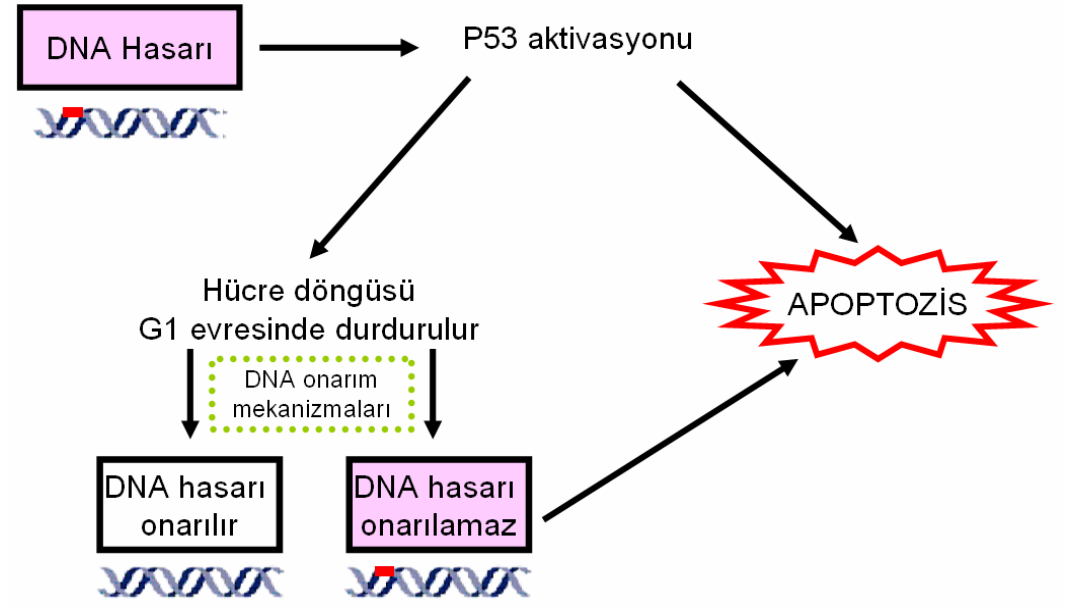
İnsan genital deri keratinositleri mukozayla ilişkili HPV'lerin biyolojik etkilerinin görülmesi için kullanılmış, genital keratinositlerin yüksek riskli HPV E6 ve E7 genleriyle karşılaştırdıktan sonra ölümsüz hale geldiği sonrasında da skuamöz farklılaşma gerçekleştiği gösterilmiştir<sup>6</sup>.

Düşük riskli HPV'lerin eksprese ettiği E6 ve E7 proteinler, yüksek riskli HPV'lerin eksprese ettiği E6 ve E7 proteinlerle kıyaslandığında, tümör suppresor proteinleri olan p53 ve pRb'yi daha az inaktive ederler<sup>14, 46</sup>. HPV ile ilişkili karsinogenezde sekonder mekanizmaların önemini vurgular şekilde, HPV'nin immortalize ettiği hücreler başlangıçta nontumorijenik olmasına karşılık başka karsinogenlere maruziyet veya çok sayıda pasajlama sonrasında tumorijenik değişime uğrar<sup>16</sup>. Yüksek riskli HPV tiplerinin eksprese ettiği E5, E6 ve E7 proteinleri hücre döngüsünde çeşitli kontrol mekanizmalarının elimine olmasına sebep olur. Hücrelerin oluşmuş DNA hasarını onarmaksızın çoğalmasına ve dolayısıyla mutasyonların birikmesine neden olur<sup>14</sup>. Yüksek riskli HPV tipleri ile enfeksiyon sonrasında p53 inaktivasyonu gerçekleşir. Tümör baskılayıcı gendeki bu inaktivasyon, DNA hasarının onarılamamasına ve apoptozisin engellenmesine sebep olur. Hücresel kontrol mekanizmalarında ve proliferasyon yollarında oluşan değişimler sonucu karsinogenik aktivasyon gerçekleşir<sup>13</sup>.

p53 geni hücre siklusunun negatif regülasyonunda rol alır. Fizyolojik olarak normalde hücre içindeki p53 işlevsel olduğu halde düşük düzeydedir. Ancak, hücresel DNA hasarlandığı zaman p53 düzeyi artar. p53 DNA'ya bağlanıp pek çok transkripsiyon genlerini stimüle eder ve iki major etki oluşur; hücre siklusu sonlanması ve apoptozis<sup>14</sup>. DNA hasarı oluşuktan sonra, p53 aktivasyonu gerçekleşir ve hücre

siklusunu G1 evresinde dinlenmeye alır. Bu sırada DNA hasarı onarılır ya da hasar onarılamıyorsa hücre apoptozise gider<sup>39</sup>.

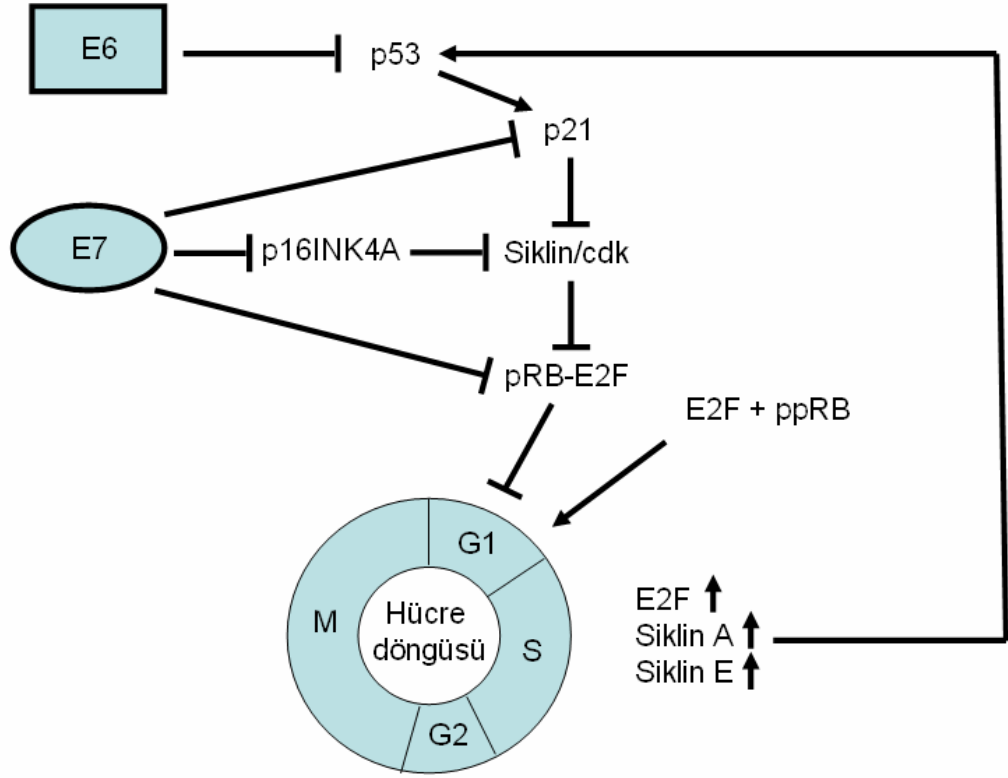
Şekil II.9'de, DNA hasarı oluştuktan sonra p53 aktivasyonu şematize edilmiştir.



Şekil II.9 DNA hasarı sonrasında P53 aktivasyonu

p53 tümör baskılayıcı gen tarafından aktive edilen p21, siklin genlerinin ve DNA-polimeraz alfanın negatif olarak regulasyonundan sorumludur. Bu yüzden artan p53 seviyesi hücre siklusunu G1 evresinde durdurur. Bu, hücrenin DNA hasarlarını S evresine geçmeden onarmasını sağlar<sup>14,47</sup>.

Şekil II.10'da, HPV E6 ve E7 proteinlerinin tümör baskılayıcı genler ve hücre döngüsü ile etkileşimi gösterilmiştir.



Şekil II.10 HPV E6 ve E7 proteinlerinin tümör baskılayıcı genler ve hücre döngüsü ile etkileşimi<sup>14, 45</sup>

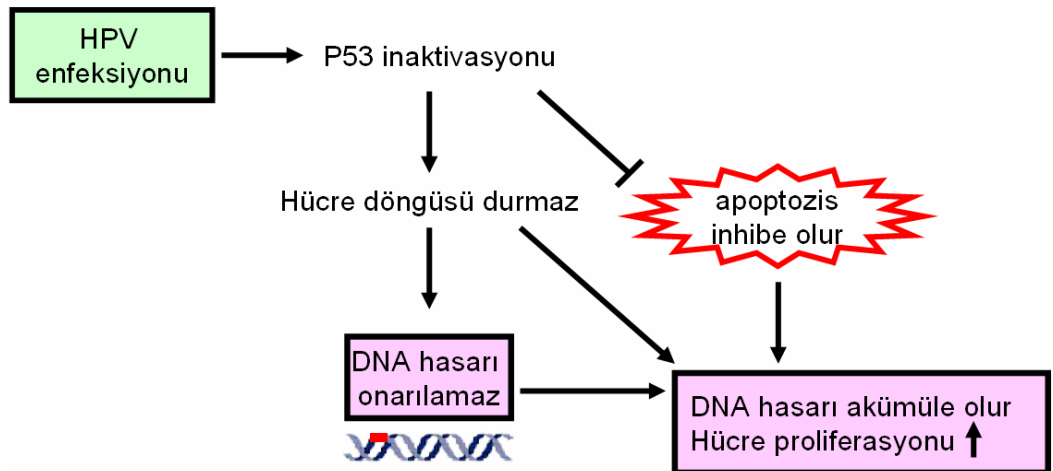
Normal hücrelerde pRB'nin büyüme inhibisyonu aktivitesi siklik fosforilasyon/defosforilasyon ile regüle edilir. G1'e spesifik hipofosforile form(pRB) G1-S



geçişini transkripsiyon faktörü olan E2F ile kompleks oluşturarak engeller ve bu kompleks transkripsiyonel baskılayıcı hale gelir. G1'in geç döneminde fosforilasyon ile oluşan hiperfosforile (ppRB) form E2F ile oluşturulan kompleksi parçalar. Böylece E2F transkripsiyonel aktivatör haline gelir. E2F'ye cevap veren hücresel genler S fazı için hız kısıtlayıcı olabilecek çok sayıda enzim içerirler. M fazının geç döneminde ppRB defosforile olur ve tekrar hipofosforile pRB'ye dönüşür. Bu form E2F ile transkripsiyonel baskılayıcı kompleksi tekrar oluşturur. Yüksek riskli HPV E7 proteinleri pRB ile etkileşerek proteolitik degradasyona sebep olur ve E2F'nin cdk aktivitesinden bağımsız olarak artmasını sağlar<sup>45</sup>.

Cdk (sikline bağlı kinaz) inhibitörü olan p16INK4A bir tümör baskılayıcı gendir. pRB'nin viral E7 onkogen proteini ile bloke olması nedeniyle p16INK4A'nın ekspresyonu artar ancak fonksiyonel olarak inaktiftir. Bu genin yüksek düzeydeki ekspresyonu HPV ile enfekte hücreler için spesifik bir biyogösterge olarak kullanılmaktadır<sup>2,48</sup>.

HPV enfeksiyonu sonucunda DNA hasarının akümüülasyonu Şekil II.11'de şematize edilmiştir.



**Şekil II.11** HPV enfeksiyonu sonucunda p53 inaktivasyonu ve DNA hasarının akümüasyonu

### II.3. Viral karsinogenezis ve Genotoksisite

1990'lı yıllardan sonra, virüslerin bazı kanser türlerinin gelişiminde anahtar rol oynadığı ve kanser araştırmalarında mutlaka dikkate alınmasının gerekliliği üzerinde durulmuştur<sup>49</sup>. Virüsler, konakçı hücre proliferasyonunu etkileyerek çok çeşitli mekanizmalarla tümör gelişimine katkıda bulunabilirler<sup>50</sup>.

Bugün insanlardaki tüm kanser türlerinin yaklaşık %20'sinin viral kökenli olduğu bilinmektedir. Zaman içinde viral karsinogenezisin daha iyi anlaşılması sonucu ve viral etkenlerle yeni kanser türleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi sonucu bu sayının artacağı düşünülmektedir<sup>1</sup>. Bununla birlikte, kanser gelişiminde sigaradan sonra en önlenbilir risk faktörü viral enfeksiyonlar olarak gösterilmekte ve viral karsinogenezisin üzerinde önemle durulmaktadır<sup>2</sup>.

Viral enfeksiyonlar virüse bağlı tümör oluşumuna göre çok daha yaygındır. Viral karsinogeneziste konakçıyla ilgili faktörler önemli rol oynar. Tümör oluşturma yeteneğine sahip virüsler genellikle konakçı hücrede kalıcı enfeksiyon oluştururlar ve bir virüs birden fazla tümör tipi ile ilişkili olabilir<sup>49</sup>.

Yaşam tarzı, coğrafi konum, sosyoekonomik durum ve çevresel faktörler viral enfeksiyonların yaygınlığı açısından önemlidir. Gelişmiş ve az gelişmiş ülkelerdeki

viral enfeksiyon sıklığı çok büyük farklılık göstermektedir. Bunların yanısıra bireysel duyarlılık ve immün mekanizmalar enfeksiyon sonrasında kanser gelişimini etkilemektedir<sup>2</sup>.

IARC bazı patojenleri kesinlikle karsinojenik (Grup 1) olarak sınıflandırmış (HPV 16 ve 18 gibi), bunun yanısıra içinde HPV 31,33 ve human herpes virüs 8'in de bulunduğu bir grup patojen de muhtemelen karsinojenik (Group 2) olarak sınıflandırmıştır. Viral ajanlarla yapılan çalışmalar sonucunda Grup 1'deki virüslerin sayısının zamanla daha da artacağı düşünülmektedir. Tablo II.4'te karsinojenik insan virüsleri sebep oldukları malign ve benign hastalıklarla birlikte gösterilmektedir<sup>2</sup>.

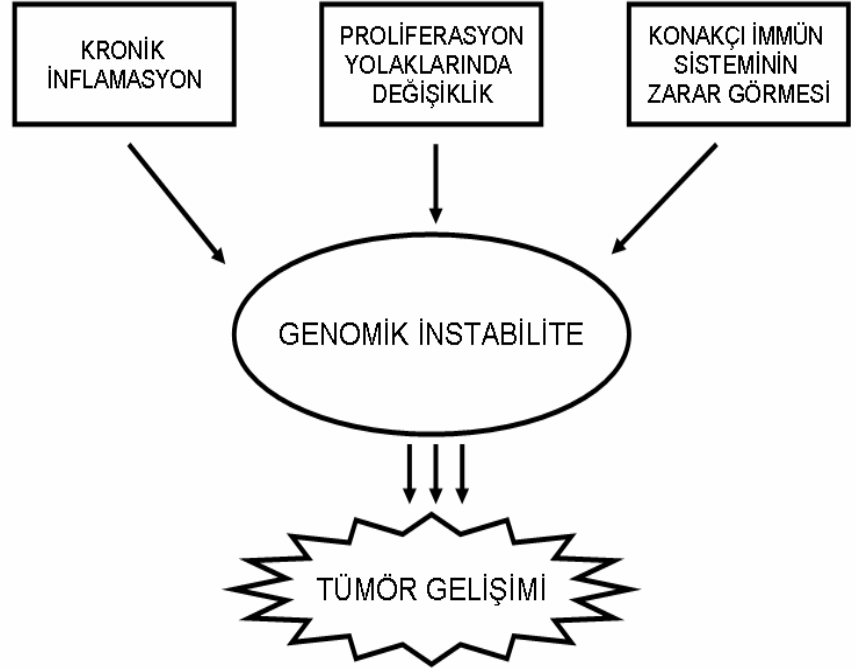
**Tablo II.4** Karsinojenik insan virüsleri<sup>2</sup>

<b>Virüs</b>	<b>Malign hastalıklar</b>	<b>Non-Malign hastalıklar</b>
HPV 16,18	<ul style="list-style-type: none"><li>• Servikal kanser</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Siğiller</li><li>• Kondilomalar</li></ul>
Epsteinbar virus (EBV)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nazofarinks kanseri</li><li>• Burkitt's lenfoma</li><li>• Hodgkin's lenfoma</li><li>• İmmünoblastik lenfoma</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Enfeksiyöz mononükleoz</li></ul>
Hepatit B virüsü (HBV)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Karaciğer kanseri</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hepatit</li><li>• Siroz</li></ul>
Hepatit C virüsü (HCV)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Karaciğer kanseri</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hepatit</li><li>• Siroz</li></ul>
Human immunodeficiency virus tip-1 (HIV-1)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kaposi sarkoma</li><li>• Lenfoma (B hücreli)</li><li>• AIDS ile bağlantılı diğer kanserler</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• AIDS</li></ul>
Human T-cell lymphotropic virus tip-1 (HTLV-1)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Yetişkinlerde lösemi (T hücreli)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• -</li></ul>

Onkojenik etki gösteren virüsler iki grup altında incelenebilir<sup>49,50</sup>.

1. Direkt onkojenik virüsler
2. Dolaylı olarak (İndirekt) onkojenik virüsler

HPV'nin de içinde olduğu bazı virüsler proliferasyon yolaklarını etkileyerek, tümör baskılayıcı genlerle etkileşerek (p53, Rb gibi) veya onkogenler aracılığıyla direkt olarak onkojenik etki gösterirler. Dolaylı olarak (İndirekt) onkojenik virüsler, primer olarak tümör geliştirmezen hücre veya dokunun tümör gelişimine hazırlanmasını sağlamak suretiyle başka onkojenik faktörlerin varlığında hücrenin tümör geliştirmesine neden olur. Buna en iyi örnek HIV virüsü ile birlikte gelişen immünosüpresyondur<sup>49,50</sup>. Şekil II.12'de viral etkene maruziyet sonrası malign farklılaşma gösterilmektedir.



**Şekil II.12** Viral etkene maruziyet sonrası malign farklılaşma<sup>2</sup>.

Virüslerin karsinogenezdeki rolünü açıklamak amacıyla birçok mekanizma önerülmüştür<sup>2, 51</sup>.

- kronik inflamasyon
- konakçı immün sisteminin zayıflaması
- proliferasyon/anti-proliferasyon yollarında değişiklik
- genomik instabilite

Genomik instabilite viral karsinogenezde kilit noktayı oluşturmaktadır. Genomik instabiliteyi arttıran herhangi bir etken karsinogenik süreci kolaylaştırır. Kromozomal değişiklikler genomik instabilitenin göstergesidir ve malign değişimlerle ilişkilidir. Kromozomal değişiklikler genotoksisite yöntemleri de dahil birçok yöntemle izlenebilir<sup>2, 52</sup>.

### **II.3.1 HPV ve Genotoksisite ilişkisi**

Genotoksik maruziyetler çok çeşitli yollarla gerçekleşir. Endojen veya ekzojen mutajenler, mesleki maruziyetler, diyet, yaşam tarzı, radyasyon ve medikal prosedürler genotoksik etkinin oluşmasına zemin hazırlayabilir. Spesifik ölçümlerle biyolojik sistem ile genotoksik ajanın etkileşimi maruziyet, etki ve duyarlılık biyogöstergeleri ile tanımlanır<sup>21</sup>.

HPV servikal karsinoma gelişiminde önemli rol oynamasına rağmen tek başına karsinogenezisi başlatma yeteneğine sahip değildir<sup>39</sup>. HPV enfeksiyonu serviks kanseri vakalarının ~%90'ından sorumludur ve HPV ile enfeksiyon sonucu gelişen serviks kanserinde de diğer birçok kanserde olduğu gibi duyarlılık faktörleri son derece önemlidir<sup>53</sup>.

Yüksek riskli HPV'lerle enfekte kadınların çok az bir kısmının servikal kanser geliştirmesi, yüksek riskli HPV'lerle ilişkili öncül lezyonların karsinojenik sürecinde başka genetik olayların da önemli olabileceğine dikkati çekmektedir<sup>16,54</sup>.

HPV ile enfeksiyonun, hücreler üzerindeki etkisi ile ilgili birçok çalışma olmasına karşılık, virüsün genotoksik etkisi ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır<sup>54</sup>.

### **Kromozomal instabilite:**

Kromozomal instabilite tüm kromozomda ya da kromozomun bir parçasında normal hücrelere göre yüksek oranda katılım veya kayıp oluşmasıdır. Kromozomal instabilite kanser hücrelerinin yaygın bir özelliğidir ve birçok hücresel mekanizma kanser hücrelerinde sayısal ve yapısal kromozomal instabiliteye neden olur. Uzun yıllar kromozomal instabilitenin kromozom kırıkları ile sınırlı olduğu düşünülmüştür. Son yıllarda DNA hasarına karşı geliştirilen birçok mekanizmadaki problemin kromozomal instabiliteyle ilişkili olabileceği üzerinde durulmaktadır. DNA hasarına cevapta oluşan hatalar ve DNA onarım mekanizmalarındaki bozukluklar neoplastik transformasyona yol açabilecek genetik değişikliklere ve kromozomal instabiliteye sebep olabilir<sup>52</sup>.

Onkojenik HPV tipleri birçok mekanizmayla kromozomal instabiliteye neden olur<sup>55</sup>. HPV, kromozomların ayrılması sırasında, DNA hasarına hücrenin cevabında ve kontrol noktası regülasyonunda değişiklikler oluşturarak kromozomal instabiliteye neden olur<sup>52</sup>.

HPV onkoproteinlerini eksprese eden hücrelerin DNA hasarını onarmada yetersiz olduğu, bunu da büyük olasılıkla tümör baskılayıcı genleri etkileyerek gerçekleştirdiği düşünülmektedir<sup>52</sup>.

Genomik instabilite gelişimi HPV-ilişkili karsinogeneziste erken evrelerde gerçekleşen çok önemli bir olaydır. Birçok kanserde olduğu gibi servikal kanserde veya yüksek riskli HPV'lerle ölümsüzleştirilmiş hücrelerde kromozomal değişiklikler oldukça kompleksir<sup>55</sup>. Kromozomal instabilite erken dönemde intraepitel öncül lezyonlarda oluşur ve karsinogenik süreç ile artar. Genel olarak HPV'nin sebep olduğu kromozomal instabilite sayısal ve yapısal kromozomal aberasyonları içerir<sup>16</sup>.

Yüksek riskli HPV'lerin E6 ve E7 onkoproteinleri hücresel büyüme kontrolünde kritik göreve sahip tümör supresörlerin işaretlediği yolları hedefler<sup>55</sup>. Yüksek riskli HPV E6-E7 eksprese eden hücre toplulukları kromozomal instabilite gelişimine yatkındır. HPV onkoproteinlerinin ekspresyonu neoplastik sürecin erken dönemlerinde daha çok sayısal ve yapısal aberasyonları indükleyerek hücresel genomda destabilizasyona neden olurlar<sup>16</sup>.

HPV enfeksiyonunda genomik instabiliteye sebep olabilecek bir kısmı hücre bölünme sürecindeki bozukluklarla alakalı bir kısmı da henüz aydınlatılmamış birçok farklı mekanizma söz konusudur<sup>16</sup>.

### **Sayısal kromozomal hasarları:**

Sayısal kromozomal değişiklikler tüm kromozomun ilavesi veya kaybı olarak tanımlanır ve insan genomunda bildirilmiş en yaygın genomik instabilitedir<sup>16</sup>.

HPV kaynaklı sayısal kromozomal dengesizlikler ve yapısal kromozom hasarları enfeksiyonla birlikte yaygın olarak gözlene de moleküler detaylar henüz aydınlatılmamıştır<sup>55</sup>.

İnsan keratinositlerinde yüksek riskli HPV 16 enfeksiyonu ile sayısal kromozomal değişiklikler oluşuyorken düşük riskli HPV'lerle enfeksiyonda bu etki gözlenmez<sup>56</sup>. Yüksek riskli HPV'lerle enfeksiyon sonucunda bazı kromozomların kopya sayılarında değişiklikler olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiş ancak bu değişikliklerin farklı HPV tipleriyle ilişkisi bulunamamıştır<sup>57,58</sup>. Örneğin, kromozom 13'ün kaybı ya da redüksiyonu söz konusu iken, kromozom 1, 3 ve 20'nin kopya sayısının arttığı belirtilmiştir<sup>58,59</sup>.

Giannoudis ve arkadaşları, düşük riskli HPV tipleri ile enfekte lezyonlarda tetrazomiye rastlamamış, buna karşılık olası yüksek riskli ve yüksek riskli HPV tipleri ile enfeksiyon sonucu değişen p53 ekspresyonunun tetrazomi ile ilişkisi olduğunu belirtmişlerdir<sup>56</sup>.

### **Yapısal kromozomal hasarlar:**

Yapısal kromozomal abnormaliteler çok farklı tiplerdeki kromozomal aberasyonları içerir. Yapısal kromozomal aberasyonlar tümör hücrelerinde genellikle sayısal aberasyonlarla beraber bulunur. Yapısal kromozomal değişiklikler tümör baskılayıcı genlerde amplifikasyonlara veya delesyonlara sebep olabilir. Kromozomal değişikliklerin telomeraz aktivitesini de etkilediği bildirilmiştir<sup>16</sup>.

Yapısal kromozomal değişiklikler, HPV E6 onkoproteini ve hücre döngüsü kontrol noktası problemleri ile ilişkilidir<sup>60</sup>. HPV ile enfekte epitel hücrelerinde yapılmış sitogenetik çalışmalar yapısal değişikliklerin daha çok 1, 3 ve 5. kromozomlarda olduğu buna karşılık 7, 8, 12, 13, 16 ve 22. kromozomlarda daha az sıklıkta aberasyonlara rastlandığı belirtilmiştir<sup>61</sup>.



Çeşitli çalışmalarda servikal kanser vakalarında komozomal abnormaliteler tespit edilmiştir. En sık rapor edilen kromozom 3p'de yapısal kromozomal aberasyonlardır. Servikal kanser vakalarının %70'inde bu bölgede yapısal kromozomal aberasyonlar rapor edilmiştir. Daha spesifik olarak bu bölge "3p14-25" olarak tanımlanmıştır. Bu bölgedeki yapısal kromozomal aberasyonlara servikal kanser öncül lezyonlarının %30-57'sinde rastlanmıştır ve karsinojenizde erken dönemi yansıttığı düşünülmektedir. Kromozom 3'ün bu bölgesinde oluşan abnormaliteden hangi genlerin etkilendiği ile ilgili birçok teori üretilse de bu bölgedeki genlerin servikal karsinojenizisteki rolü henüz aydınlatılamamıştır<sup>39</sup>.

Kromozom 3 kadar yaygın olmasa da kromozom 6,11,13,16,19'da da yapısal kromozomal aberasyonlar tespit edilmiştir<sup>39</sup>. Heselmeyer ve arkadaşları servikal kanserde kromozom 3p ve 11 q'dan farklı olarak 13q ve 17p'de de yapısal aberasyon tespit etmişler ve kromozomların bu bölgelerinin sırasıyla retinoblastoma (RB) ve p53 tümör baskılayıcı genler ile bağlantılı olduğunu belirtmişlerdir<sup>54</sup>.

Erken dönem servikal neoplazilerde yapısal kromozom abnormaliteleri ayrıntılı olarak bilinmese de, ileri dönemlerde anöploidi ile birlikte kromozom 1 ve 3'te yapısal aberasyonlar tespit edilmiştir<sup>16</sup>. Bununla birlikte kromozom 3q 'daki yapısal aberasyonların preinvaziv hastalığın invaziv aşamaya geçiş süreciyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir<sup>16,54</sup>. Kromozom 3q 'daki yapısal aberasyonlar preinvaziv lezyonlarda gözlenirken kromozom 1q ve 5p'deki yapısal aberasyonlar ileri dönem servikal kanserlerde yaygın olarak gözlenmektedir<sup>62</sup>.

Yapılan çalışmalar sonucunda erken dönem lezyonlarda ve invaziv servikal karsinomda farklı yapısal kromozomal aberasyonlar gözlendiği, hastalığın farklı evrelerinde farklı kromozomların etkilendiği belirtilmiştir<sup>62</sup>.

### **Sentrozomal hasarlar:**

Düensing ve Munger, onkojenik özelliğe sahip yüksek riskli HPV E6-E7 eksprese eden hücrelerde sentrozom abnormalitelerinin arttığını belirtmiştir<sup>16</sup>. Sırasıyla, E7 ve E6 onkoproteinleri abnormal sentrozom sentezinden ve nükleer abnormalitelerin akümülyasyonundan sorumludur<sup>63,64</sup>. HPV 16 ile enfekte servikal lezyonlarda abnormal sentrozom sayıları sırasıyla normal serviks, CIN I, CIN II, CIN III ve serviks kanserinde artan oranlarda tespit edilmiştir<sup>65</sup>.

## **II.4.Serviks kanseri**

### **II.4.1. Serviks kanserinin gelişimi**

Servikal kanser, serviks epitelinin hasar gördüğü yavaş ilerleyen malign özellikli neoplastik bir hastalıktır ve sitopatolojik tanıda servikal intraepitel neoplazi (CIN) veya skuamöz intraepitel lezyon (SIL) olarak bilinmektedir<sup>66</sup>.

Displastik lezyonların sınıflandırılması servikal kanser gelişiminde oldukça önemlidir. Çeşitli kaynaklar farklı yöntemler önermektedir. 1940'larda servikal abnormaliteler hafif, orta ve şiddetli displazi, karsinoma in situ ve kanser olmak üzere I'den V'e kadar numaralandırılmaktaydı. 1960'ların sonundan itibaren yeni bir sınıflandırmayla hücreyel değişiklikler servikal intraepitel neoplazi (CIN) olarak adlandırılmış ve I, II, III olarak derecelendirilmiştir. Hastalığın gelişiminin ise CIN I'den karsinoma in situya doğru sırayla gerçekleştiği düşünölmekteydi. Servikal displazi yıllar içinde daha çok anlaşıldıkça böyle bir ilerleme kaydetmediği göröldü. CIN I vakalarının ancak %1'i invaziv karsinomaya dönüşmektedir. CIN I'in CIN II'ye dönüşümü çok çabuk oluşur ve CIN II vakalarının %5'i invaziv karsinomaya dönüşmektedir. CIN III vakaları ise tedavi edilmezse %12'den fazla invaziv karsinomaya dönüşme riski vardır. CIN II ve CIN

III temel olarak aynı şekilde tedavi edilir. Bu sınıflandırma klinikte çoğu zaman daha açıklayıcı bilgilerle birlikte kullanılmaktadır. 1991 yılı itibarıyla "Bethesda Sistemi" kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistem; önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücreler (ASCUS), düşük dereceli skuamöz intraepitel lezyonlar (LSIL), yüksek dereceli skuamöz intraepitel lezyonlar (HSIL) ve karsinoma insitu olarak vakaları değerlendirir<sup>12,66</sup>.

Düşük dereceli SIL (LSIL) (CIN I'e karşılık gelir) ve yüksek dereceli SIL (HSIL, CIN II ve CIN III'e karşılık gelir) genellikle asemptomatiktir ve sitolojik testlerle (Pap test gibi) tespit edilebilir. Bu teşhis kolposkopik tetkikle ve biyopsi ile desteklenir. Eğer LSIL tedavi edilmezse HSIL'ye dönüşebilir ve sonrasında servikal epitelde kalınlaşmaya sebep olur ki bu durum servikal karsinoma in-situ diye adlandırılır. Daha sonra bu hastalık invaziv hale dönüşebilir. Bu süreç 10 yıl bazen de daha uzun sürebilir. İnvaziv lezyon pelvik bölgeye, uzaktaki lenf nodlarına ve vücudun diğer bölgelerine metastaz yapabilir. İnvaziv servikal kanser birçok kadında çoğu zaman ilişki sonrası kanama, tekrarlayan mesane enfeksiyonları, servikte ülserasyon ve kalıcı ağrı ile kendini belli eder. Lenf nodlarındaki metastaz hastalığın semptomlarının çok daha kötüleşmesine ve hayati riskin oluşmasına sebep olur<sup>66</sup>.

Histolojik olarak iki tip invaziv kanser sözkonusudur; bunlar skuamöz hücre karsinoma ve adenokarsinomadır<sup>66</sup>. Dünya genelinde servikal kanserin en yaygın tipi skuamöz hücre karsinomadır. Her iki servikal kanser tipinin de HPV ile enfeksiyon sonucunda oluştuğu bilinmektedir<sup>67</sup>.

Servikal karsinomaların büyük çoğunluğunu skuamöz hücre karsinoması oluşturur (%85-90), bununla birlikte adenokarsinoma sıklığı %10-15 arasında sıklık gösterir<sup>68</sup>.

Skvamöz ve adenokarsinomada birçok özellik benzerdir ancak 4 temel özellik epidemiolojik olarak ve hastalıktan korunma açısından farklılık yaratır<sup>66</sup>:

1. Son yıllarda adenokarsinoma insidansı skuamöz karsinomaların aksine birçok gelişmiş ülkede artmıştır

2. HPV 16 skuamöz karsinomada en sık rastlanan HPV tipidir. HPV 18 ise adenokarsinomada en sık rastlanan tiptir.

3. Artan doğum sayısı artan skuamöz karsinoma riski ile ilişkiliyken adenokarsinoma ile ilişkili değildir.

4. Pap sitolojik testi adenokarsinomaı tespit etmekte skuamöz karsinoma kadar etkili değildir.

#### **II.4.2 Servikal kanser sıklığı**

Dünya genelinde servikal kanser kadınlarda meme kanserinden sonra hastalık ve ölüm sıklığı incelendiğinde en yaygın malignansidir. Yaş standardizasyonu yapıldıktan sonra gelişmiş ülkelerde insidansın 10/100,000 olduğu gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerde ise insidansın 40-100/100,000'e kadar yükseldiği bilinmektedir<sup>9</sup>. Dünyada %80'i ekonomik olarak gelişmemiş ülkelere olmak kaydıyla her yıl tahminen serviks kanseri kaynaklı 471 000 yeni vaka ve 233 000 ölüm rapor edilmektedir<sup>70</sup>. Tarama programlarının varlığına karşılık Avrupa birliğinde her yıl yaklaşık 10,000'in üzerinde ölümün servikal kanserlerle ilişkili olduğu bilinmektedir, taramanın daha az olduğu veya hiç olmadığı ülkelere ise kanserlerle ilişkili ölümlerin en yaygın nedeni olarak servikal kanser gösterilmektedir<sup>44</sup>.

Servikal kanser dünya genelinde yeni kanser vakalarının yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır<sup>10</sup>. Sadece 2002 yılında yaklaşık 500,000 kadına invaziv servikal kanser (ICC) tanısı konmuş ve bu hastaların yaklaşık yarısı ölmüştür. Endüstriyel olarak gelişmiş ülkelere daha az gelişmiş ülkelere göre daha az ICC ve ölüm vakasına rastlanmaktadır. Dünya genelinde 2002 yılında gelişmiş ülkelere her 100,000 kadında

10.3 ICC vakası ve 4.0 ölüm rapor edilmiştir. Bununla kıyaslamalı olarak 2002 yılında ABD'de her 100,000 kadından 7,7 yeni ICC vakası ve bunlardan sadece 2,3'ünün bu hastalıktan öldüğü bildirilmiştir<sup>8</sup>.

En yüksek insidans Latin Amerika-Karayipler (latin amerika'da en yüksek insidans 38.3/100,000 ile Venezuela'da görülmektedir), sub-Saharan Afrika ve güney/güneydoğu asyada tespit edilmektedir. Bu bölgelerde yeni servikal kanser tanısı tüm dünyanın %22'sini oluşturmaktadır ve yaşın standardize edildiği insidans 31/100,000'dir<sup>70,71</sup>.

#### **II.4.3 Servikal kanserde rol alan risk faktörleri**

HPV neredeyse tüm servikal kanser vakalarında tespit edilmesine karşılık tek başına CIN veya servikal kanser gelişimi için yeterli değildir. Kanserin çok evreli ve çok etmenli özelliği dikkate alınırsa CIN ve servikal kanser gelişiminde başka faktörlerin varlığından da söz edilebilir<sup>72</sup>. Servikal kanserle ilişkili risk faktörleri Tablo II.5'te gösterilmiştir.

**Tablo II.5** Servikal kanser ile ilişkili risk faktörleri<sup>12</sup>

##### Servikal kanser ile ilişkili risk faktörleri

- HPV enfeksiyonu
- Artan partner sayısı
- Artan ilişki sayısı
- Erken ilk ilişki yaşı
- Partnerin seksüel yaşam tarzı
- Sigara
- Oral kontraseptif kullanımı

- Diğer cinsel yolla bulaşan hastalıklar
- Yüksek sayıda doğum yapmak
- Yetersiz beslenme
- İmmunosüpresyon

HPV enfeksiyonlarının bir kısmı sonradan karsinoma insitu'ya dönüşebilecek olan displastik hücre popülasyonlarının oluşmasına sebep olur. Bu hücre popülasyonlar servikal intraepitel neoplazi (CIN) diye adlandırılır<sup>73</sup>. Günümüzde servikal karsinoma insitu lokal olarak tedavi edilebilmekte, ancak çeşitli sebepler nedeniyle başarısız olunan vakalar veya tedavi edilmemiş lezyonlar invaziv servikal kansere dönüşmektedir<sup>74</sup>.

HPV'den farklı olarak servikal kanserde önemli risk faktörleri şöyle sıralanabilir:

**1. Seksüel yaşam tarzıyla ilişkili faktörler:** Yaklaşık 30 yıldan uzun süredir epidemiyolojik çalışmalar servikal kanser ile seksüel aktivite arasındaki bağlantıya dikkati çekmektedir<sup>75</sup>. Genital HPV enfeksiyonunun primer olarak seksüel temasa bulaştığı düşünülürse hastalığın kazanılmasında etkili olan faktörler diğer pek çok cinsel yolla bulaşan hastalıkla benzerlik gösterir<sup>5</sup>.

Seksüel aktivite HPV ile enfeksiyonda bilinen en önemli risk faktörüdür. Yaşamboyu seksüel partner sayısı ve HPV pozitifliği arasındaki ilişki birçok çalışmayla kanıtlanmıştır<sup>76</sup>. Cinsel aktivasyondan sonra enfeksiyon insidansı keskin bir şekilde artış gösterir ve yaşam boyu edinilen partner sayısı ile partnerin seksüel yaşam tarzı en önemli

parametre halini alır<sup>32</sup>. HPV enfeksiyonunun kişiden kişiye geçişinin primer yolunun cinsel ilişki olduğu bilinmesine karşılık enfeksiyon oranları ve risk faktörleri tam olarak bilinmemektedir<sup>32</sup>. Ancak ender olarak genital HPV tipleri seksüel olarak aktif olmayan kadınlarda veya çocuklarda da tespit edilmiştir<sup>77</sup>.

Erkeklerde penil HPV prevalansı kadınlardaki enfeksiyon özelliklerine benzerlik gösterir ve yaşamboyu seksüel partner sayısı, ilk cinsel ilişki yaşı, çokeşlilik gibi parametreler erkekler için de kadınlarla aynı oranda önemlidir<sup>78,79</sup>.

Virüsün organik solvanlara ve ısıya dayanıklı yapısı HPV ile çevresel kontaminasyonun araştırılmasına sebep olmuştur. Sonuçlar enfeksiyonun sadece cinsel ilişki ile bulaşmadığına ve çevresel kontaminasyonun da bireyin gerek düşük, gerekse yüksek riskli HPV tipleri ile karşılaşmasında önemli bir etken olabileceğine dikkati çekmiştir<sup>7</sup>.

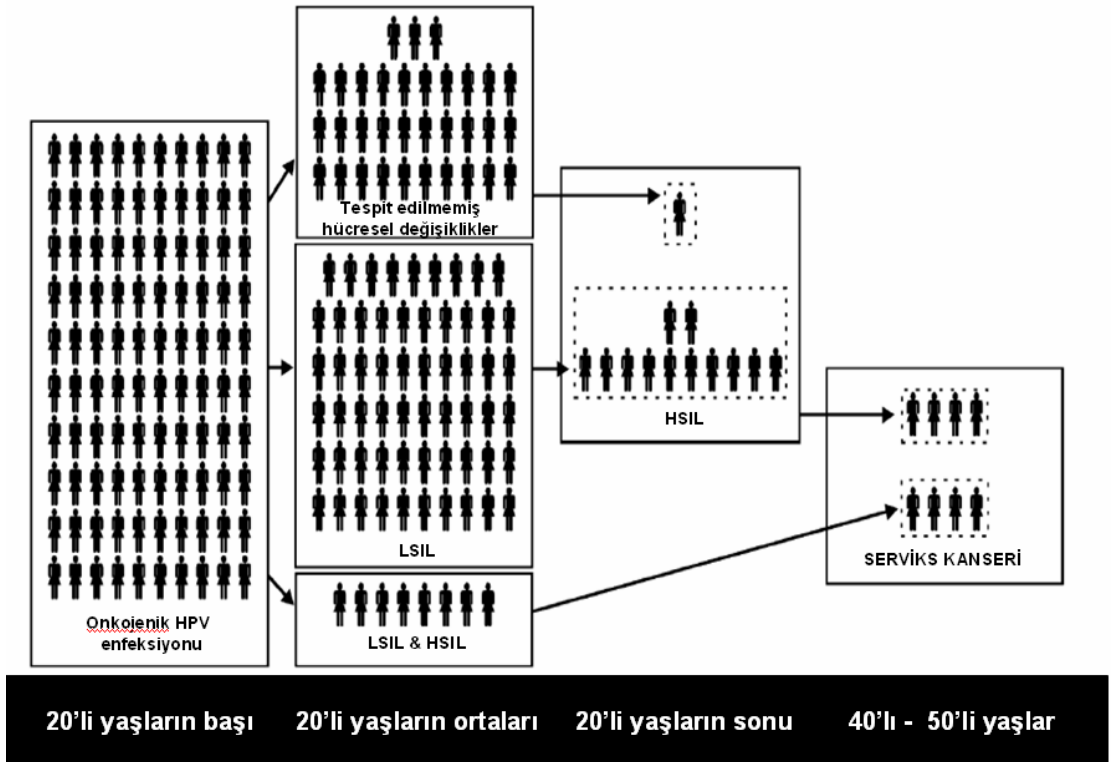
**2. Yaş:** Bireyin HPV ile karşılaşması genellikle seksüel aktif hale gelmesiyle gerçekleşir. HPV enfeksiyonu seksüel olarak aktif ergenlik dönemindeki gençlerde oldukça yaygındır ve insidans 40'lı yaşlarla birlikte düşmeye başlar. HPV enfeksiyonu sıklığı yaşın artmasıyla azalmaktadır. En yüksek HPV insidansı 15-19 yaş arasında görülmekte fakat yaşın ilerlemesiyle insidans düşmektedir. HPV enfeksiyon oranındaki bu azalmanın enfeksiyonun doğasından (zaman içinde enfeksiyonunun kendi kendine kaybolmasından), azalan HPV ile karşılaşma olasılığından veya yeniden enfeksiyona direnç oluşmasından kaynaklanmaktadır<sup>4,27,33</sup>. İlerleyen yaşlardaki HPV enfeksiyonuna karşı azalan riskin büyük oranda maruziyetlerden sonra kazanılmış bağışıklıkla da açıklanabileceği düşünülmektedir<sup>80</sup>.

Servikal kanser için yaş ortalaması 52 olarak belirlenmiştir, fakat hastalık 35-39 ve 60-64 yaşları arasında insidans pik yapar<sup>69</sup>. Bazı populasyon tabanlı veriler,

50'li yaşların ortaları itibariyle HPV enfeksiyonunun tekrar yükselişe geçtiğini ve bu bireylerde yüksek riskli HPV tiplerinin yaygın olmasına karşılık düşük riskli tiplerin de tespit edildiğini göstermişlerdir. Bu tür çalışmaların belirli etnik gruplarda gerçekleştirilmesi ve farklı coğrafi bölgelerde farklı HPV tipleri ile enfeksiyonun söz konusu olması nedeniyle tüm dünya için bir genelleme yapılması doğru değildir<sup>8,81</sup>.

İnvaziv servikal kanser 30 yaşından genç kadınlarda nadiren gözlenmekle birlikte HPV enfeksiyonunun aksine servikal kanser vakaları ilerleyen yaşla birlikte artış göstermektedir<sup>73</sup>.

Serviks kanseri öncül lezyonları ve serviks kanseri gelişimi değişen yaş gruplarında Şekil II.13'de gösterilmiştir.





**Şekil II.13** Yaşa bağlı serviks kanseri gelişimi<sup>31</sup>

**3. Sigara içme alışkanlığı:** Gelişmiş ülkelerde yaşayan kadınların yaklaşık %22'si gelişmekte olan ülkelerde ise %9'u sigara içmektedir. Ancak gelişmekte olan ülkelerde yaşayan kadın nüfusunun gelişmiş ülkelere yaşayanlara oranla çok daha yüksek olduğu göz önünde bulundurulduğunda; dünya genelinde sigara içen kadın nüfusunun büyük kısmı gelişmekte olan ülkelere yaşamaktadır. Sigaranın zararlı etkilerine karşı kadınları bilgilendirip etkili ve kapsamlı kampanyalar düzenlenmediği sürece bu değer 2025 yılında %20 artacağı hesaplanmıştır<sup>82</sup>.

Sigara kanser gelişiminde oldukça önemli role sahiptir. Birçok kanser türü için zemin hazırlamanın yanı sıra, alt genital sistem neoplazilerinde de önemli kofaktörlerden biri olarak dikkati çeker<sup>83</sup>. Sigaranın servikal kanser için bir risk faktörü olduğu hipotezi ilk defa 1977 yılında Winkelstein tarafından önerülmüştür<sup>84</sup>.

Servikal kanserin mekanizmasını tam olarak aydınlatmak amacıyla sigaranın HPV kaynaklı displazilerle ilişkisi kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bunun sonucunda IARC sigarayı servikal kanser etkeni olarak sınıflandırmıştır<sup>85</sup>.

Sigara birçok farklı yolak yardımı ile kansere neden olur. Sigaranın yan ürünlerinin inflamasyon ve immün sistemle ilişkili olduğu ve apoptotik yolları bozduğu, bununla birlikte sigaranın stabil DNA katım ürünleri oluşturduğu, oluşan katım ürünlerinin de genetik instabiliteyi indükleyebileceği rapor edilmiştir<sup>8</sup>.

Sigara ile servikal kanser arasındaki ilişkiyi açıklamak için birçok risk faktörünü de gözönünde bulundurup, bunları da değerlendirme içine almak gerekir<sup>84</sup>.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar sigaranın abnormal servikal sitolojiler, CIN ve servikal kanserle ilişkili olduğunu göstermesine rağmen, mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır<sup>8,80,86</sup>.

Sigaranın servikal kanser üzerine etkisi düşünüldüğünde olası 3 mekanizma sözkonusudur<sup>28,84,88</sup>:

1. Serviksteği immün cevabın azaltılması
2. Kadınlık hormonları ile ilişkili etkiler
3. Sigara karsinojenlerinin oluşturduğu direkt genetik hasar

Sood, 1977-1990 yılları arasında yapılmış olan vaka-kontrol çalışmalarını toplamış ve büyük çoğunluğunun sigara ile serviks kanseri arasındaki pozitif ilişkiyi gösterdiğine dikkati çekmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen veriler, yaş ve seksüel partner sayısı kontrol altına alındığı zaman sigara içenlerde serviks kanseri sıklığı %42-46 artış göstermiştir<sup>89</sup>.

Plummer ve arkadaşları IARC çok merkezli vaka-kontrol çalışmasında HPV ile enfeksiyonun sigara içen bireylerde çok daha fazla servikal kanser riski oluşturduğuna dikkati çekmişler ve adenokarsinoma için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmasına karşılık skuamöz servikal kanserin sigara ile ilişkili kanserler arasında eklenmesi gerektiğini belirtmişlerdir<sup>84</sup>.

Düşük dereceli CIN teşhisi konmuş 82 kadın üzerinde yapılmış çalışmada sigarayı bırakmanın (en az 6 ay önce) ve %75'ten fazla azaltmanın bireylerin lezyon bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı bir küçülmeye sebep olduğu, ancak sigarayı azaltmanın hastalığın derecesini değıştirmedığı belirlenmiştir<sup>90</sup>.

Sigara HPV pozitif bireylerde servikal kanser gelişimi için çok önemli bir risk faktörüdür. Bu nedenle, HPV enfeksiyonu gerçekleşikten sonra servikal kanser gelişim sürecinde sigara çok önemli bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. HPV enfeksiyonunun yaygınlığı da düşünüldüğünde özellikle sigara içen kadınların yaşam tarzlarını servikal kanserden korunmaya yönelik düzenlemeleri ve rutin izleme programlarına katılmaları önerilmektedir<sup>84</sup>.

**4. Oral kontraseptif kullanımı:** Oral kontraseptif kullanımı invaziv over ve endometrium kanserine karşı koruyucuken karaciğer, meme ve serviks kanseri için riski arttırdığı düşünülmektedir. IARC'nin çok merkezli çalışmasına göre oral kontraseptif kullanımı kullanım süresine bağlı olarak servikal kanser riskinin arttırmaktadır. 5 yıla kadar oral kontraseptif kullanımı servikal kanser riski ile ilişkili bulunmazken 5-9 yıl kullanımda risk 2,7 kat artmakta, 10 yıl ve daha uzun süre kullanımda ise servikal kanser riski 4,48 kat yükselmektedir. Veriler oral kontraseptif kullanımının kesilmesinden sonra bu riskin düştüğüne dikkati çekmektedirler<sup>83,91</sup>.

HPV ile enfeksiyon sonrasında kalıcı enfeksiyon gelişmesinde ve HPV enfeksiyonundan servikal kansere doğru ilerleme sürecinde oral kontraseptif kullanımının tam olarak hangi mekanizmaları etkilediği henüz bilinmemektedir<sup>4</sup>. Özellikle yüksek riskli HPV tipleri ile enfeksiyonun oral kontraseptif kullanımı ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Ancak cinsel yaşamla ilgili diğer risk faktörlerinin yoğunluğundan dolayı bu ilişkinin kesinliğinden söz edilememektedir. Yine de oral kontraseptif kullanımında fiziksel bariyer yöntemlerinin kullanılmamasının çokeşli cinsel yaşamda HPV enfeksiyon riskini arttırdığı dolayısıyla serviks kanseri riskinin de arttığı düşünülmektedir<sup>31</sup>.

Östrojen veya progesteronların servikste HPV gen ekspresyonunu dolaylı yoldan artırması sonucu hormonal kontraseptiflerin CIN 3'te ve servikal kanserde

kofaktör olarak rol aldığı düşünülmektedir<sup>28,92</sup>. HPV enfeksiyonu 1960'lı yıllardan itibaren bariyer yöntemlerine oral kontraseptif kullanımının tercih edilmesiyle artış göstermiştir<sup>12</sup>.

**5. Cinsel yolla bulaşan diğer hastalıklar:** Cinsel yolla bulaşan diğer hastalıkların servikal kanser patogenezisindeki rolüne bir çok epidemiyolojik çalışma dikkat çekmiştir. Herpes Simplex Virus-2, Chlamydia trachomatis ve HIV enfeksiyonu servikal kanserle ilişkili olduğu düşünülen cinsel yolla bulaşan hastalıklardır<sup>11</sup>. HSV-2 ve Chlamydia trachomatis enfeksiyonları HPV enfeksiyonlarının yanında kofaktör olarak servikal kanser riskini arttırmaktadır<sup>93,94</sup>. Bu enfeksiyonlara bağlı artan kanser riski enfeksiyon sonrası olduğu düşünülen genetik instabiliteyle ilişkilendirilmiştir<sup>28</sup>.

HIV-pozitif kadınların servikal kansere yakalanma riski HIV-negatif kadınlara göre daha yüksektir. Hem HPV hem de HIV ile enfekte olan kadınların servikal kansere yakalanma riski ise her iki virüse de ayrı ayrı yakalanan kadınlarınkine göre daha yüksektir. Bu durumda HIV pozitif kadınların baskılanmış immün sisteminin etkisi büyüktür<sup>28,95</sup>.

Çeşitli çalışmalar yüksek veya düşük riskli HPV virüslerinin risk faktörleri açısından farklılık göstermediğini belirtir. Geçirilmekte olan HPV enfeksiyonunun bazı farklı HPV tipleri için de risk faktörü oluşturduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, halihazırda yüksek riskli HPV enfeksiyonu olan bir kişinin yeni bir enfeksiyon kapma riskinin daha fazla olabileceğine dikkat çekilir<sup>96</sup>.

**6. Yüksek doğum sayısı:** IARC'nin çok merkezli çalışmasında 7 ve daha fazla tam zamanlı hamilelik geçiren HPV pozitif kadınların benzer koşullardaki hiç hamilelik yaşamamış kadınlara göre 3-6 kat daha fazla servikal kanser riski altında oldukları belirtilmiştir. Ayrıca yaşamları boyunca bir yada iki defa tam zamanlı hamilelik

yaşamış HPV pozitif kadınların da benzer koşullardaki hiç hamilelik yaşamamış kadınlara göre 2 kat daha fazla risk taşıdıkları belirtilmiştir<sup>11,28</sup>.

Son hamilelik yaşının yüksek olması da servikal kanser riskini yükseltmektedir<sup>83</sup>. Doğumun servikal kanser riskini hormonal faktörlerin varlığının yanısıra ekzoserviks üzerindeki transformasyon bölgesinin HPV enfeksiyonuna açık olmasıyla da arttırdığı düşünülmektedir<sup>28</sup>.

**7. Beslenme:** Son 20 yıldır çalışmalar serviks kanseri gelişiminde beslenmeyle ilgili faktörlere dikkati çekmektedir. Servikal kanser gelişimi birçok biyolojik mekanizma ile gerçekleşir ve beslenme değiştirilebilir bir risk faktörü olarak serviks kanseri gelişiminde önem kazanır<sup>97</sup>. Bazı antioksidan gıdaların servikal karsinogeneziste koruyucu rol oynayabileceği düşünülmekle birlikte, diyet ve beslenmenin servikal karsinogenezisteki rolü henüz kesin olarak belirlenememiştir<sup>28,98</sup>.

Bazı çalışmalar HPV varlığında meyve, sebze, E ve C vitaminleri, alfa-karoten, likopen, lutein/zeaksantin ve kriptoksantin ile zengin beslenmenin “olası” koruyucu etkisi üzerinde durmaktadır<sup>99</sup>.

#### **- Karotenoidler**

Bitkisel besinlerde bulunan, hayvanlar tarafından sentezlenmeyen pigmentlerdir. Karotenoidlerin düşük düzeyde alımı veya düşük serum konsantrasyonu servikal kanser riskini arttırmakta ve düşük kan düzeyi kalıcı servikal HPV enfeksiyonunda artan riskle açıklanmaktadır<sup>97</sup>.

#### **- Vitamin C**

Karotenoid alımına benzer olarak birçok epidemiyolojik çalışma vitamin C alımı ile serviks kanseri riski arasındaki ters ilişkiye dikkati çekmektedir. Vitamin C'nin

koruyucu etkisini açıklayabilecek birçok olası mekanizma önesürülmesine rağmen bunları kanıtlayacak laboratuvar sonuçları henüz eksiktir. En önemli olası mekanizmalar; vitamin C'nin antioksidan özelliği ile DNA'yı koruması, immün sistem düzenleyicileri ile etkileşerek immün sistemi harekete geçirmesi, yine servikal kansere karşı koruyucu etkisi olabileceği düşünülen folat stabilitesini ve kullanılabilirliğini arttırmasıdır<sup>97</sup>.

#### **- Vitamin E**

Epidemiyolojik çalışmalara göre vitamin E ile servikal kanser arasındaki ilişki karotenoid ve vitamin C kadar tutarlı değildir. Vitamin E 'nin olası koruyucu özelliğinin antioksidan özelliği ile bağlantılı olabileceği ve bu sayede hücrel immün cevabın, fagosit türevi fonksiyonların artacağı düşünülmektedir<sup>97</sup>.

Bunların yanısıra, Vitamin E ve C alımı diğer risk faktörleri (örn: sigara gibi) tarafından oluşan DNA katım ürünlerinin oluşumunu inhibe ederek servikal karsinogenezis için koruyucu rol oynar<sup>99</sup>.

Obezite ile çeşitli jinekolojik kanserler arasında güçlü bir ilişki vardır. Benzer şekilde vücut-kitle indeksi (BMI) 35'in üzerinde olan kadınların servikal kanser riskinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir<sup>83</sup>. Obezite adenokarsinoma için bir risk faktörü olarak tanımlanırken skuamöz hücre karsinoma ile ilişkisi belirlenememiştir<sup>83,94</sup>.

**8. İmmunosüpresyon:** Konakçı hücrenin immün cevabı HPV'nin kalıcı hale geçmesinde ve servikal kanser gelişim sürecinin başlamasında çok önemlidir<sup>31</sup>. Çeşitli sağlık problemleri nedeniyle, organ transplantasyonu yapılmış hastalarda, ilaç kullanımından dolayı veya HIV enfeksiyonu sonucu gelişen immünosüpresyon HPV enfeksiyonu ile ve sebep olabileceği neoplazilerle yakından ilişkilidir<sup>69,83</sup>.

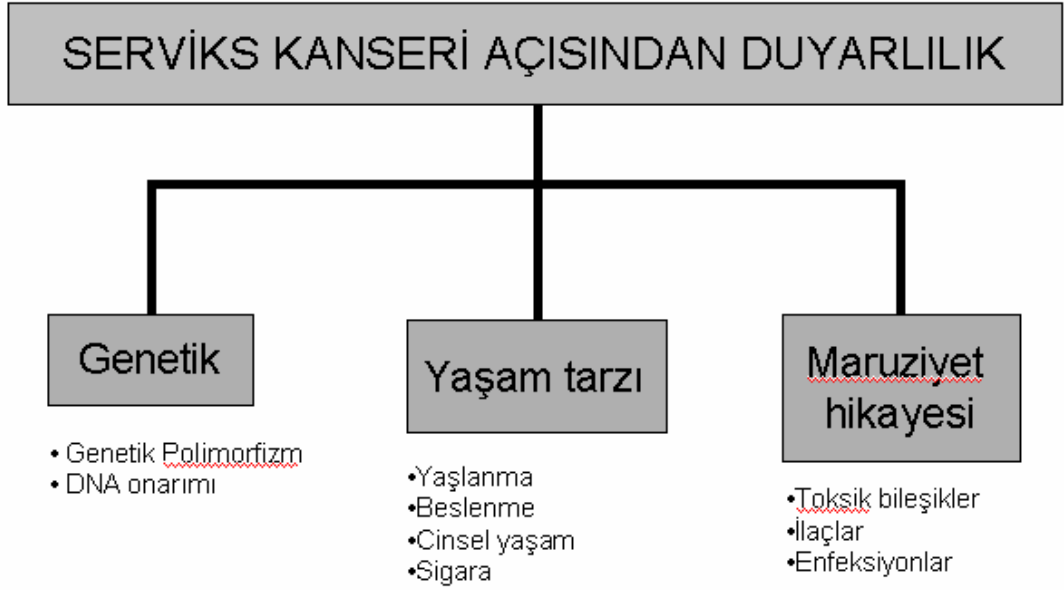
İmmün yetmezliğin ne derece olduğu HPV'nin indüklediği servikal lezyonların oluşumunda çok önemlidir<sup>69</sup>. Organ transplantasyonu yapılmış hastalar ve HIV pozitif hastalar gelişen immün yetmezliğe bağlı olarak yüksek servikal kanser riski altındadırlar. Böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda populasyon geneline göre 9 kat daha yüksek anogenital HPV enfeksiyonu ve 17 kat daha yüksek HPV ile ilişkili CIN lezyonları tespit edilmiştir<sup>69</sup>. Hücresel ve mukozal immün mekanizmalar HPV ekspresyonunda ve serviks kanserinde kritik rol oynar<sup>22</sup>.

#### **II.4.4 Serviks kanserinde bireysel duyarlılığın önemi**

Son yıllarda birçok çalışma genetik polimorfizmin kansere yakalanma riski ile ilişkisini araştırmakta, bazı bireylerin neden kansere daha yatkın olduğu sorusunun cevabını bulmaya çalışmaktadır. Bu çalışmalarda öncelik ksenobiyotik metabolizmasında rol oynayan enzimlere verilmekte ancak bu çalışmaların istatistiksel güç kazanabilmesi için çok geniş populasyonlarda sürdürülmesi gerekmektedir. Bu problem genellikle uluslararası işbirliği çalışmalarıyla aşmaya çalışılmaktadır. Duyarlılık bilgilerine ilave olarak çalışmalarda maruziyetin değerlendirilmesi veya erken dönem genotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla biyogöstergelerin uygulanması duyarlılıkla ilgili sonuçları daha anlamlı hale getirecektir<sup>100</sup>.

Servikal kanser gibi çevresel etkenlerle ilişkili kanser türlerinde bireysel duyarlılığın önemi son yıllarda önem kazanmıştır. Yaşam tarzı ve çevresel kofaktörlerin yanı sıra bireyin genetik duyarlılığı servikal kanser gelişiminde son derece önemli olduğu, servikal kanser öncül lezyonlarının bazı bireylerde kendi kendine iyileşmesi bazı bireylerde ise serviks kanseri gelişimine sebep olması immün mekanizmaların etkinliğinin yanı sıra genetik duyarlılığın da önemini doğrulamaktadır. Birçok çevresel kökenli hastalıkta olduğu gibi servikal kanser gelişiminde de genetik, yaşam tarzı ve maruziyet

hikayesi önem taşımaktadır. Ancak günümüzde genetik ve kazanılmış duyarlılık faktörlerinin servikal kanser gelişimi üzerine etkisine dair yeterli kanıt yoktur. Serviks kanseri gelişiminde duyarlılık faktörlerinin etkisi Şekil II.14'te gösterilmiştir.



**Şekil II.14** Serviks kanseri gelişiminde duyarlılık faktörlerinin etkisi<sup>53</sup>

Servikal kanser gelişiminde genetik polimorfizmin etkisini görmek amacıyla Amerikalı (n=83, kontrol n=38) ve Venezuelalı (n=75, kontrol n=76) serviks kanserine yakalanmış kadınlar üzerinde yapılan çalışmada GSTM1 null allel ile serviks kanseri arasında ilişki bulunmuştur<sup>15,53</sup>. GSTM1, tütüne özgü genotoksik karsinogenlerin detoksifikasyonunda rol oynar. Sigaranın serviks kanseri gelişiminde önemli bir kofaktör olduğu dikkate alınarak da GSTM1 null bireylerin serviks kanserine yatkınlığı açıklanabilir<sup>15,100</sup>. Servikal kanserin çok risk faktörlü bir hastalık olduğu düşünüldüğünde GSTM1 polimorfizminin servikal neoplazi gelişimi üzerindeki etkisinin yanısıra birçok faktörün devrede olabileceği ve servikal kanserden korunma programlarında polimorfizmle ilgili yapılacak çalışmaların gelecekte faydalı olacağı düşünülmektedir<sup>101</sup>. GSTM1'in yanısıra, p53, XRCC1, XRCC3 ve OGG1 polimorfizmlerinin de servikal kanser



etiyojisi açısından önemli olabileceği düşünülmüş, ancak bu polimorfizmlerin serviks kanseri ile ilişkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır<sup>102,103</sup>.

P53 polimorfizminin de servikal kansere yatkınlıktaki rolü araştırılmış ancak çeşitli laboratuvarlardan çelişkili sonuçlar alınmıştır. Storey ve arkadaşları p53Arg izoformu p53'ün HPV-16 ve 18'e olan duyarlılığını arttırdığını ve 7 kat daha fazla serviks kanseri riski taşıdığını belirtmiştir<sup>104</sup>. Ancak bu çalışma yayınlandıktan hemen sonra p53Arg izoformu ile servikal kanser arasında ilişki bulunmadığını belirten çalışmalar yayınlanırken<sup>105-107</sup>, bu ilişkiyi doğrulayan çalışmalar da yayınlanmıştır<sup>108,109</sup>.

DNA tek sarmal kırıklarının ve genetik instabilitenin onarılmasında görevli XRCC1 proteini ile HPV E6 proteinlerinin etkileşmesi sonucu DNA onarımının azalabileceğine dikkat çekilmiş ve in vitro koşullarda HPV E6 proteinlerinin XRCC1'e bağlanmasıyla DNA onarımının azaldığı gösterilmiştir.<sup>110</sup> Ancak XRCC1 polimorfizmi ile serviks kanseri arasındaki ilişki kanıtlanamadığı gibi XRCC3 ve OGG1'in de serviks kanseri gelişimi ile ilişkisi henüz aydınlatılamamıştır<sup>102,103</sup>.

#### II.4.5 Aşı Çalışmaları

Günümüzde HPV ile ilişkili aşı çalışmaları iki amacı hedefleyerek yürütülmektedir<sup>66</sup>:

1. **proflaktik aşılar:** HPV enfeksiyonuna ve neden olabileceği lezyonlara karşı koruyucu olarak kullanılması planlanır.
2. **terapötik aşılar:** prekanseröz lezyonları ve ilerlemiş servikal kanseri tedavi etmek amacıyla kullanılması planlanır.

**proflaktik aşılar:** Enfeksiyöz virionları taklit etme özelliğine sahip HPV-VLP'ler (virüs benzeri partiküller) ile bireyin karşılaştırılması sonucu antikor gelişimi sağlanır. Bu aşılar L1 veya L1-L2 proteinlerini içerir<sup>111</sup>. VLP'ler hiç viral DNA içermez bu sayede enfeksiyona sebep olmaz veya onkojenik özellik kazanmaz. Bu şekilde elde edilen bağışıklığın oldukça spesifik ve uzun süreli olduğu belirlenmiştir<sup>97,112</sup>.

Günümüzde üç adet VLP profilaktik aşı çalışması tamamlanmıştır. Bu çalışmaların ortak sonuçları HPV-VLP aşılarının iyi tolere edildiği ve yüksek oranda immünolojik olduğu yönündedir<sup>113</sup>. Tablo II.14'te geliştirilen proflaktik aşılar ve etkili oldukları HPV tipleri gösterilmektedir.

**Tablo II.14** Profilaktik aşılar ve etkili oldukları HPV tipleri

Aşı tipi	Etkili olduğu HPV tipleri
Monovalan	HPV-16
Kuadrivalan	HPV-6,11,16,18
Bivalan	HPV-16,18

Mevcut HPV aşıları servikal kanserlerin büyük çoğunluğundan sorumlu tutulan HPV 16 ve 18'e karşı koruyucudur ve terapötik özelliği olmayan profilaktik aşılardır. Bu iki tip HPV'ye karşı aşılamanın servikal kanser vakalarını %70 oranında önleyebileceği düşünülmektedir<sup>113</sup>. Ancak HPV enfeksiyonunun doğal seyri göz önüne alındığında etki en erken 20 yıl sonra değerlendirilebilir ve HPV aşılmasına dayalı kurulan bir korunma stratejisi ile serviks kanseri olguları azaltılabilir fakat elimine edilemez. Bu yüzden tarama programlarına uzun yıllar devam etmek gerekmektedir. Serviks kanseri kaynaklı ölümlerin insidansındaki azalma bu aşıların ancak on yıllarca kullanılması sonucu mümkün olacaktır<sup>115</sup>.

Bugün, HPV 6, 11, 16, 18 tiplerine karşı koruma sağlayan profilaktik aşı 9-26 yaş aralığındaki virüsle enfekte olmamış kız çocukları ve kadınlar için

önerilmektedir. İlerleyen dönemlerde ise 26 yaş üstü kadınlar için ve erkekler için de aşının kullanılması planlanmaktadır<sup>115,116</sup>. Erkeklerde HPV enfeksiyonunun kansere neden olma olasılığı oldukça düşük olup, ihmal edilecek düzeydedir. Ancak erkeklerin enfeksiyon için taşıyıcı rolü ve aşının siğillere karşı koruyucu etkisi göz önünde bulundurulmalıdır<sup>117</sup>. Aşının koruyuculuk süresi ile ilgili olarak şu ana kadar sadece 4 yıllık takip sonuçları değerlendirilmiştir, daha uzun dönemde koruyuculuktaki azalma ve aşılamanın hangi sıklıkla tekrarlanması gerektiği henüz tam bir kesinlik kazanmamıştır. Bunun yanı sıra, aşının cinsel ilişkide korunmayı azaltacağı ve bu nedenle diğer cinsel enfeksiyonları arttıracığı yönünde kaygılar da mevcuttur. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde HPV aşılılarıyla ilgili eğitimler düzenlenerek hekimlerin, hastaların, ailelerin ve gençlerin aşının koruyuculuk sınırlarını öğrenmesi hedeflenmektedir<sup>115,116</sup>.

Bütün bu belirsizliklere karşı Haziran 2006 tarihi itibarıyla FDA, ABD'de 9-26 yaş arası kadınlara VLP kuadrivalan HPV aşılarının uygulanmasını onaylamıştır<sup>118</sup>.

**terapötik aşılar:** Profektik aşılarla alınan yol ve başarı henüz terapötik aşılarda elde edilememiştir. Terapötik aşılardan öncelikle HPV ile enfekte yüksek derecede servikal kanser riski taşıyan bireyler için kullanılması planlanmaktadır ve VLP aşıları bu amaçla kullanıma uygun değildir. Temelde iki tip terapötik aşı üzerinde çalışılmaktadır.

a) HPV'nin çoğalabilmesi için ihtiyaç duyduğu E1 ve E2 erken dönem proteinlerini içeren aşılardan hücrel bağışıklık sistemini uyarmak suretiyle virüsün çoğalmasını engellemesi hipotezine dayanır.

b) Serviks karsinomu HPV E6 ve E7 proteinlerini bol miktarda içerir. HPV E6 ve E7 proteinlerini içeren aşılardan vücudun bağışıklık sistemini ve sitotoksik lenfositleri harekete geçirerek antitümör etki gösterebileceği hipotezine dayanır. Bu sayede HPV ile enfekte servikal neoplazi tedavisinde bu aşılardan yararlanılması planlanmaktadır. Ancak HPV E6 ve E7 proteinlerine dayalı DNA aşıları ile ilgili çelişkili

görüşler vardır. Konakçı genomunda eksprese edilmeleri veya genoma katıldıklarında mutasyona neden olma potansiyelleri henüz değerlendirilme aşamasındadır<sup>97,112</sup>.

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde diğer aşılama programları örnek alınarak (hepatit B gibi) HPV aşılama programları hazırlanmakta ve toplumun serviks kanseri ve HPV enfeksiyonları hakkında bilgilendirilmesi hedeflenmektedir<sup>117</sup>.

Önümüzdeki 5 yılda gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerin HPV enfeksiyonları ve servikal kanser için farklı stratejiler uygulamaları gerekmektedir. Gelişmekte olan ülkeler için HPV DNA testlerinin ülke genelinde uygulanabilir hale gelmesi ve etkin tarama-tedavi programlarının tüm populasyon için düzenlenmesi amaçlanmakta ve çeşitli firmalar gelişmekte olan ülkelerde HPV DNA'sının tespiti amacıyla kullanılmak üzere ucuz ve ileri teknoloji gerektirmeyen ticari test sistemleri üzerinde çalışmaktadırlar. Gelişmiş ülkeler için en önemli hedef tarama sonrası tedaviye ihtiyaç duyan ve izlenmesi gereken kadın sayısını azaltmak dolayısıyla HPV ile enfekte kadın sayısının azaltılmasıdır. Yüksek riskli HPV tipi ile enfekte kadınların hangilerinin gerçekten CIN geliştireceğini önceden anlayabilmek amacıyla yeni biyogöstergelerin geliştirilmesi hedeflenmektedir<sup>18</sup>.

#### **II.4.6. Servikal izleme programları ve tarama yöntemleri**

Yüksek riskli HPV tipleri ile servikal kanser arasındaki güçlü bağlantı serviks kanserinden korunma programlarında HPV testlerinin izleme amaçlı uygulanması gerekliliğini gündeme getirmiştir<sup>18</sup>.

Amerika'da servikal kanser izleme programlarının başlatılması ile 1950 yılından itibaren vaka sayısı önemli oranda düşüş göstermiştir<sup>68</sup>. Günümüzde de servikal kanserden korunmak amacıyla her yıl büyük miktar kaynak ayrılmaktadır. ABD'de heryıl

servikal kanserden korunma ve tedavi için harcanan paranın neredeyse 2/3'ü rutin tarama programlarına harcanırken kalan kısım tedavi giderleri için harcanmaktadır<sup>119</sup>. Buna karşılık her yıl 10,000'den fazla amerikalıya ICC tanısı konulacağı ve yaklaşık 3700'ünün bu hastalıkta hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir<sup>120</sup>.

Servikal izleme programlarının düzenli olarak uygulandığı gelişmiş ülkelerde servikal kanser insidansı ve mortalitesi düşmüştür. Ancak servikal kanserden korunma programları oldukça pahalı ve zahmetli laboratuvar prosedürlerine dayanmaktadır. İzleme programları ender olarak tamamlanmakta ve neredeyse çoğu gelişmekte olan ülkede sürdürülememektedir. Günümüze kadar bu ülkelerdeki izleme programları düşük kaliteli ve kısa zamanlı olarak tanımlanmaktadır. Sonuç olarak az gelişmiş ülkeler ulusal servikal kanser korunma programı olan ülkelere göre en az iki kat daha yüksek servikal kanser kaynaklı ölüm oranına sahiptir<sup>17</sup>.

Normalde servikal izleme programlarıyla servikal kanser insidansı düşürülebilmesine rağmen, izleme programlarına yeterince kaynak aktarılamayan az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler dünya genelinde servikal kanser insidansının yükselmesinde büyük pay sahibidir. Konakçı genotipi, çok fazla HPV tipleriyle enfeksiyon gerçekleşmesi ve bu sayede onkojenitenin artması da artan insidansa katkıda bulunmaktadır<sup>121</sup>.

#### **II.4.6.1 Sitolojik tanı yöntemleri:**

Servikal sitolojinin izlenmesi servikal kanserden korunmak ve teşhis amaçlı etkin bir metod olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda yapılan meta analiz çalışmalarında servikal sürüntülerin sitolojik değerlendirilmesinin, biyopsi sonucunda HGSIL ve servikal kanser tanısı konmuş vakaların %40-50'sini erken dönemlerde tespit edemediği ve hatalı sonuç verdiği rapor edilmiştir. Bunun sonucunda

HPV DNA'sını tespit etmeye yönelik testlerin geleneksel sitolojik yöntemlerle birlikte kullanılmasının yararlılığını gündeme getirmiştir<sup>18</sup>.

### ***Pap Testi:***

George Papanicolaou tarafından geliştirilmiş pap testi servikal hücrelerin sitolojik olarak değerlendirilmesi sonucu serviks kanserinin erken tanısını mümkün kılmaktadır ve 1940'lı yıllardan beri uygulanmaktadır. Servikal kanser tanısında pap testi maliyet açısından da en uygun yöntemdir<sup>122</sup>.

Pap testi yaygın olarak yaklaşık 50 yıldır uygulanmaktadır. Preparatların hazırlanışında ve yorumlanmasında bu süre içinde belirgin bir değişiklik yapılmamıştır. En önemli dezavantajı hassasiyetidir. Pap testleri adenokarsinomayı belirlemede skuamöz karsinoma kadar başarılı değildir<sup>123</sup>.

Alınan hatalı pozitif sonuçlar likit bazlı sitolojik değerlendirmelere ve HPV DNA testlerinin birarada kullanılmasına ihtiyaç duyulmasına sebep olmuştur. Likit bazlı sitolojik testlerin geleneksel pap testinden farkı servikal sürüntüyü direkt incelemek yerine servikal sürüntü örneğinin bir sıvı içine alınıp hücreler çeşitli filtrelerden geçirilerek temizlendikten sonra lam üzerine ince bir tabaka halinde yayılıp sitolojik değerlendirmeye hazırlanmasıdır. Bu sayede daha kaliteli preparatlar elde edilir ve yöntemin hassasiyeti artar<sup>123</sup>.

Pap testi sonucu pozitif veya şüpheli ise hasta kolposkopik incelemeye alınır. Bu aşamada biyopsi örneği alınır ve sonuca göre tedaviye karar verilir<sup>124</sup>.

Pap testi ile alınan hatalı pozitif /negatif sonuçları engellemek amacıyla HPV tiplerinin tespiti için kullanılan testlerinin de sitolojik taramaya ilave olarak uygulanması önerilmektedir<sup>124</sup>.

#### **II.4.6.2 HPV Tiplerinin tespiti için kullanılan yöntemler**

Mikrobiyolojik tanı yöntemlerinin (elektron mikroskopisi gibi) HPV tanısında kullanımı mümkündür. Ancak yüksek maliyet ve düşük duyarlılık bu yöntemlerin tercih edilmeme sebebidir. Bunun yerine spesifik HPV tanısı için HPV DNA'nın gösterilmesi en güvenilir yöntemdir. Pap testi ile pozitif sonuç alınan bireylerden hangilerinin daha hızlı patoloji geliştirebileceğinin tahmin edilmesi açısından HPV tiplerinin tespit edilmesi ve eğer yüksek riskli tip ile enfeksiyon sözkonusu ise hastanın daha sık izlenmesinin hastalığın erken teşhisini sağlayacağı ve servikal kanser kaynaklı ölümleri azaltacağı düşünülmektedir<sup>125</sup>.

HPV enfeksiyonunun alt genital sistem hastalıklarındaki önemi anlaşıldıkça viral tanı yöntemleri ve bu yöntemlerin hassasiyetleri gündeme gelmiştir. Gerek HPV virüsünün doku kültüründe çoğaltılma problemleri, gerekse HPV enfeksiyonunun teşhisinde serolojik testlerin güvenilirlik problemleri; HPV test yöntemlerinin viral DNA tespitine dayanmasına sebep olmuştur<sup>18</sup>.

Servikal karsinomların tespitinde klasik sitolojik yöntemlerin yanı sıra HPV DNA'sının tespiti klinik açıdan oldukça önemlidir. Bugün, servikal kanser vakalarının %80-99'unda HPV DNA'sı tespit edilmektedir. Kontrol grubu olarak seçilen bireylerin ise %5-15 oranında HPV DNA'sı taşıdıkları belirtilmiştir. Tarihsel olarak HPV DNA'sının prevelansı teknolojinin gelişimi ile orantılı olarak artmıştır. 1980'lerin başında Southern Blot testlerinin kullanımı ile servikal kanser vakalarında %40-70 oranında HPV DNA'sı tespit edilirken PCR teknolojisindeki gelişmeler sayesinde bu oran %70-90'lara kadar

yükselmiştir. Test koşullarının valide olduğu laboratuvarlar bu oranı %99 olarak belirlemektedirler<sup>11</sup>.

HPV tiplemesinin yapılması uygulanacak tedaviyi değiştirmez ancak bireyin yüksek riskli veya düşük riskli tiplerle enfekte olduğunun bilinmesi takip sıklığının düzenlenmesi açısından klinik önem taşır<sup>126</sup>.

Günümüzde HPV DNA'sı tespiti için iki test valide edilmiştir<sup>18,127</sup>.

- 1) HC2
- 2) PCR'a dayalı testler

### ***Hibrit yakalama-2 (HC2):***

1998 yılında HPV tespiti amacıyla ticari bir ürün olan Hybrid Capture-II (HC-II; Digene, U.S.A.) kullanıma sunuldu. HC-II nonradyoaktif, hızlı bir test sistemidir. Klasik HC testinde HPV DNA'sı pozitif ya da negatif şeklinde sonuç alınırken HC2 ile 18 tip HPV DNA'sı analiz edilmektedir. Yüksek riskli tiplerden HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 ve düşük riskli tiplerden HPV- 6, 11, 42, 43, 44 bu yöntemle test edilebilir. HC2 ile yapılan çalışmalar, sonuçların PCR sonuçları ile uyumlu olduğunu göstermektedir<sup>128</sup>.

1999 yılında HC-HPV DNA testlerinin kullanımı FDA tarafından kuşku sitolojik sonuçlarda sitolojiye ek test olarak onaylanmıştır. 2003 yılında ise, FDA ikinci jenerasyon HC testi olan HC2'nin, 30 ve üzeri yaşlardaki kadınlarda, servikal kanser belirtilerinin tedavisi sonrasında ve şüpheli sitoloji vakalarında servikal sitolojik taramaya ilave olarak kullanılmasını onaylamıştır<sup>18</sup>. HC2 testi uygulama kolaylığı nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir. Ticari olarak 96 kuyulu mikrolaka formatındadır. 13 yüksek riskli HPV tipini, 5 düşük riskli HPV tipini tespit etmek amacıyla Prob B (yüksek riskli tipler için) ve Prob A (düşük riskli tipler için) olmak üzere iki farklı RNA probu kullanılmaktadır<sup>18</sup>.



RNA problemleri testin teşhis edebildiği HPV tiplerinin genomik sekansının tamamlayıcısıdır. Metod öncelikle HPV DNA'sının RNA prob karışımları ile spesifik HPV DNA-RNA hibridlerini oluşturmak üzere denatürasyonunu gerektirir. Oluşan spesifik DNA-RNA hibridleri antikorlar tarafından tanınır. Fazla antikorlar ve hibridleşmemiş problemler uzaklaştırıldıktan sonra hibridler luminometre tarafından ölçülmek üzere parlaklığa sahip olmak üzere bir dizi reaksiyondan geçirilir. Ölçümler sonucu viral yükün semi-kantitatif tayini yapılmış olur. Ancak sonuçlar spesifik HPV tipleri hakkında bilgi vermez, tiplerden herhangi birinin varlığında pozitif sonuç alınır. Yöntemin en önemli dezavantajı HC2 yüksek riskli prob karışımının (Prob B) HPV 53, 66, 67 ve 73 gibi prob içinde bulunmayan HPV tipleri ile çapraz reaksiyona girip hatalı pozitif sonuçlar vermesidir<sup>18</sup>.

Bugün HC3 üzerinde çalışmalar devam etmektedir. HC3 ile daha fazla HPV tipinin teşhis edilebilmesi ve hatalı pozitif sonuçların önlenmesi hedeflenmiştir<sup>127</sup>.

### ***Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)' a dayalı yöntemler***

HPV çalışmalarında en yaygın kullanılan yöntemlerdendir. Bu yöntemde taze doku ve hücrelerden elde edilen DNA'lar ile çalışılabildiği gibi, formalinle fikse edilmiş, parafine gömülü dokularda da çalışılabilir.

Günümüzde HPV DNA'sını test etmek amacıyla kullanılacak PCR'a dayalı hiçbir ticari ürün bulunmamaktadır. Bu testler şu anda araştırma laboratuvarlarında ve bazı özel laboratuvarlarda uygulanmaktadır. Gelecekte ticari bir ürün şeklinde piyasaya sunulması planlanmaktadır. PCR'a dayalı testler yüksek analitik duyarlılığa sahiptir ve çok az miktarda örnekle veya viral yükün çok az olduğu durumlarda bile sonuç

vermektedir<sup>18</sup>. Metod, viral genomun seçilmiş gen bölgelerinin çoğalmasına dayanır. Denatürasyon sonrası hedef DNA tek sarmalı kalıp olarak kullanılır. Çoğaltılmak istenen bölgeye özgü oligonükleotidler Taq polimeraz aracılığı ile hedef bölgeye bağlanır ve çift sarmallı DNA molekülleri oluşur. Bütün yeni sentezlenmiş çift sarmallı DNA molekülleri bir sonraki döngü için kalıp görevi yapar. Denatürasyon, annealing ve extension basamaklarının tekrarlanması sonucu ürün çoğaltılır ve jel elektroforezine, RFLP veya sekanslanmaya hazır hale gelir<sup>18</sup>.

PCR'a dayalı metodların hassaslığı ve spesifikliğı çok değişkendir. Bunu etkileyen faktörler<sup>18</sup>:

- primer setleri
- PCR ürünü büyüklüğü
- Reaksiyon koşulları
- Reaksiyonda kullanılan DNA polimerazın performansı
- Çoğaltılan HPV DNA tipi
- Çoklu tiplerin tespiti

PCR yöntemi ile yüksek duyarlılığa karşı hatalı pozitif sonuçlar kontaminasyon sonucu alınabilmektedir. En yaygın kullanılan protokoller en iyi korunmuş bölge olan L1 genini hedef alan primerleri kullanmak konusunda fikirbirliğindedirler. Bunlar içinde MY09/11, PGMY 09/11, GP 5+/6+, ve SPF1/2 primerleri yaygın kullanıma sahiptir ve 40 farklı HPV tipinin tespitinde kullanılabilir<sup>18</sup>. Tiplere spesifik PCR yöntemlerinde ise özellikle onkojenik tipler arasında en fazla varyasyonun görüldüğü polimorfik HPV genom bölgesi E6/E7 hedeflenir<sup>129</sup>.

Zaman içinde PCR teknolojisine dayanan testlerdeki gelişmelerin HPV DNA'sı tespitinde kesinlik ve maddiyatla ilgili problemleri çözmesi umulmaktadır. Bir diğer olası çözüm ise bu tekniklerle proliferasyonu ve hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerin

tespit edilmesi ve buna göre servikal kanser geliştirme olasılığı bulunan kadınların ayrılıp diğerlerinin daha uzun aralıklarla izlenmesidir. Günümüzde kişisel kullanımı mümkün olan servikal ve vaginal sürüntü almak kaydıyla HPV DNA'sını tespit eden kitler halen araştırma aşamasındadır<sup>127</sup>.

Shah ve ark.'nın bir çalışmasında HPV DNA tanısında PCR ile Hibrid Yakalama yöntemlerini karşılaştırılmışlar ve PCR'ın çok düşük miktarda HPV DNA varlığında bile pozitif sonuç verirken, Hibrid Yakalama testinin ancak yüksek miktarda HPV DNA varlığında pozitif sonuç verdiğini belirtmişlerdir<sup>130</sup>.

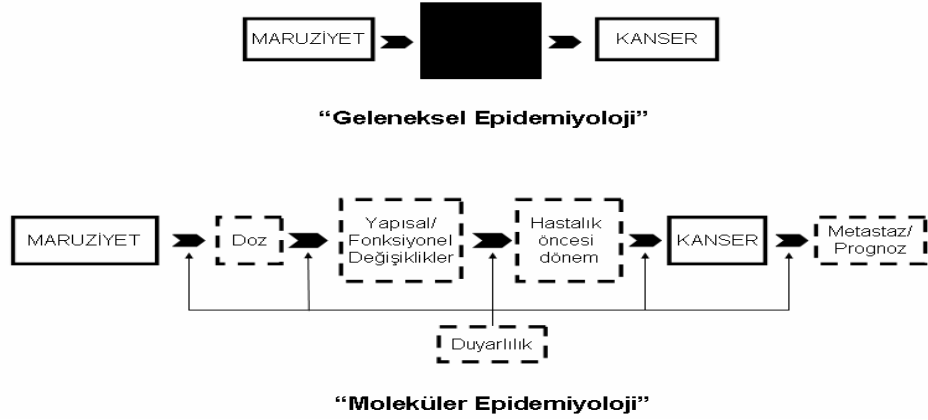
### ***Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (REAL TIME PCR, RT-PCR)***

RT-PCR, duyarlılık ve spesifiklik açısından değerlendirildiğinde HPV DNA'sının tespiti için ideal bir yöntemdir. RT-PCR'da, reaksiyon karışımına luminesan marker içeren probler eklenir ve bunlar DNA tek sarmalına bağlanırlar. Polimeraz enzimi aracılığıyla dNTP'ler bağlanmaya başladığında probun lüminesan özelliği aktive olur ve bilgisayar ekranında görüntülenmeyi sağlar. Luminasyon miktarı ürün varlığıyla korelasyon gösterdiği için, kantitasyon hakkında bilgi verir. Real Time PCR ile ürünün çoğaltılması sırasında bilgisayar ekranında görüntü alınmaya başlar, böylece ürünün jele yüklenmesi zorunluluğunu ortadan kaldırır. Kontaminasyon ihtimalinin çok düşük olması ve yöntemin hızlı olması da önemli avantajlarıdır. Farklı primer dizileriyle çalışılabilir. HPV tipleri için en sık kullanılan primer dizilerinden birisi MY09/11 setidir. Bu primer seti pek çok HPV tipi için spesifik kabul edilmektedir<sup>131</sup>.

Bu yöntemlere ilave olarak DNA mikroarraylerin zaman içinde maliyetle ilgili problemleri de çözdükten sonra HPV tiplerini için vazgeçilmez hale gelmesi beklenmektedir<sup>129</sup>.

## II.5 Genotoksisite testlerinin moleküler epidemiyoloji çalışmalarındaki yeri

Moleküler biyoloji tekniklerinin gelişmesi sayesinde geleneksel epidemiyoloji yerini zaman içinde moleküler epidemiyolojiye bırakmıştır. Kanser araştırmalarında eskiden “kara kutu” olarak tanımlanan maruziyet ile kanser gelişimi arasındaki süreç moleküler epidemiyoloji ile çok basamaklı olarak değerlendirilmekte, çeşitli biyogöstergeler yardımı ile farklı kanser türlerinin mekanizmasının anlaşılmasını sağlamaktadır. Şekil II.15'te moleküler epidemiyolojinin kanser çalışmalarında maruziyetten kanser gelişimine doğru getirdiği açılımlar görülmektedir<sup>132</sup>.



**Şekil II.15** Moleküler epidemiyolojinin kanser araştırmalarında sağladığı açılımlar<sup>132</sup>

Kanser gelişimi uzun yıllar sonucunda gerçekleştiğinden prospektif epidemiyolojik çalışmalar düzenlemek her zaman mümkün değildir. Bu yüzden, kanser riskini belirleyebilecek özellikte biyogöstergeler geliştirilmesine karşı haklı bir ilgi sözkonusudur<sup>133</sup>.

Çoğu insan karsinojeni genotoksikken, tüm genotoksik ajanların insanlarda karsinojenik olduğu gösterilmemiştir. Kanser gelişiminden önce genotoksisite ile karsinogenesis arasındaki ilişkinin belirlenmesi doğal olarak önem kazanmıştır. Bu amaçla geliştirilen çeşitli genotoksisite yöntemleri mevcuttur. Bunlardan en sık kullanılanlar; sayısal ve yapısal kromozomal anomalileri belirlemek amacıyla uygulanan

kromozomal aberasyon testi, kardeş kromatid değişimi (SCE), floresans in-situ hibridizasyon (FISH), mikroçekirdek (MÇ), comet (tek hücre jel elektroforezi) yöntemi, DNA ve protein katım ürünleri şeklinde sıralanabilir<sup>134</sup>.

### **II.5.1 Kromozomal aberasyon yöntemi**

Sayısal ve yapısal olmak üzere iki tip kromozomal aberasyon söz konusudur. Sayısal kromozomal aberasyonlar kromozom sayılarındaki değişiklikleri temsil ederken yapısal kromozomal aberasyonlarla çok çeşitlidir. Yapısal kromozomal aberasyonlar genel olarak iki grup altında incelenebilir: 1. kromozom tipi aberasyonlar, 2. kromatid tipi aberasyonlar<sup>135</sup>.

Yapısal kromozomal aberasyonlar sıklıkla; direkt DNA hasarı, hasarlı DNA'nın replike olması, DNA sentezinin inhibe olması ve onarım mekanizmalarındaki bozukluklar nedeniyle oluşur. Çok az sayıda ajan DNA kırıklarını direkt indükleyerek (iyonizan radyasyon ve bleomisin gibi) hasar oluşmasına sebep olur. Populasyon izleme çalışmalarında genellikle hasarlı DNA'nın replike olması sonucu oluşan kromozomal aberasyonlar değerlendirilir. Hasarlı hücre kromozomal aberasyonlar açığa çıkmadan önce mutlaka S fazına girmelidir, bu yüzden bu kimyasallar "S-fazına bağlı klastojenler" diye adlandırılır. Kimyasalların S fazında DNA sentezi için gerekli olan bazı ajanlarla etkileşmesi veya DNA onarım mekanizmalarında bozukluğa sebep olmaları sonucu yapısal kromozomal aberasyonlar oluşabilir<sup>134</sup>.

Periferal kan lenfositlerinde kromozomal aberasyon sıklığı genotoksik karsinojenlerin değerlendirilmesinde uzun yıllardır kullanılmaktadır ve kromozomal aberasyon testi populasyon çalışmalarında erken biyolojik etkileri gözlemek için ve genotoksisite alanında yaygın kullanıma sahip en iyi valide edilmiş biyogöstergeçir<sup>19,134</sup>.

Karsinogeneziste periferal kan lenfositlerinde kromozomal aberasyon çalışmalarının hedef dokulardaki spesifik kromozomal değişiklikleri temsil ettiği düşünölmektedir. Kromozomal hasar mekanizmasının farklı dokularda benzer olduğu düşünölmürse, lenfositlerdeki hasar seviyesi kansere yatkın dokularinkini yansıtır kanser riskini belirlemede kullanılabilir<sup>19-21</sup>. Bu yüzden periferal kan lenfositleri DNA hasarı ve kromozomal aberasyonları değerlendirmeyi ve genotoksik riskin belirlenmesini mümkün kılar<sup>21</sup>.

Periferal kan lenfositlerinde artan kromozomal aberasyon sıklığına sahip bireylerin kanser gelişiminde anlamlı bir şekilde daha yüksek risk altında oldukları bir çok çalışmada gösterilmiştir<sup>136,137</sup>.

Kromozomal aberasyon yönteminin yaygın kullanımı sonucu birçok Avrupa laboratuvarında veriler birikmiştir. Bu durum, önceden belirlenmiş kromozomal aberasyon sıklıklarının kanser ile ilişkili olup olmadığının araştırılmasını mümkün kılmıştır. 10 İskandinav sitogenetik laboratuvar sonuçlarını içeren prospektif kohort çalışmasında (Nordic Study Group), kromozomal aberasyon sıklıklarının artan kanser riski ile ilişkili olduğunu belirtilmiş, yine lenfositlerde yapılan SCE ve MÇ yöntemleriyle bu ilişki gösterilememiştir<sup>19</sup>.

İnvitro kromozomal aberasyon testi en yaygın insan periferal lenfositlerinde uygulanır ve mitoz bölünmeyle çoğalan hücreleri metafaz aşamasında durdurularak yapısal kromozomal aberasyonları tespit eder. Yapısal kromozomal aberasyonlar çeşitli mutajenlere maruziyet sonucu oluşur. Periferal lenfositler hücre siklusunun Go evresindedir ve hücrenin çoğalabilmesi için spesifik bir ajan olan fitohemaglutinin tarafından bölünmenin stimüle edilmesi gerekir. Yaklaşık 45 saat sonra kolsemid/kolşisin gibi bir iç iplikçikleri inhibitörü ilk mitoz bölünmeyi metafaz aşamasında durdurmak üzere ilave edilir. Hipotonik çözelti ile muameleden sonra fiksasyon

gerçekleştirilir ve hücreler lam yüzeyine yayılır. Giemsa boyama sonrası yapısal kromozomal aberasyonlar mikroskop altında değerlendirilmek üzere hazırdır<sup>135</sup>.

## II.5.2. Comet Yöntemi

Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE) veya Comet tekniği, DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan, hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip bir tekniktir. İlk defa 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kurulan, daha sonra 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından geliştirilen teknik nötral pH'daki lizing şartlarında uygulanarak DNA çift sarmal kırıklarını tayin etmekteydi<sup>138</sup>. 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından protokolde birtakım değişiklikler yapılarak yöntem alkali lizing koşullarında uygulanmıştır<sup>139</sup>. Singh ve arkadaşlarının comet yöntemi protokolü bugün küçük değişikliklerle dünya genelinde en yaygın kullanılan protokoldür. Yöntemin en önemli avantajlarından bir tanesi de çok çeşitli hücre tiplerinde çalışma olanağı sağlamasıdır<sup>140</sup>.

Comet yönteminde, hücreler izole edildikten sonra agar içine gömülerek mikroskopik lamlara yayılır, lizing aşamasından sonra elektroforeze bırakılıp floresan boya ile boyanmak suretiyle değerlendirilir.

Comet tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirmenin yanısıra kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi en yaygın kullanılan parametrelerdir<sup>141</sup>. Kuyruktaki DNA yüzdesinin belirlenmesi ve sonuçların gözle değerlendirilmesi diğer parametrelere göre doz cevap ilişkisini daha iyi yansıtması sebebiyle tercih edilmektedir<sup>138,142,143</sup>. Comet tekniği enfeksiyöz ajanların indüklediği DNA hasarını izlemede uygun ve etkili bir yöntem olarak gösterilmektedir<sup>144</sup>.

### II.5.3. Challenge Yöntemi

1970'li yılların sonlarına doğru Hsu ve Au, kanser hastalarının ve kansere yatkın bireylerin DNA onarım yetersizliklerinin olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında Hsu ve arkadaşları bleomisini, Au ve arkadaşları ise X- ve  $\gamma$ - gama ışınları ya da UV ışığı gibi fiziksel ajanları kullanmaya başlamışlardır. Au ve arkadaşları uyguladıkları yöntemi "Challenge tekniği" diye isimlendirmiştir <sup>145</sup>.

Dolayısıyla "Challenge Tekniği" tabiri ilk olarak 1991 yılında William Au tarafından sitogenetik literatürüne sokulmuştur<sup>146</sup>. Bu teknik DNA onarımının kişilere göre farklılığının tespitini dolayısıyla bireysel duyarlılığın belirlenmesini hedefler. Deney ve kontrol bireylerinin yüksek dozda radyasyona maruz bırakılır ve indüklenmiş DNA hasarı saptanır. İndüklenmiş değerlerdeki farklar kantitatif olarak değişen onarım kapasitesini gösterir<sup>147,148</sup>.

DNA hasarının fiziksel ajanlarla indüklenmesinin kimyasal ajanlara kıyasla birçok avantajı vardır. Öncelikle dozlamada oluşabilecek problemlerin önlenmesinin yanısıra, hücre alım ve kimyasalların metabolizasyonundaki polimorfizmden kaynaklanabilecek farklılıklar da elimine edilmiş olur<sup>145</sup>. Ayrıca radyasyon genotoksitesinin günümüze kadar çok çalışılmış bir konu olması, oluşturduğu doz-cevap eğrileri indüklemeye seçilecek dozun rahatça belirlenebilmesini mümkün kılar<sup>149</sup>. Biz de tüm bu avantajlarından dolayı Challenge tekniğinde indükleyici olarak bir fiziksel ajan olan X- ışınlarını kullandık.

Hasarlı DNA'nın onarılamaması kanser oluşumunun temel mekanizması olarak kabul edilir. Bu olay DNA onarım yetersizliğini ve kansere yatkınlığı dolayısıyla bireysel duyarlılığı belgeler. Çünkü hücrelerin farklı genlerdeki hasarı onarmada farklı etkinlikleri vardır. Genel DNA onarım yetersizlikleri spesifik genlerde mutasyon meydana



getirebilir<sup>150</sup>. Bununla birlikte DNA onarım hatasını saptayabilmek için kesin ve basit bir yöntem mevcut değildir. DNA onarım problemlerini saptayabilmek için sitogenetik teknikler temel alınarak Challenge tekniği geliştirilmiştir<sup>145,147</sup>.

Challenge tekniği ile kombine olarak kromozomal aberasyon yönteminin yanısıra comet tekniği de yaygın kullanıma sahiptir. Son yıllarda periferal kan lenfositlerinde Comet tekniğinin challenge tekniği ile kombine kullanımı yöntemin hızlı ve güvenilir olması nedeniyle tercih edilmektedir<sup>21</sup>.

Belirli bir radyasyon dozunun hücreler arasında küçük farklılıklar göstermekle birlikte, DNA'da standart miktarda hasar oluşturacağı düşünülür. Hücrelerin radyasyona duyarlılıklarındaki farklılıklar, tamamını "onarım" olarak adlandırdığımız hasarın biyolojik prosesine bağlıdır<sup>145</sup>.

Hücrelerin iyonizan radyasyona maruz bırakılması ile tek sarmal kırıkları (SSB), çift sarmal kırıkları (DSB), şeker hasarı, DNA-DNA çapraz bağlanması (DDC), DNA-protein çapraz bağlanması (DPC) ve baz hasarları gibi çok çeşitli hasarlar gözlenir<sup>149</sup>.

İnsan periferal kan lenfositlerinde sitogenetik analizler çeşitli klastojenlere maruziyetin belirlenmesi ve değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanıldığı gibi radyasyon biyodozimetrisinde de tercih edilmektedir. Challenge yönteminde kombine edilecek yöntemlere göre doz seçilmesi gerekir. Düşük doz radyasyonun DNA tek sarmal kırıklarına sebep olduğu bilinmektedir. Alkali comet tekniği düşük dozdaki X-ışınlarının indüklediği genotoksik etkiyi belirleyebilecek kadar duyarlı bir yöntemdir<sup>149</sup>.

Biz çalışmamızda tek sarmal kırıklarını belirlemek amacıyla alkali comet tekniğini challenge tekniği ile birlikte kullandık. Yaptığımız ön çalışmalar neticesinde indüklenme dozunu 1Gy olarak belirledik.

### **III. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **III.1.Çalışma ve Kontrol Grubunun Seçilmesi**

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine çeşitli sebeplerle başvuran kadınlardan alınan servikal sürüntü örnekleri HPV tiplmeleri yapılmak üzere Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırılmıştır. HPV tiplemesi sonucunda HPV tip 16 ve 18 pozitif teşhisi konmuş servikal neoplaziler dışında malign bir hastalığı olmayan hastalar çalışma hakkında bilgilendirilmiş, katılmayı kabul edenler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine

kan ve servikal sürüntü örneklerini vermek üzere geri çağrılmışlardır. Hastalardan alınan servikal sürüntü örneklerinde zamanla enfeksiyonun kaybolması olasılığına karşılık HPV tipleme testi tekrar edilmiştir. Papsmear testini takiben kolposkopi eşliğinde biyopsi örnekleri alınıp patolojik değerlendirme yapılmıştır.

Kontrol grubu rutin kontrol amacıyla polikliniğe başvuran, yaşları, sigara içme alışkanlıkları ve yaşam tarzları çalışma grubu ile uyumlu olacak şekilde mesleki olarak herhangi bir genotoksik maddeye maruz kalmamış sağlıklı kadın bireylerden oluşturulmuştur. Kontrol grubunu oluşturan kadınlara da papsmear testi uygulanmıştır. HPV enfeksiyonunun olmadığından emin olmak amacıyla HPV tipleme testi yapılmıştır.

Tüm bireysel duyarlılık ve genotoksikite testleri Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır.

Çalışmamızda toplam 31 HPV 16 pozitif, 23 HPV 18 pozitif birey ve yaşları ve sigara içme durumları uyumlu 24 HPV negatif birey (kontrol grubu) yer almıştır.

Çalışmada değerlendirilecek tüm parametrelerin tespiti amacıyla; menopoz durumu, yaş, ilk koit yaşı, partner sayısı, gebelik sayısı, partnerde HPV öyküsü, sigara kullanımı, ilaç kullanımı, bireyde ve partnerinde cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü gibi soruları içeren, anket formları tüm bireylere araştırmacının kendisi tarafından sorular hastalara tek tek yöneltilerek uygulanmıştır.

HPV pozitif bireylere ve kontrol grubuna uygulanan anket formlarının bir örneği Form 1'de verilmiştir.

Tablo III.1'de deney ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin genel özellikleri gösterilmiştir.

#### ANKET FORMU

Kod:

HPV 16  HPV 18  HPV (-)

Adı Soyadı:

...../...../.....

Yaşı:

Tel:

1. Çalıştığı yer, görevi? .....Süresi:.....
2. Sigara içiyor musunuz? Evet  Hayır  Bıraktım   
Cevabınız evetse miktarı (adet/gün):.....  
Kaç yıldır içiyorsunuz?.....  
Bıraktıysanız ne zaman?.....  
Sürekli sigara içilen ortamda bulunuyorum
3. Alkol kullanma alışkanlığınız var mı? Evet  Hayır   
Ne sıklıkta; Hergün  Haftada bir  Ayda bir   
Nadiren   
Miktarı:.....
4. Sürekli kullandığınız ilaç/vitamin var mı? Evet  Hayır   
Adı:.....
5. Beslenme alışkanlığı:  
Et ağırlıklı  Sebze-meyve ağırlıklı  Kızartma ağırlıklı  Dengeli
6. En son ne zaman ne amaçla, kaç kez röntgen filmi çektirdiniz? (diş dahil)  
.....
7. İlk menstruasyon yaşı?..... Son menstruasyon tarihi:.....

8. Menapozal durumu:  
Premenopozal  Postmenopozal  .....aydır/yıldır.  
Hormon Replasman Tedavisi;  
Kullandım .....ay/yıl süreyle.....kullandım  
Halen kullanmaktayım  .....ay/yıldır.....kullanmaktayım  
Hiç kullanmadım
9. Hangi sıklıkta jinekolojik muayene oluyorsunuz?.....  
Pap-Smear testini ne sıklıkta yaptırıyorsunuz?.....  
En son ne zaman yaptırmıştınız?.....
10. Eğer HPV (+) ise ilk teşhis tarihi? Bununla ilgili hiç tedavi gördünüz mü?  
.....
11. Medeni hali:
12. Yaşamboyu cinsel partner sayısı: 0  1  >1
13. İlk koit yaşı: .....
14. Tam zamanlı hamilelik sayısı?..... Düşük sayısı.....
15. Genital siğil oluşumu hikayesi?.....Partnerinde genital siğil oluşumu hikayesi?.....  
Cinsel yolla bulaşan hastalık hikayesi?.....
16. Oral kontraseptif kullanımı;  
Kullandım .....ay/yıl süreyle.....kullandım  
Halen kullanmaktayım  .....ay/yıldır.....kullanmaktayım  
Hiç kullanmadım
17. Aile bireylerinde/sizde genetik bir hastalık var mı?  
.....
18. Patoloji gelişimi: .....

**Tablo III.1** Deney ve Kontrol Grubunu oluşturan bireylerin genel özellikleri:

	Toplam HPV (+) (n= 54)			Kor gru (n=) HPV
	HPV Tipe (+) (n=)	HPV 18 (+) (n=23)	Toplam HPV (n=)	
<b>Yaş (Ortalama ± SS)</b>	37,1 ± 6,1	36,13 5,6	37,1 6,1	36,1 5,1
<b>Patoloji</b>	<b>Pozitif</b>	11	2	0
<b>(n)</b>	<b>Negatif</b>	12	3	2
<b>Sigaret</b>	<b>İçen</b>	7	1	1
<b>(n)</b>	<b>İçmeye</b>	16	3	1
<b>Doğum</b>	<b>Yapan</b>	19	4	1
<b>(n)</b>	<b>Yapma</b>	4	1	0
<b>İlk</b>	<b>&lt;20</b>	15	3	1
<b>yaş</b>	<b>&gt;20</b>	8	1	1

### III.2. Biyolojik Materyallerin Toplanması

Çalışmamızda deney ve kontrol grubundan servikal sürüntü örnekleri ve periferal kan örnekleri toplanmıştır.

Periferal kan örnekleri genotoksisite yöntemleri uygulanmak üzere heparinli enjektör içine alınmıştır. Servikal sürüntü örnekleri ise HPV tiplemesinin yapılması ve HPV enfeksiyonunda kanserinde hedef hücre grubunu oluşturan servikal sürüntü hücrelerinde comet yönteminin uygulanması amacıyla alınmıştır.

Servikal sürüntü örnekleri steril eküvyonlarla alınmıştır. Eküvyonlar içinde steril fosfat buffer saline (PBS) bulunan steril tüplere alınmıştır. Örneklerden biri HPV tiplemesi yapılmak üzere Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiş diğeri ise buz içinde muhafaza edilerek Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi F.Toksikoloji Anabilim Dalı laboratuvarına comet yöntemi uygulanmak üzere ulaştırılmıştır.

HPV tiplemesi için eküvyonla alınan servikal örnekler yaklaşık 1-2 dakika süre ile vortekslendikten sonra eküvyon tüpten çıkartılarak PBS içindeki örnek 1,5 mL'lik ependorf tüplere aktarılmıştır. Örnekler çalışma zamanına kadar -86°C'de saklanmıştır.

Tüm bireysel duyarlılık ve genotoksisite testleri Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Anabilim Dalı laboratuvarında örneklerin alındığı gün çalışılmıştır.

**Tablo III.2** Toplanan biyolojik materyallerde uygulanan yöntemler

<b>Biyolojik Materyal</b>	<b>Uygulanan Yöntem</b>
	Comet Yöntemi
Periferal kan	Kromozomal Aberasyon Yöntemi
	Challenge Yöntemi
Servikal sürüntü hücreleri	HPV tiplemesi
	Comet Yöntemi

### III.3 HPV tiplemesi

Servikal sürüntülerden DNA izolasyonu ve HPV tiplemesi Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında yapılmıştır.

#### III.3.1 Yöntemde Kullanılan Aletler

- Otoklav (Hirayama, Japonya)
- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu, -20°C (Bosch, Almanya)
- Buzdolabı (Philco, Türkiye)
- Laminar flow (Metisafe, Metis Biyoteknoloji, Türkiye)
- 10, 100, 1000 µL'lik mikropipetler (Gilson, Fransa)
- Mikropipet uçları (CLP, ABD)
- Mikrosantrifüj (Heraeus, Almanya)
- 0,2-0,5-1,5 µL'lik ependorf tüpler (Greiner Bio-One, Almanya)
- Kuru blok (Thermolyne, ABD)
- Hassas terazi (Shimadzu, Japonya)
- pH metre (Fisher Scientific, ABD)
- Vorteks cihazı (VELP, Scientifica, İtalya)
- Sıcak su banyosu (MEKA, Türkiye)



- Thermal cycler cihazı (Hybaid, Birleşik Krallık)
- Real Time PCR cihazı (LightCycler (LC), Roche, Almanya)

### **III.3.2 Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler**

#### **DNA eldesinde kullanılan kimyasallar**

- Sodyum klorür (NaCl) (AppliChem)
- Potasyum klorür (Merck)
- Disodyum hidrojen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Merck)
- Potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Merck)
- Trisma hidroklorür (Amresco, ABD)
- Sodyum etilen diamin tetra asetik asit (Sigma)
- Sodyum dodesyl sülfat (SDS) (Sigma)
- Proteinaz K (Roche)
- Fenol (Amresco)
- Kloroform (Merck)
- İzoamil alkol (AppliChem)
- % 100 etanol (Kimetsan)
- Sodyum asetat (Merck)
- Glasiel asetik asit (Sigma)
- Sodyum hidroksit, NaOH (Merck)

#### **Birinci tur çoğaltmada (amplifikasyon) kullanılan kimyasallar**

- Primer dizileri: MY09/MY11 primer seti (Tıbbi Molbiol, Almanya)

- (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'),
- (5'-CMCAGGGWCATAAYAATGG-3')
- MgCl<sub>2</sub> (Genesys, Birleşik Krallık)
- KCl<sub>2</sub> (Genesys, Birleşik Krallık)
- Tris HCl (Genesys, Birleşik Krallık)
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Genesys, Birleşik Krallık)
- Taq DNA polimeraz enzimi (DNA mp ltd., Hants, Birleşik Krallık)

### HPV tip 16 LC aşamasında kullanılan kimyasallar

- PCR grade H<sub>2</sub>O (Roche, Almanya)
- MgCl<sub>2</sub> (Metis Bioteknoloji, Türkiye)
- SYBR Green I (Roche, Almanya)
- HPV 16 LC probe mix (Cy5.0 işaretli prob (0.2 µM) Probe  
5' Cy5-GTTTCTGAAGTAGATATGGCAGCACA-biotin 3' (Tıbmolbiol)
- HPV 16 LC primer mix (forward ve reverse primer) (0.5 µM)
  - F: 5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3', (Tıbmolbiol, Almanya)
  - R: 5' GAAAATAAACTGTAAATCATATTC 3' (Tıbmolbiol, Almanya)

### III.3.3 Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- **PBS:**
  - 8 gr NaCl,
  - 0.2 gr KCl,
  - 1.15 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,
  - 0.2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....1000mL distile su i

pH= 7.4'e ayarlanıp +4 °C'de saklanır.
- **Lizis solusyonu:**
  - SDS (%0.1'lik),

EDTA (0,37 gr),

Trisma hidroklorür (0,24 gr).....100 mL distile su

NaOH ile pH=8'e ayarlanmıştır. Hazırlanan solüsyon otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan solüsyon soğuduktan sonra içine 10 µL (0.1mg/ml) Proteinaz K ilave edilmiş ve ekstraksiyon aşamasında kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

- **Kloroform izoamil alkol:** 24:1 oranında kloroform:izoamil-alkol karışımı hazırlanmış ve ekstraksiyon aşamasında kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

- **%70 etanol:** 70 mL mutlak etil alkol 30 mL distile suyla karıştırılmış ve ekstraksiyon aşamasında kullanılmak üzere buzlukta saklanmıştır.

- **3M Sodyum asetat:** 10 mL distile su içinde 500 µL (3 Molar) Sodyum asetat eritildikten sonra pH metre kontrolünde glasiel asetik asitle pH=5.2'ye ayarlanmış ve ekstraksiyon aşamasında kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

### III.3.4 Yöntemin Uygulanışı

HPV tiplemesi Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında oturtulmuş protokol kullanılarak<sup>151</sup> Anabilim Dalı araştırmacıları tarafından uygulanmıştır.

### DNA saflaştırılması (ekstraksiyon)

- 1) Örnekler 2-3 dakika 10000 rpm.'de santrifüj edildikten sonra üst sıvı tamamen uzaklaştırılmıştır.

2) Çökelek üzerine 500 µL 0.1 mg/ml proteinaz K içeren lizis solüsyonu (20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, % 0.1 SDS) ve 15 µL (18 mg/mL) proteinaz K eklendikten sonra, pipetajla homojenize edilip 3 saat 55°C'de bekletilmiştir.

3) Daha sonra 95°C'de 10 dakika bekletilen örnekler 500 µL fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) eklenerek vorteks sonrası 12.500 rpm'de 3 dakika süreyle santrifüj edilmiştir.

4) Ependorf tüpünde santrifüj sonrası oluşan üst faz başka bir ependorfa aktarıldıktan sonra üzerine 500 µL kloroform-izoamilalkol (24:1) eklenerek vorteks sonrası 12.500 rpm'de 3 dakika süreyle santrifüj edilmiştir.

5) Santrifüj sonrası ependorf tüpte oluşan üst faz başka bir ependorfa aktararak üzerine 1000 µL % 100 etil alkol ve 50 µL 3 M sodyum asetat eklenerek - 86°C'de bir gece bekletilerek çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir.

6) Ertesi gün tüpler - 86°C'den alınarak 15 dakika süreyle 12.500 rpm'de santrifüj edilmiştir.

7) Santrifüj sonrası tüplerdeki etanol dökülmüş ve üzerlerine 500 µL % 70 etil alkol eklenerek vorteks sonrası 12.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

8) Ependorf içeriği boşaltılıp ependorflar en az 10 dakika süreyle laminar flow içinde kurutulmuştur.

9) Çökelek üzerine 50 µl steril deiyonize su ilave edilerek kuru blok'da 55°C'de en az 10 dakika süreyle süspanse edilmiştir.

10) Süspanse edilen örnekler hemen çoğaltma işlemine alınmışlardır.

11) Her çalışmada hasta örneği yerine distile su kullanılan bir negatif kontrol ve HPV DNA içeren bir pozitif kontrol kullanılmıştır.

#### **DNA'nın çoğaltılması**

**1. tur çoğaltma:** Bu çalışmada kullanılan primerler çok sayıda HPV genotipi için ortak olan genel primerlerdir. HPV genomunun L1 (major viral kapsid proteini yapımıyla görevli) bölgesinden seçilmiştir. Primerler Tıbbi Molbiol (Berlin, Almanya)'de sentez ettirilmiştir. HPV primer seti olarak MY09 ve MY11 seti (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'), (5'-CMCAGGGWCATAAYAATGG-3') 452 bp uzunluğunda segmentleri çoğaltmaktadır . Çoğaltma işlemi; 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris HCl (pH 9) içinde her dNTP'den 100 µM (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), her primerden 100 pmol ve 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi (DNA mp ltd., Hants, Birleşik Krallık) içeren 45 µl olarak hazırlanan karışım içerisine saflaştırılmış 5 µl DNA eklenerek gerçekleştirilmiştir.

#### 1. tur çoğaltma Thermal Cyclers Programı

Derece	Süre	Siklus Sayısı
94°C	5dk	1
94°C	20 sn	35
55°C	45 sn	
72°C	60 sn	
72°C	7 dk	1

#### HPV tip 16 LC yöntemi:

HPV tip16' yı belirlemek üzere Roche LightCycler sistemi kullanılmıştır.

Real Time PCR master miksi içeriği;

- 1.4µl MgCl<sub>2</sub> (4 mM),
- 0.5µl Forward primer 5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3',
- 0.5µl Reverse primer R 5' GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC 3'
- 0.5µl Probe 5' Cy5-GTTTCTGAAGTAGATATGGCAGCACA-biotin 3'
- 1µl LC- FastStart DNA SyberGreen I

Master mix 10x (Roche Diagnostics, Almanya) şeklinde hazırlanarak, LightCycler (Roche, Almanya) cihazına koyulur.

95°C de 10 dk, denatürasyon, 10 sn 95°C, 6 sn 55°C, 10 sn 72°C de amplifikasyon, 95°C de 0 sn, 55°C de 10 sn, 92°C de 0 sn, 0.2 cont. Erime eğrisi analizi programında amplifikasyonu yapılmıştır.

Erime eğrisi analizi programında amplifikasyonu yapılmıştır. Veri analizleri LightCycler Software version 3.5.3. ile yapılmıştır. 78°C±2 değerleri HPV 16 açısından pozitif, 83°C±2 değerleri de HPV 16 harici tipler açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir.

#### **HPV tip 18 tespiti:**

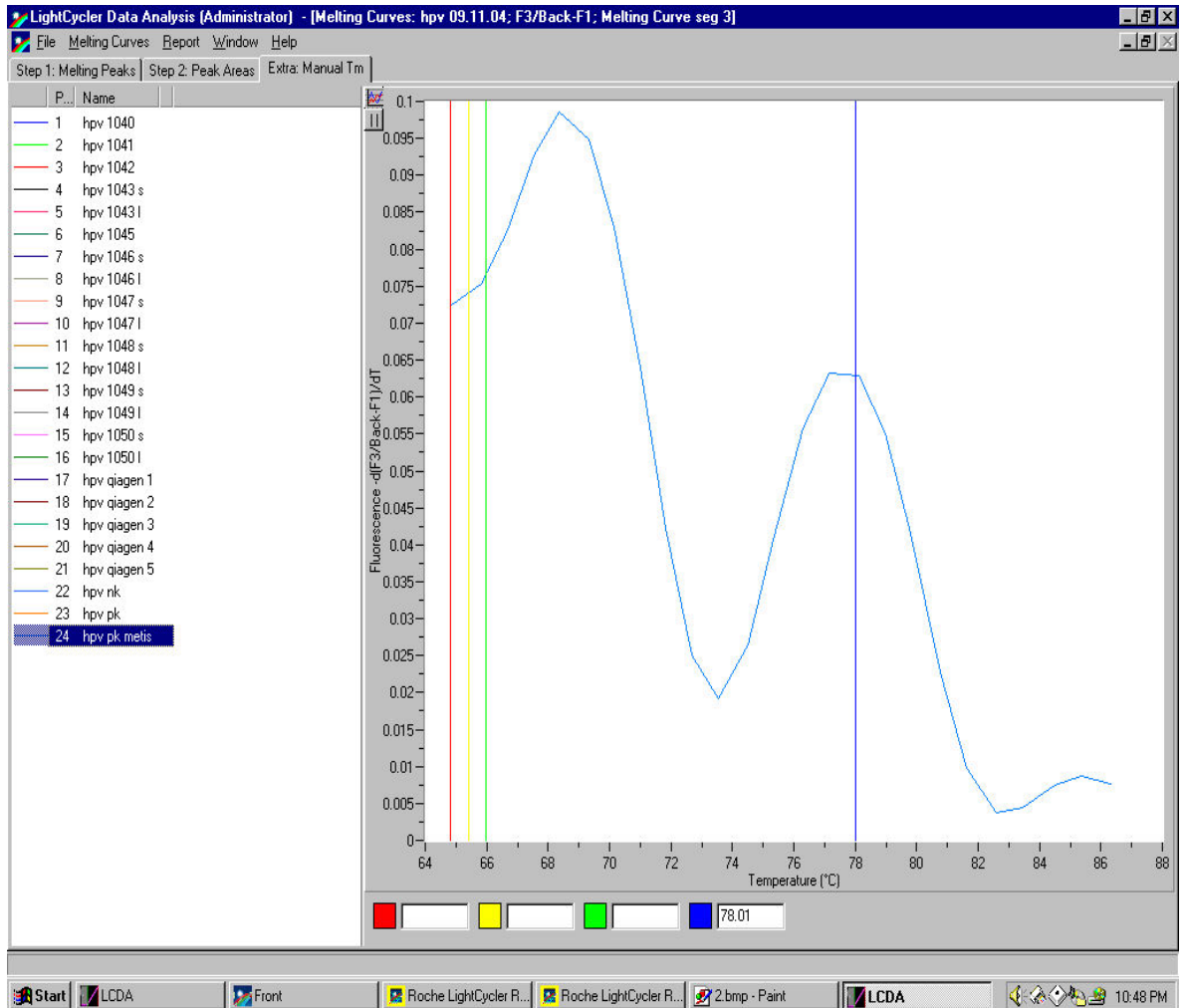
83°C±2 değerlerinde pik veren örnekler jel elektroforezinde pozitif kontroller varlığında çalışılmıştır.

Amplifikasyon karışımı bir reaksiyon için; 45µl Amp mix HPV 18 ve 0.2 µl Taq DNA polimeraz olacak şekilde hazırlanır ve hafifçe vortekslenirp spin santrifüj edilir. Amplifikasyon karışımı PCR tüplerine 45'er µl olacak şekilde dağıtılır. Her PCR tüpünün üzerine çalışılacak 1.tur örneğinden 5 µl eklenir. Aşağıda belirtilen programda thermal cycler'a koyulur.

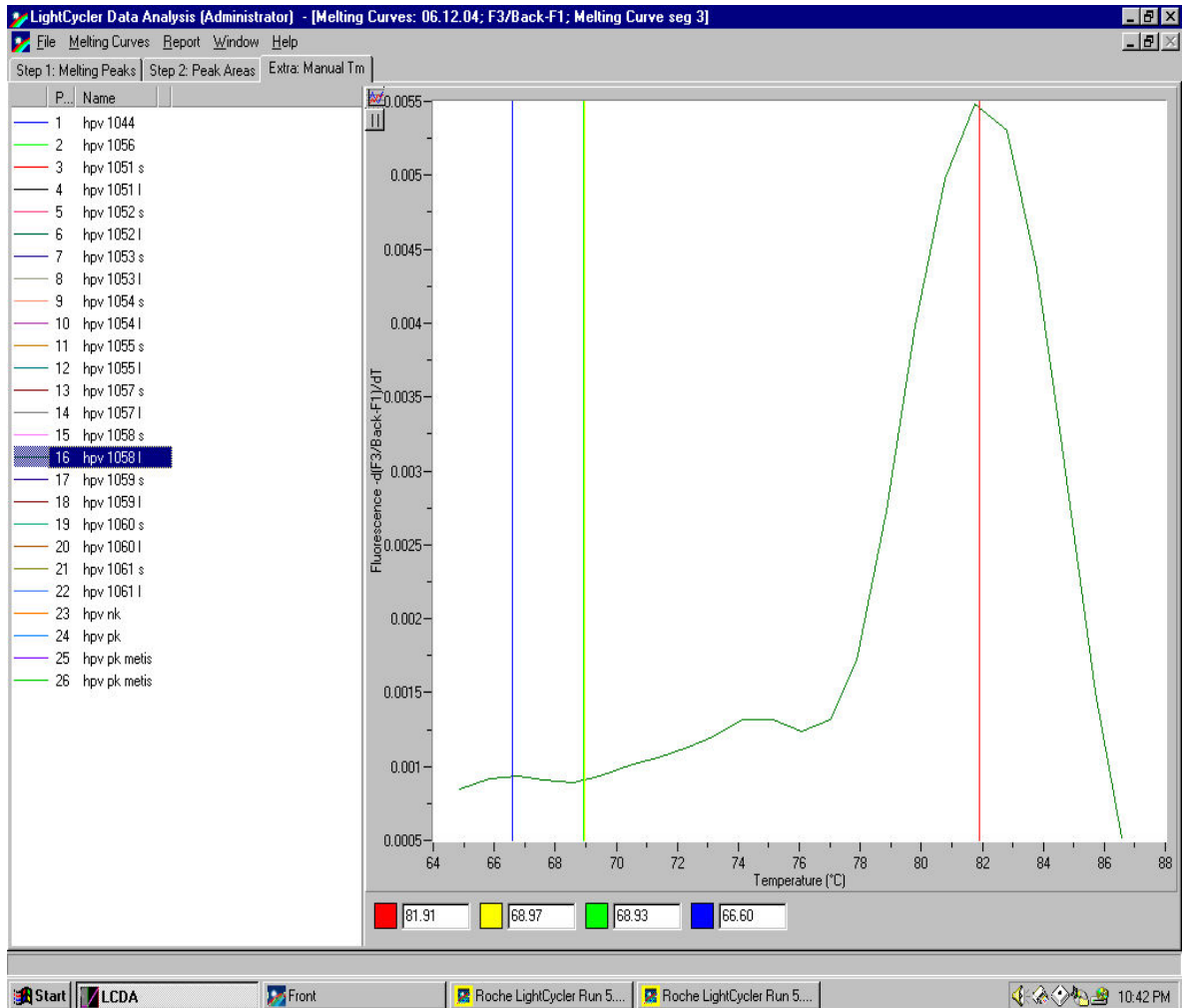
#### **2.tur HPV 18 Thermal Cycler Programı**

<b>Derece</b>	<b>Süre</b>	<b>Siklus Sayısı</b>
94°C	5dk	1
94°C	20 sn	35
50°C	45 sn	
72°C	60 sn	
72°C	5 dk	1

Amplifikasyon ürünleri Ethidium bromide içeren %2 Agaroz jel elektroforez sonrası UV transilluminatorde HPV tip 18 için 100 bç büyüklüğünde band aranarak pozitif ve negatif kontroller ile birlikte analiz edilir.



Şekil III.1 Real- Time PCR'da HPV tip 16 erime eğrisi<sup>151</sup>.





**Şekil III.2** Real Time PCR'da HPV 16 dışındaki tiplerin erime eğrisi<sup>151</sup>.

### **III.4 Kromozomal Aberasyon Yöntemi**

#### **III.4.1 Yöntemde Kullanılan Aletler**

- 37<sup>0</sup>C'lik inkübatör
- Laminar flow kabini (Ttans Türk-LFBH 4000)
- Santrifüj (Nüve)
- Vorteks (Fırlabo)
- Dijital üstten kefeli terazi (Sartorius)
- Cam şale
- Traşlı lam
- Steril kapaklı kromozom tüpü (TPP-91015)
- Steril enjektörler (5cc, 10cc, 20cc)
- Cam pastör pipeti
- Steril lateks eldiven
- Fotograf makinalı mikroskop (Zeiss)

#### **III.4.2 Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- RPMI 1640 Besiyeri (Biological Ind.-Kat.No:01-106-1B)

- Fetal Calf Serumu (Biological Ind.-Kat.No:04-001-1B)
- Fitohemaglutinin (Biological Ind.-Kat.No:12-006-1H)
- L-Glutamin (Sigma Chem. Com. No:G-6392)
- Antibiyotik (Streptomisin/Penisilin, Sigma)
- Heparin (Roche)
- Kolsemid Çözeltisi (Biochrom-Kat.No:L-6221)
- Potasyum Klorür (Merck)
- Metanol (Merck)
- Asetik Asit (Merck)
- Giemsa (Merck Giemsas Lösung Kat.No:9204)

#### **III.4.3 Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

- **Hipotonik Çözelti (0.075M KCl)**

5.592g KCl (potasyum klorür) 1000mL distile suda çözülür.

- **Fiksatif Çözelti**

1 kısım glasiyel asetik asit üzerine 3 kısım metanol ilave edilerek iyice karıştırılır. Çözelti daima taze olarak hazırlanır ve buzlukta soğutulularak kullanılır.

#### **III.4.4 Yöntemin Uygulanışı**

##### **Kromozom Kültürünün Hazırlanması:**

100 mL'lik şişelerdeki RPMI-1640 besiyeri üzerine kültür ortamını zenginleştirmek amacıyla 25cc FCS ve 0.75cc L-Glutamin laminar flow altında ilave edildi. Kültür ortamına mitotik indüksiyonu sağlamak amacıyla 2.5cc fitohemaglutinin ve kontaminasyon riskine karşı 1.3cc antibiyotik eklendi. Hazırlanan vasat altüst edilerek karıştırıldı ve kullanılacağı zamana kadar buzlukta saklandı.

Dondurulmuş vasat etüvde 37<sup>0</sup>C'ye getirildi. 0.5ml kan içeren kromozom tüplerine steril enjektör yardımıyla her tüpte 5'er ml olmak kaydıyla ilave edildi. Kromozom tüpleri hücrelerin daha iyi üremesi için yatay şekilde 37<sup>0</sup>C'lik etüvde 48 saat sürecek inkübasyona bırakıldı. Kırkbeşinci saat sonunda her tüpe 2 damla kolsemid ilave edilerek 3 saat daha inkübasyona bırakıldı. Kırksekizinci saatin sonunda 10 dakika 1000rpm'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı su trompuyla atıldı. Çökelti üzerine 0.0075M potasyum klorürden 5ml vorteks üzerinde karıştırılarak eklendi. Tüpler 25 dakika 37<sup>0</sup>C'lik etüvde bekletildi. 1000rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant kısmı atıldı ve buzlukta bekleyen taze hazırlanmış fiksatif çözeltisinden (3 kısım metanol / 1 kısım asetik asit) vorteks üzerinde damla damla 5ml ilave edildi. 10 dakika 1000rpm'de santrifüjlenerek süpernatant kısmı atıldı. Bu işleme dipteki pellet iyice beyazlaşana kadar devam edildi.

Fiksasyon neticesinde tüpün dibinde pellet şeklinde kalan hücreler cam pastör pipetiyle pipetaj yapılarak karıştırıldı. Distile su içinde buzdolabında soğutulmuş lamlar iyice kurulandıktan sonra 30cm yükseklikten 3-4 damla süspansiyon damlatıldı. Damlanın iyice yayılmasıyla lamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Çalışma süresince her birey için 3 lama yayım yapıldı.

### **Lamların Boyanması ve Değerlendirilmesi**

4ml Giemsa boyası distile su ile 100ml'ye tamamlanarak %4'lük Giemsa boyama çözeltisi hazırlandı. Lamlar Giemsa boyama çözeltisi içinde 20 dakika bekletildi. Boyamanın tamamlandığına karar verilince şale akan suyun altında 5 dakika tutuldu. Daha sonra lamlar son bir defa distile su ile yıkanıp oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Boyanmış metafazlar, yapısal kromozomal bozuklukları (kromozomal aberasyonları) belirleyebilmek amacıyla ışık mikroskopunda 16x100'lük objektif altında immersiyon yağıyla incelendi. Her birey için 100 iyi kalite metafaz değerlendirildi.

### **III.5 Comet Yöntemi**

#### **III.5.1 Yöntemde Kullanılan Aletler**

- Dijital üstten kefeli terazi (Sartorius)
- pH metre (Sartorius)
- Soğutmalı santrifüj (Nüve)
- Elektroforez tankı
- Otomatik mikropipetler (Rainen)
- Traşlı lam
- Lamel (32x64 boyutunda)
- 1.5 ml ependorf tüpü
- Plastik pastör pipeti
- Steril lateks eldiven
- Parafilm
- Cam şale
- Floresan ataçmanlı mikroskop (Zeiss Axioscope2)
- Mikrodalga fırın
- Buzdolabı

#### **III.5.2 Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- DMSO(Merck)
- NaCl(Merck)
- KCl(Merck)
- NaOH(Merck)
- Histopaque 1077(Sigma, 1077-1)
- Etidyum Bromide(Sigma, E-8751)
- Triton-X 100(Sigma, 9002-93-1)
- EDTA (Sigma, ED2SS)
- Trizma Base (Sigma, T-1503)
- HMA (Sigma, A-7174)
- LMA (Sigma, A-4018)
- Fosfat tampon (PBS) tabletleri (Sigma, P-4417)

### III.5.3 Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- **Fosfat Tamponu (PBS)**

1 tane PBS tableti 200 ml distile suda çözülür ve +4<sup>0</sup>C'de saklanır.

- **10 M NaOH çözeltisi**

NaOH .....400 g

Distile su.....ym 1000 ml

- **0.2 M EDTA çözeltisi**

EDTA.....74.4 g

Distile su.....ym 1000 ml

- **10 M KOH çözeltisi**

KOH.....561,1 g

Distile su .....ym 1000 ml

- **Stok 100 ug/ml Etidyum Bromür Çözeltisi**

EB.....5 mg

Distile su.....ym 50 ml

Hazırlanan stok çözelti +4<sup>0</sup>C'de saklanır. Lamlar boyanacağı zaman çözelti 1:4 oranında distile su ile seyreltilip kullanılır.

- **Stok Lizis çözeltisi**

2.5 M NaCl .....146.1 g

100 mM EDTA.....37.2 g

10 mM Tris.....1.2 g

Distile su.....ym 900 ml

Çözeltinin pH'sı 10 M NaOH ile pH=10'a ayarlanır. Hazırlanan stok lizis çözeltisi oda sıcaklığında saklanır. Kullanmadan önce her 100 ml çözelti için 1 mL Triton X ve 10 mL DMSO ilave edilir.

- **Elektroforez Tamponu (%3 NaOH, %0,5 EDTA)**

0.3 M NaOH..... 37.5 ml

1 mM EDTA..... 6.75 ml

Distile su.....ym 1250 ml

- **Nötralizasyon tamponu**

0.4 M Tris..... 48.5 g

Distile su .....ym 1000 ml

Çözeltinin pH'sı konsantre HCl ile pH=7,5'e ayarlanır .

- **Düşük kaynama dereceli agar (%0.65)**

PBS içinde hazırlanır

- **Yüksek kaynama dereceli agar (%0.65)**

Distile su içinde hazırlanır.

### III.5.4 Periferel Kan Lenfositlerinde Comet Yöntemi Uygulanışı

Çalışmaya başlanmadan önce % 0.65'lik HMA distile suda hazırlanır. Lamlar agara batırılır, oda sıcaklığında kurutulur. Her örnek için iki lam çalışılmıştır. Her lam için bir ependorf tüpüne 1'er ml PBS konur (+4°C). 100 ul kan tüplerdeki PBS (+4°C) üzerine eklenir. Karıştırılır ve 10-15 dakika bekletilir. 100ul Lymphoprep tüpün dibine eklenir. 1060 rpm, +4°C'de 3 dakika santrifüj edilir. Tripan Mavisi Canlılık testi izole edilen lenfositlere uygulandığında canlılık oranları  $\geq 99\%$  olarak tespit edilmiştir. Ayrılan lenfositler den 100µl alınır. Hücreler 37°C'deki 100 µl PBS içinde hazırlanmış % 0.65'lik LMA ile karıştırılarak önceden HMA ile kaplanıp kurutulmuş lama yayılır. 32x64 lamelle kapatılarak buzdolabında agar katılaşana kadar bekletilir. Lamel lamenin yüzeyinden çekilerek lysis solüsyonunda bir gece +4°C'de bekletilir. Soğuk elektroforez çözeltisi tankın içine doldurulur. 25 Volt 300mA olacak şekilde çözelti miktarı ayarlanır. Lamlar tank içinde 20 dakika bekletilir. 20 dk 25 V, 300 mA'de elektroforez uygulanır. Elektroforezden çıkartılan lamlar 3 defa nötralizasyon tamponunda 5'er dakika bekletilerek nötralize edilir. Lamlar 50 µl EB ile boyanır. Değerlendirme *Comet Görüntü Analiz Programı* (COMET III, Perceptives-UK) programı kullanılarak yapılmıştır.

### **III.5.5 Servikal Sürüntü Hücrelerinde Comet Yöntemi Uygulanışı**

Çalışmaya başlanmadan önce % 0.65'lik HMA distile suda hazırlanır. Lamlar agara batırılır, oda sıcaklığında kurutulur. Her örnek için iki lam çalışılmıştır.

PBS içine alınmış servikal sürüntü hücreleri 1060 rpm, +4°C'de 3 dakika santrifüjlenir. Üstteki kısım atılır ve Tripan Mavisi Canlılık testi uygulanır. Tüm servikal sürüntü hücrelerinde yaklaşık %65-80 oranında canlılık tespit edilmiştir. Canlılığın daha düşük olduğu örneklerde çalışılmamıştır.

Hücreler 37°C'deki 100 µl PBS içinde hazırlanmış % 0.65'lik LMA ile karıştırılarak önceden HMA ile kaplanıp kurutulmuş lama yayılır. 32x64 lamelle

kapatılarak buzdolabında agar katılaşana kadar bekletilir. Lamel lamın yüzeyinden çekilerek lysis solüsyonunda bir gece +4°C'de bekletilir. Soğuk elektroforez çözeltisi tankın içine doldurulur. 25 Volt 300mA olacak şekilde çözelti miktarı ayarlanır. Lamalar tank içinde 40 dakika bekletilir. 20 dk 25 V, 300 mA'de elektroforez uygulanır. Elektroforezden çıkartılan lamalar 3 defa nötralizasyon tamponu 5'er dakika bekletilerek nötralize edilir. Lamalar 50 µl EB ile boyanır. Değerlendirme *Comet Görüntü Analiz Programı* (COMET III, Perceptives-UK) programı kullanılarak yapılmıştır.

### **III.6. Challenge Tekniği**

Challenge tekniği Cebulska-Wasilewska'nın protokolü temel alınarak comet yöntemi ile birlikte uygulanmıştır<sup>21</sup>.

#### **III.6.1. Test İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Comet yöntemiyle aynı kimyasal maddeler kullanılmıştır.

#### **III.6.2. Test İçin Kullanılan Alet ve Malzemeler**

Comet yönteminden farklı olarak;

- Cam su banyosu
- Termometre
- X-ışını makinesi (Saturn 43-700) kullanılmıştır.

#### **III.6.3. Test İçin Kullanılan Çözeltiler**

Comet yöntemiyle aynı çözeltiler kullanılmıştır.

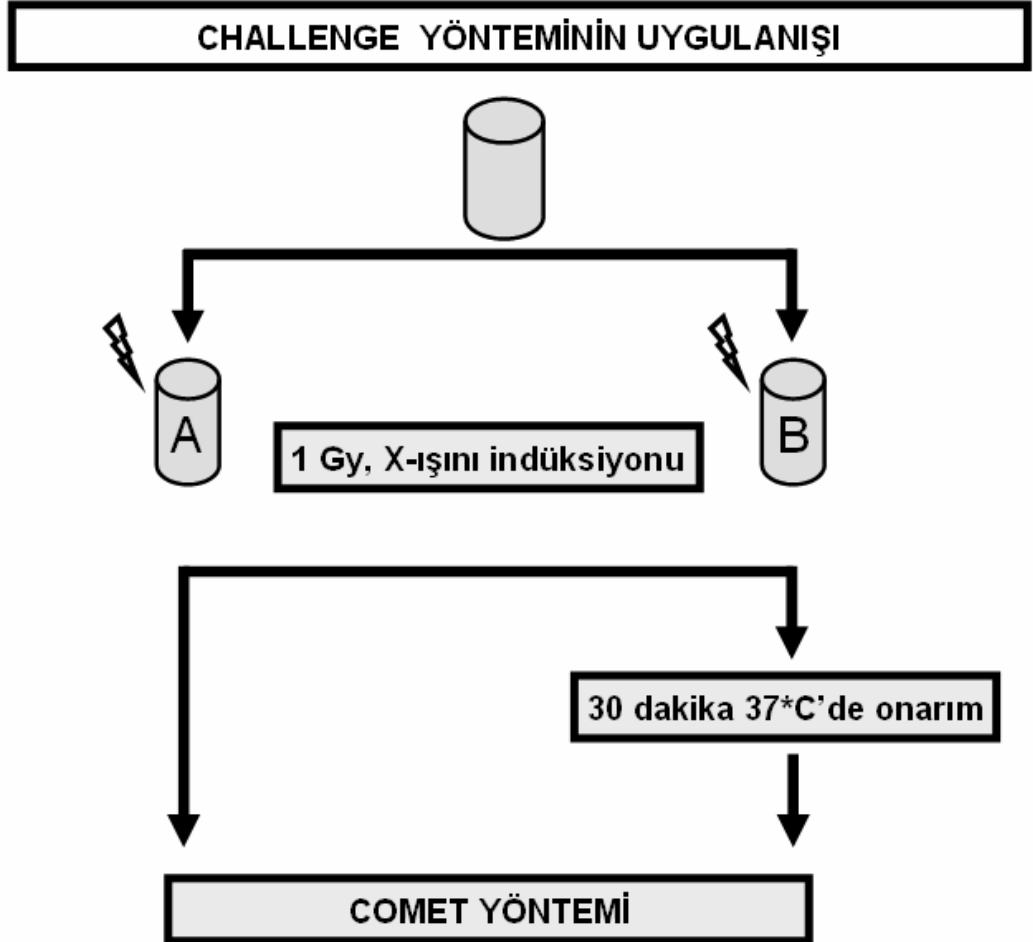


### III.6.4. Tekniğin Uygulanışı

Heparinli enjektöre alınmış 0.5ml kan steril kromozom tüplerine aktarılır. 1Gy dozda X-ışını ile yaklaşık 30sn süre ile vücut ısısını taklit etmesi amacıyla 37<sup>0</sup>C'lik suyla doldurulmuş cam su banyosunun içinde indüklenmiştir. İndükleme işlemi Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Kan örneği iki ependorfa bölünür. Ependorfların biri 37<sup>0</sup>C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra comet yöntemi uygulanırken diğeri comet tekniği uygulanmak üzere hemen çalışır.

Şekil III.3'de Challenge yönteminin uygulanışı ve %DNA onarım kapasitesinin hesaplanması gösterilmiştir.



$$\% \text{ DNA onarım kapasitesi} = \frac{\text{Kuyruktaki DNA yüzdesi (A)} - \text{Kuyruktaki DNA yüzdesi (B)}}{\text{Kuyruktaki DNA yüzdesi (A)}} \times 100$$

**Şekil III.3** Challenge yönteminin uygulanışı ve %DNA onarım kapasitesi hesabı

### III.7. İstatistiksel Analiz

Kolmogorov-Smirnov testi uygulanarak verilerin normal dağılıma uyup uymadığı incelenmiştir. Normal dağılıma uyan parametreler için Unpaired t test uygulanmış, normal dağılıma uymayan parametrelerde ise Mann Whitney U test uygulanmıştır.

Risk faktörlerinin (sigara, doğum sayısı, ilk koit yaşı gibi) patoloji gelişimi ile ilişkisini belirlemek amacıyla ki kare testi uygulanmıştır. Yaş, doğum sayısı ve ilk koit yaşının periferal kan lenfositlerinde ve servikal sürüntü hücrelerinde comet tekniği sonuçlarıyla ve challenge tekniği ile elde edilen %DNA onarım kapasitesi sonuçlarıyla ilişkisi linear korelasyon, periferal kan lenfositlerinde kromozomal aberasyon yöntemi ile elde edilen sonuçlarla ilişkisi ise spearman rank korelasyon analizleri ile yapılmıştır. Yöntemler arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla da korelasyon analizi uygulanmıştır.

## V. BULGULAR

Çalışmamızda patoloji gelişimi papsmear testinde şüpheli bulunan olgularda kolposkopi eşliğinde biyopsi alınarak değerlendirilmiştir. HPV 16 pozitif bireylerin %42'sinde HPV 18 pozitif bireylerinse %48'inde patoloji saptanmıştır. Kontrol grubunun tamamı HPV negatif bireylerden oluşmuştur. Kontrol grubuna da papsmear testi uygulanmış ve patoloji saptanmamıştır.

HPV pozitif bireylerde patoloji gelişimi ile sigaranın ilişkisi ki kare testi ile değerlendirilmiş sonuç istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bulunmuştur. HPV 16 pozitif bireylerde de ki kare testi uygulanarak patoloji gelişimi sigara alışkanlığı ile ilişkili bulunmasına ( $p<0,05$ ) karşılık HPV 18 pozitif bireylerde anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ( $p>0,05$ ). Doğum sayısı ve ilk koit yaşının patoloji gelişimi ile ilişkisi anlamlı değildir ( $p>0,05$ ). Oral kontraseptif kullanımı, obezite, menopozal durum ve menopozal durum sebebiyle hormon replasman tedavisi çalışmamızda birey sayısının azlığı nedeniyle değerlendirmeye alınmamıştır. Ancak diğer risk faktörleri; doğum sayısı, ilk koit yaşı ve yaş her bir grup için değerlendirilmiştir. Yaş ile HPV 16 pozitif bireylerin serviks sürüntü hücrelerinde kuyrultaki %DNA değerleri arasında pozitif korelasyon linear korelasyon analizi ile belirlenmiştir ( $p<0,05$ ), ayrıca HPV 18 pozitif bireylerde %kromozomal aberasyon/metafaz ile ilk koit yaşı arasında pozitif korelasyon spearman

rank korelasyon analizi ile belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Diğer parametreler ile anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

Uyguladığımız teknikleri birbirleri ile kıyasladığımızda; kromozomal aberasyon tekniği ile challenge tekniği ve servikal sürüntü hücrelerinde comet tekniği arasında korelasyon belirlenmemiştir (challenge tekniği:  $r=-0,2315$ ,  $p>0,05$ ; SSH-comet:  $r=0,0422$ ,  $p>0,05$ ), ancak kromozomal aberasyon tekniği ile periferal kan lenfositlerinde comet tekniği sonuçları arasında korelasyon vardır. (PKL-comet:  $r=0,3547$ ,  $p<0,05$ ; SSH-comet:  $r=0,2471$ ,  $p$ ). Challenge tekniği ile diğer teknikler arasında negatif korelasyon (PKL-comet:  $r=-0,4239$ ,  $p<0,05$ ; SSH-comet:  $r=-0,6827$ ,  $p<0,05$ ), periferal kan lenfositlerinde ve serviks sürüntü hücrelerinde comet tekniği sonuçları arasında korelasyon belirlenmiştir ( $r=0,4376$ ,  $p<0,05$ ).

#### **IV.1. Periferal Kan Lenfositlerinde Comet Yöntemi Sonuçları**

Periferal kan lenfositlerinde comet yöntemi uygulanması sonucunda HPV pozitif bireylerin comet yöntemi ile belirlenen kuyruktaki %DNA hasarı ( $10,03\pm 2,6$ ), HPV negatif bireylerden oluşan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ( $9,56\pm 1,61$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). Benzer şekilde HPV 16 ve HPV 18 pozitif bireyler (sırasıyla,  $9,81\pm 2,67$  ve  $10,29\pm 2,55$ ) ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ( $p>0,05$ ).

HPV 16 pozitif ve patoloji teşhisi konmuş bireyler ( $11,75 \pm 2,18$ ), HPV 16 pozitif ve patoloji geliştirmemiş bireylerle ( $7,87 \pm 1,41$ ) periferal kan lenfositlerinde comet sonuçları karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,0001$ ). Benzer şekilde HPV 18 pozitif ve patoloji teşhisi konmuş bireyler ( $11,67 \pm 2,06$ ), HPV 18 pozitif ve patoloji geliştirmemiş bireylerle ( $9,03 \pm 2,36$ ) periferal kan lenfositlerinde comet sonuçları karşılaştırıldığında da farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,05$ ). Tüm HPV pozitif

bireyler bir arada değerlendirildiğinde, patoloji geliştiren bireylerin (11,71 ±2,07) patoloji geliştirmeyen (8,42 ±1,97) bireylere göre kuyruktaki %DNA ortalaması istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir (p<0,0001).

Kontrol grubunda sigara içen bireylerin kuyruktaki % DNA ortalaması (8,78±1,34) sigara içmeyen bireylere (10,21 ±1,56) göre anlamlı derecede yüksektir. HPV 16 pozitif bireylerde sigara içen ve içmeyen bireyler arasında periferal kan lenfositlerinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0,05). Ancak, HPV 18 pozitif sigara içen bireylerin (12,16±1,3) kuyruktaki %DNA ortalaması sigara içemeyenlere (9,54±2,57) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir. Benzer şekilde tüm HPV pozitif grup değerlendirildiğinde sigara içen bireylerin (11,46±2,40) kuyruktaki %DNA ortalaması içmeyenlere (9,32 ±2,43) göre daha yüksektir.

**Tablo IV.1** Toplam HPV pozitif, HPV 16 (+) ve HPV 18 (+) bireylerin periferal kan lenfositlerinde comet tekniği ile elde edilen kuyruktaki %DNA değerleri (ortalama±standart sapma)

<b>Kuyruktaki %DNA</b>			
	<b>Toplam HPV (+)</b>	<b>Kontrol grı</b>	<b>P</b>
	<b>Ort.</b>	<b>Ort. ±</b>	
	<b>SS</b>		
<b>PKL- comet</b>	10,0	9,56	
	2,6	1,61	p>0,05
<b>Pozitif</b>	11,7		
<b>f</b>	2,07		
<b>Negatif</b>	8,42	9,56	p<0,0001

til	±1,9	±1,61	
İç	9,32	8,78	p>0,0
yü	±2,4	±1,34	
İç	11,4	10,21	p>0,0
	±2,4	±1,56	

\*p<0,0001, \*\*p<0,01, † p<0,05, Unpaired t test

#### Kuyruktaki %DNA

	HPV Tip	Kontrol gru	P
	(+)		
	Ort.	Ort. ±	
	SS		
PKL- comet	9,81	9,56	p>0,0
	2,67	1,61	
P	11,7		
f	2,18		
N	7,87	9,56	p<0,0
til	1,41	±1,61	
İç	9,10	8,78	p>0,0
yü	2,38	±1,34	
İç	10,9	10,21	p>0,0
	2,90	±1,56	

\*p<0,0001, † p<0,05 Unpaired t test

#### Kuyruktaki %DNA

HPV Tip	Kontrol gru	P
(+)		
Ort.	Ort. ±	

	SS		
<b>PKL- comet</b>	10,2	9,56	p>0,0
	2,55	1,61	
<b>P</b>	11,6		
<b>f</b>	2,06		
<b>N</b>	9,03	9,56	p>0,0
<b>til</b>	36*	±1,61	
<b>İç</b>	9,54	8,78	p>0,0
<b>y</b>	2,57	±1,34	
<b>İç</b>	12,1	10,21	p<0,0
	1,3*	±1,56	

\*p<0,05, \*\*p<0,05, \* p<0,05 Unpaired t test

#### IV.2. Servikal Sürüntü Hücrelerinde Comet Yöntemi Sonuçları

Servikal sürüntü hücrelerinde comet yöntemi uygulanması sonucunda HPV pozitif bireylerin kuyruktaki %DNA ortalaması ( $9,00 \pm 1,77$ ), HPV negatif bireylerden oluşan kontrol grubuyla ( $6,45 \pm 1,22$ ) karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,0001$ ). Benzer şekilde HPV 16 ve HPV 18 pozitif bireyler (sırasıyla,  $8,42 \pm 1,95$  ve  $8,63 \pm 1,33$ ) ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında HPV 16 ve 18 enfeksiyonu ile servikal sürüntü hücrelerinde comet tekniği ile belirlenen kuyruktaki %DNA ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ( $p<0,0001$ ).

HPV 16, 18 pozitif ve tüm HPV pozitif bireylerin patoloji pozitif ve negatif altgrupları servikal sürüntü hücrelerinde comet sonuçları açısından değerlendirildiğinde, patoloji pozitif bireyler (sırasıyla  $9,5 \pm 1,95$ ;  $10,39 \pm 1,20$ ;  $9,90 \pm 1,67$ ) her üç grupta da

patoloji negatif bireylere (sırasıyla  $7,25 \pm 1,15$ ;  $8,93 \pm 1,06$ ;  $8,09 \pm 1,38$ ) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek kuyruktaki %DNA ortalamasına sahiptirler (sırasıyla  $p < 0,001$ ;  $p < 0,005$ ;  $p < 0,0001$ ).

HPV 18 pozitif bireylerde sigara içenler, içmeyenlere göre istatistiksel olarak farklılık göstermezken ( $p > 0,05$ ), HPV 16 ve tüm HPV pozitif bireylerde sigara içenlerin (sırasıyla  $7,52 \pm 1,22$  ve  $8,42 \pm 1,46$ ) kuyruktaki %DNA ortalaması içmeyenlere (sırasıyla  $9,84 \pm 2,10$  ve  $10,12 \pm 1,83$ ) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir (sırasıyla  $p < 0,005$  ve  $p < 0,01$ ).

**Tablo IV.2** Toplam HPV pozitif, HPV 16 (+) ve HPV 18 (+) bireylerin servikal sürüntü hücrelerinde comet tekniği ile elde edilen kuyruktaki %DNA değerleri (ortalama  $\pm$  standart sapma )



	Toplam (+)	Kuyruktaki %DNA		P
		Ort.	Ort. ±	
<b>SSH- comet</b>	9,00	6,45		p<0,01
	1,77	1,22		
<b>P</b>	9,90			
<b>if</b>	±1,6			
<b>N</b>	8,08	6,45		p<0,01
<b>ti</b>	±1,3	±1,22		
<b>İç</b>	8,42	6,13		p<0,01
<b>y</b>	±1,4	±1,53		
<b>İç</b>	10,1	6,72		p<0,01
	±1,8	±0,85		

\*p<0,001, \*\*p<0,005 Unpaired t test

	HPV Tip (+)	Kuyruktaki %DNA		P
		Ort.	Ort. ±	
<b>SSH- comet</b>	8,42	6,45		p<0,01
	1,98	1,22		
<b>P</b>	9,5			
<b>f</b>	1,98			
<b>N</b>	7,28	6,45		p>0,01
<b>til</b>	1,18	±1,22		

<b>İç</b>	7,52	6,13	p<0,0
<b>y€</b>	1,22	±1,53	
<b>İç</b>	9,84	6,72	p<0,0
	2,10	±0,85	

\*p<0,001, \*\*p<0,005 Unpaired t test

	HPV Tip (+)	Kuyruktaki %DN/		P
		Kontrol gru		
	Ort.	Ort. ±		
<b>SSH- comet</b>	<b>SS</b>			
	8,63	6,45		p<0,0
	1,33	1,22		
<b>P</b>	10,3			
<b>f</b>	1,20			
<b>N</b>	8,93	6,45		p<0,0
<b>til</b>	06*	±1,22		
<b>İç</b>	9,26	6,13		p<0,0
<b>y€</b>	14	±1,53		
<b>İç</b>	10,5	6,72		p<0,0
	1,41	±0,85		

\*p<0,005, Unpaired t test

### IV.3. Kromozomal Aberasyon Yöntemi Sonuçları

Periferal kan lenfositlerinde kromozomal aberasyon yöntemi uygulanması sonucunda HPV pozitif bireylerin DNA hasarı ( $0,41 \pm 0,08$ ), HPV negatif bireylerden oluşan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ( $0,42 \pm 0,12$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ). Benzer şekilde HPV 16 ve HPV 18 pozitif bireyler (sırasıyla,  $0,42 \pm 0,11$  ve  $0,39 \pm 0,12$ ) ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ( $p > 0,05$ ).

HPV 16 pozitif bireyler patoloji gelişimi açısından değerlendirildiğinde patoloji pozitif bireylerin ( $0,77 \pm 0,20$ ) negatif bireylere ( $0,17 \pm 0,09$ ) oranla kromozomal aberasyon sıklığı istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ( $p < 0,05$ ). Benzer şekilde tüm HPV pozitif bireyler bir arada değerlendirildiğinde patoloji geliştiren bireyler ( $0,63 \pm 0,15$ ) patoloji negatif bireylere oranla ( $0,23 \pm 0,43$ ) istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek kromozomal aberasyon sıklığına sahiptir ( $p < 0,05$ ). Ancak HPV 18 pozitif bireylerde patoloji gelişiminin kromozomal aberasyon sıklığı ile ilişkisi tespit edilememiştir ( $p > 0,05$ ).

**Tablo IV.3** Toplam HPV pozitif, HPV 16 (+) ve HPV 18 (+) bireylerin periferal kan lenfositlerinde kromozomal aberasyon tekniği ile elde edilen %kromozomal aberasyon/metafaz değerleri (ortalama±standart hata)

	% Kromozomal aberasyon/metafaz (+)		
	Toplam HPV (+)	Kontrol grubu	P
	Ort.	Ort. ±	
	SH		
<b>Kromozomal Aberasyon</b>	0,41	0,42	p=0,001
	0,08	0,12	
<b>Poliploidite</b>	0,63		
	±0,1		
<b>Nükleofosjenik</b>	0,23	0,42	p=0,001
	±0,0	±0,12	
<b>İçerik</b>	0,23	0,27	p=0,001
	±0,0	±0,14	
<b>İçerik</b>	0,63	0,54	p=0,001
	±0,1	±0,18	

\*p<0,05 Mann Whitney U test

HPV Tip (+)	% Kromozomal aberasyon/metafaz (+)		P
	Kontrol grubu		
	Ort.	Ort. ±	
	SH		

<b>Krm. aberas:</b>	0,42	0,42	p>
	0,11	0,12	5
<b>P</b>	0,77		
<b>f</b>	0,2*		
<b>N</b>	0,17	0,42	p>
<b>til</b>	0,09	±0,12	5
<b>İç</b>	0,37	0,27	p>
<b>y</b>	0,11	±0,14	5
<b>İç</b>	0,5	0,54	p>
	0,23	±0,18	5

\*p<0,05, Mann Whitney U test

#### % Kromozomal aberasyon/meta

<b>HPV Tip</b>	<b>Kontrol gru</b>		<b>P</b>
	<b>Ort.</b>	<b>Ort. ±</b>	
<b>(+)</b>			
<b>SH</b>			
<b>Krm. aberas:</b>	0,39	0,42	p>
	0,12	0,12	5
<b>P</b>	0,49		
<b>f</b>	21		
<b>N</b>	0,39	0,42	p>
<b>til</b>	14	±0,12	5
<b>İç</b>	0,19	0,27	p>
<b>y</b>	1*	±0,14	5
<b>İç</b>	0,89	0,54	p>
	26*	±0,18	5

\*p<0,05, Mann Whitney U test

#### IV.4. Challenge Tekniği Sonuçları

Periferal kan lenfositlerinde challenge tekniği uygulanması sonucunda HPV pozitif bireylerin %DNA onarım kapasitesi ( $45,89 \pm 12,08$ ), HPV negatif bireylerden oluşan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ( $59,16 \pm 6,99$ ) farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,0001$ ). Benzer şekilde HPV 16 ve HPV 18 pozitif bireyler (sırasıyla,  $45,33 \pm 13,03$  ve  $46,53 \pm 11,19$ ) ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istiksel olarak anlamlı derecede daha düşük %DNA onarım kapasitelerine sahiptirler ( $p < 0,0001$ ).

HPV 16 pozitif bireyler patolojilerine göre değerlendirildiğinde patoloji pozitif bireylerin ( $36,65 \pm 10,03$ ) patoloji negatif bireylere ( $54,00 \pm 9,50$ ) göre anlamlı derecede daha düşük %DNA onarım kapasiteleri olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,0001$ ). HPV 18 pozitif bireylerde patoloji pozitif bireyler ile patoloji negatif bireylerin DNA onarım kapasiteleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilemezken ( $p > 0,05$ ), tüm HPV pozitif bireyler bir arada değerlendirildiğinde patoloji geliştiren bireylerin ( $38,68 \pm 11,24$ ) patoloji negatif bireylere ( $52,79 \pm 8,34$ ) göre anlamlı derecede düşük % DNA onarım kapasitelerine sahip oldukları tespit edilmiştir.

HPV 16 pozitif grupta sigara içen bireyler ile sigara içmeyen bireyler karşılaştırıldığında sigara içenler ( $33,78 \pm 7,56$ ) içmeyenlere ( $52,26 \pm 10,45$ ) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük DNA onarım kapasitesine sahiptir

( $p < 0,0001$ ). HPV 18 pozitif grupta sigara içen ve içmeyen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), tüm HPV pozitif bireyler bir arada değerlendirildiğinde sigara içen bireylerin %DNA onarım kapasiteleri ( $36,94 \pm 10,84$ ) sigara içmeyen bireylerin %DNA onarım kapasitelerine ( $50,37 \pm 10,13$ ) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşüktür.

**Tablo IV.4** Toplam HPV pozitif, HPV 16 (+) ve HPV 18 (+) bireylerin periferal kan lenfositlerinde comet tekniği ile kombine edilerek elde edilen %DNA onarım kapasitesi değerleri (ortalama  $\pm$  standart sapma )

	%DNA Onarım kapasitesi		
	Toplam (+)	Kontrol grubu	P
	Ort. $\pm$	Ort. $\pm$ SS	
<b>Challenge Tekniği</b>	45,89	59,1	$p < 0,0001$
<b>Positif</b>	38,68		
<b>Çiğ</b>	$\pm 11,2$		
<b>İçmeyen</b>	52,79	59,1	$p < 0,0001$
<b>İçen</b>	$\pm 8,34$	$\pm 6,9$	1
<b>Çiğ</b>	50,37	60,7	$p < 0,0001$
<b>Yeni</b>	$\pm 10,1$	$\pm 6,2$	0,0001
<b>İç</b>	36,94	57,8	$p < 0,0001$
	$\pm 10,8$	$\pm 7,8$	0,0001

\* $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,0001$ , Unpaired t test

%DNA Onarım kapasitesi			
	HPV Tip 16	Kontrol grubu	P
	Ort. ±	Ort. SS	
<b>Challenge</b>	45,33	59,1	p<
<b>Tekniği</b>	13,03	6,99	00
<b>F</b>	36,65		
<b>t</b>	10,03		
<b>N</b>	54,00	59,1	p>
<b>a</b>	9,50*	±6,9	5
<b>ı</b>	52,26	60,7	p<
<b>y</b>	10,45	±6,2	5
<b>ı</b>	33,78	57,8	p<
	7,56**	±7,8	00

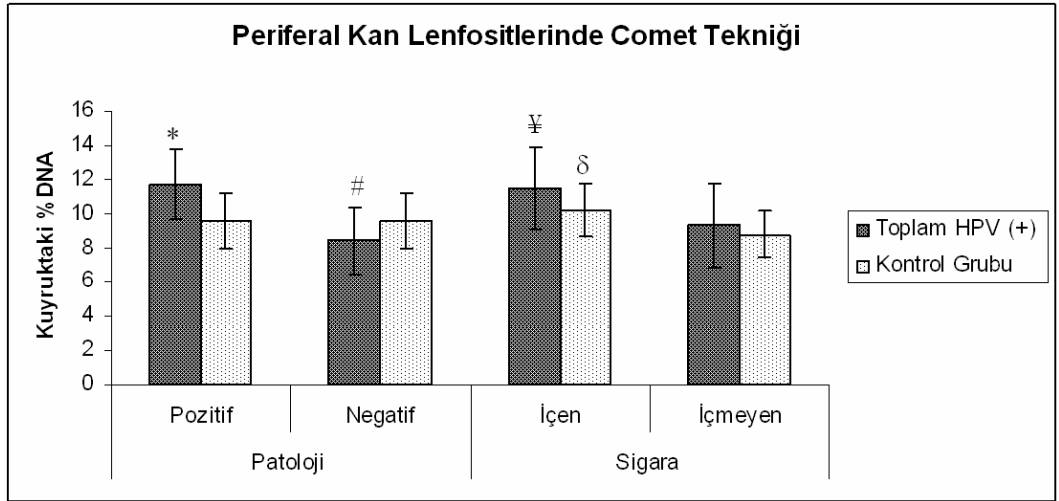
\*p<0,001, \*\*p<0,0001, Unpaired t test

%DNA Onarım kapasitesi			
	HPV Tip 18	Kontrol grubu	P
	Ort. ±	Ort. SS	
<b>Challenge</b>	46,53	59,1	p<
<b>Tekniği</b>	11,19	6,99	00
<b>F</b>	41,11		
<b>t</b>	65		
<b>N</b>	51,47	59,1	p<
<b>a</b>	7	±6,9	1

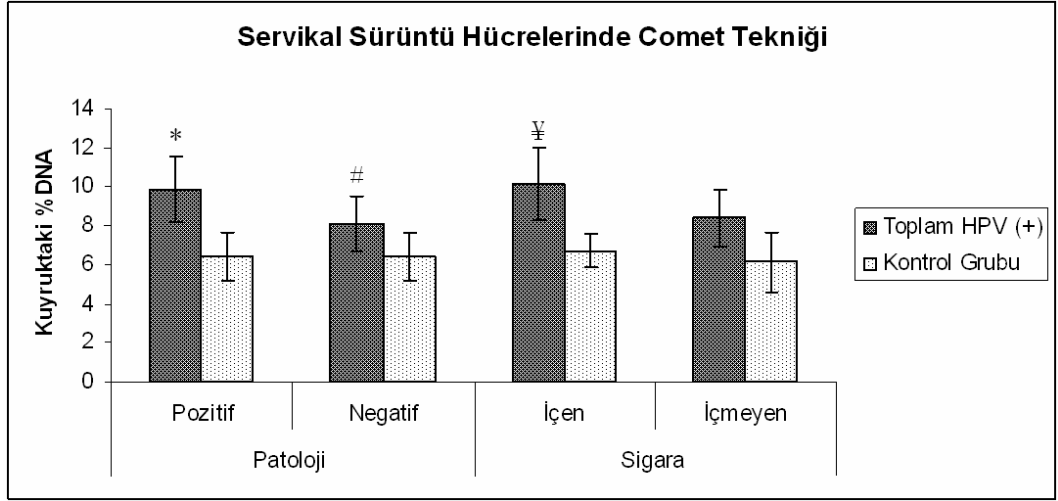


	İ		p*
İ	48,48:	60,7	0,
İ	9	±6,2	
İ	41,67:	57,8	p*
	88	±7,8	5

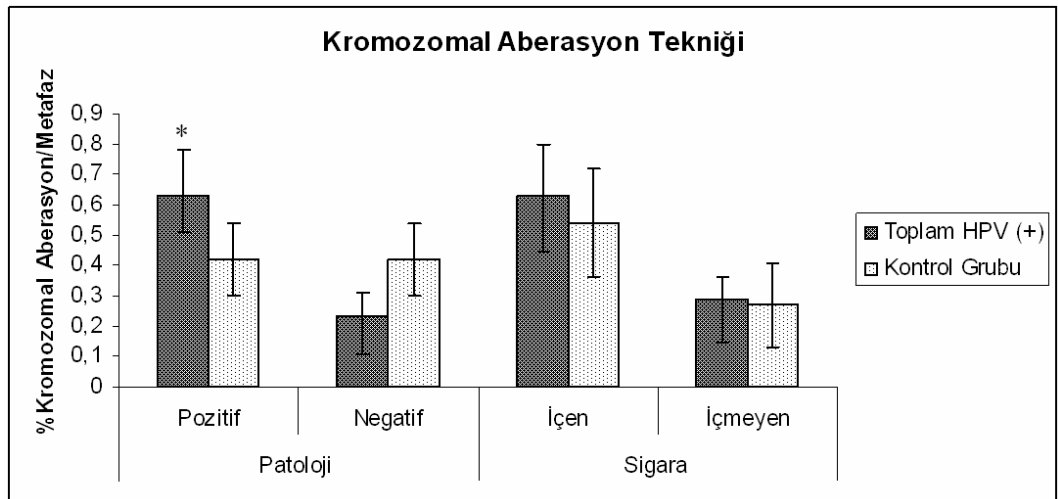
\*p<0,0001, \*\* p<0,0001, Unpaired t test



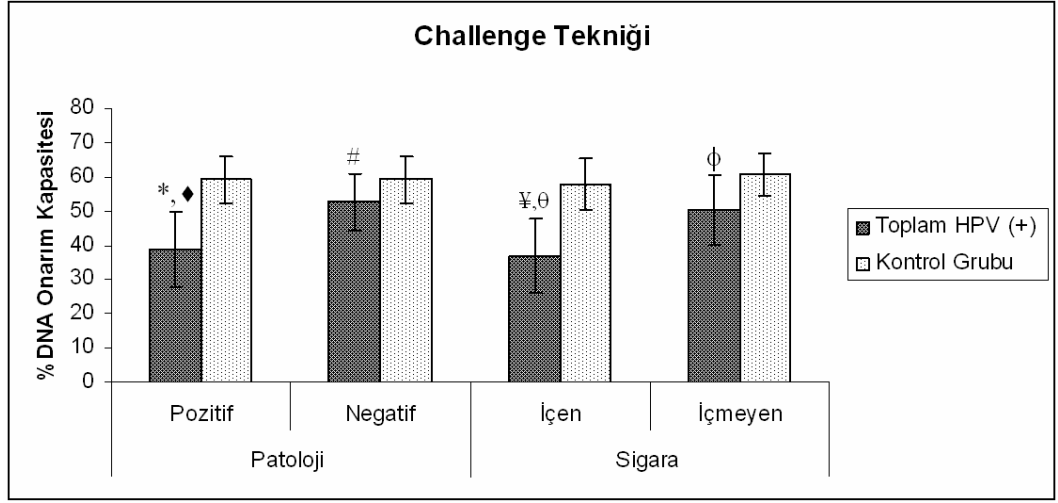
\* p<0,0001 HPV pozitif patoloji negatife göre, # p<0,05 kontrole göre  
¥ p<0,01 HPV pozitif sigara içmeyene göre, δ p<0,05 sigara içmeyen kontrole göre,



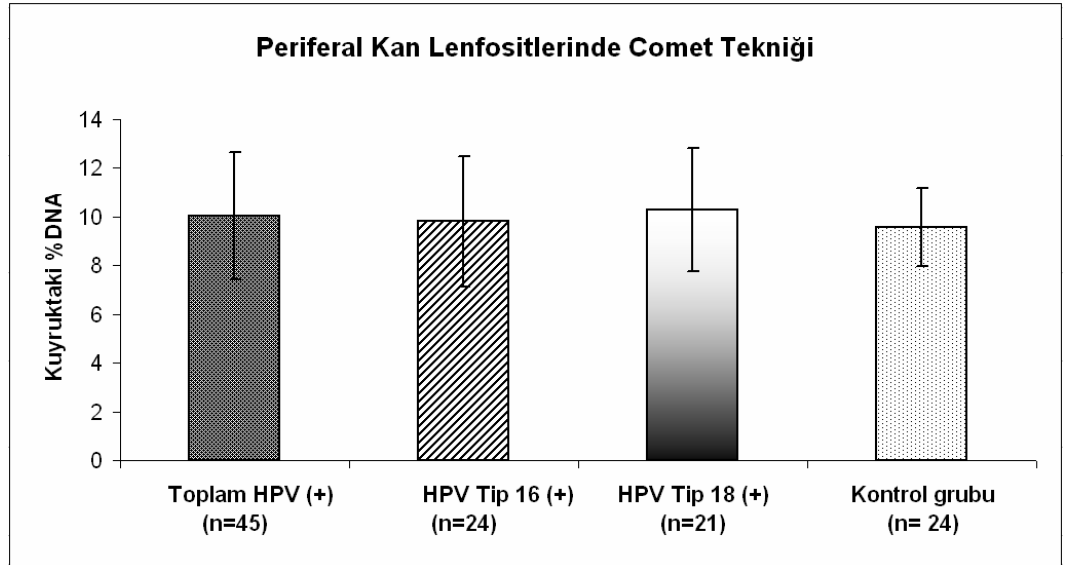
\*  $p < 0,001$  HPV pozitif patoloji negatife göre, # $p < 0,0001$  kontrole göre, ¥ $p < 0,005$  HPV pozitif sigara içmeyene göre



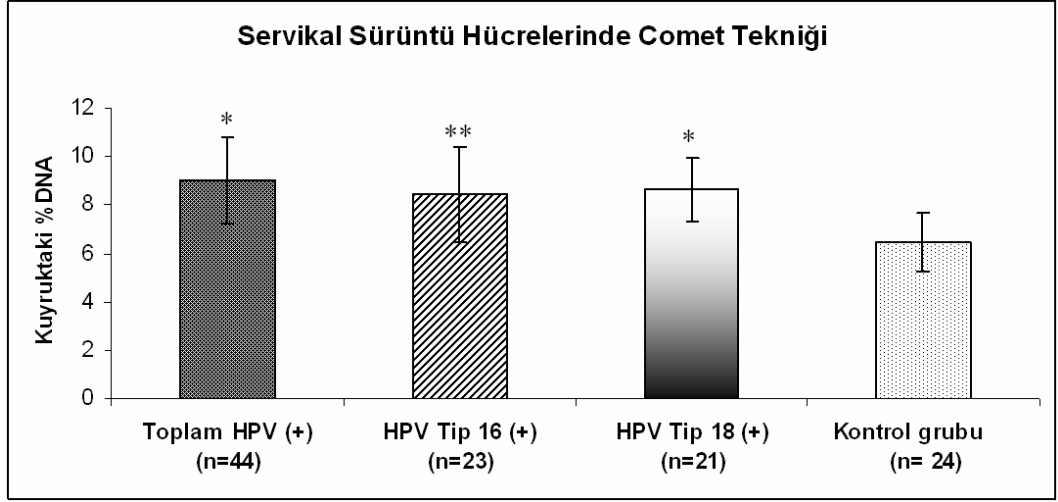
\*  $p < 0,05$  HPV pozitif patoloji negatife göre



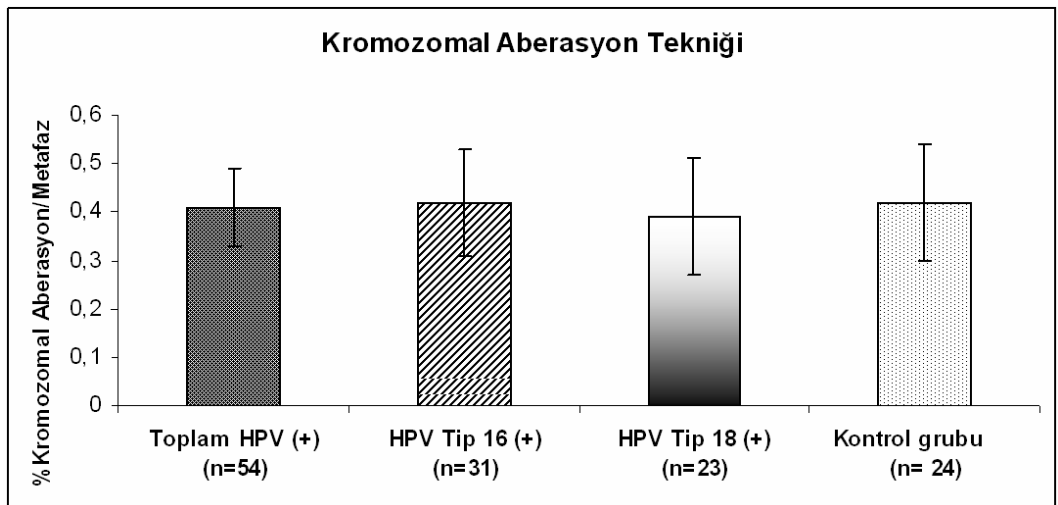
\*p<0,0001 HPV pozitif patoloji negatife göre, ♦ p<0,0001 kontrole göre, # p<0,01 kontrole göre, φ p<0,0005 sigara içmeyen kontrole göre, ¥ p<0,0001 HPV pozitif sigara içmeyene göre, θ p<0,0001 Sigara içen kontrole göre



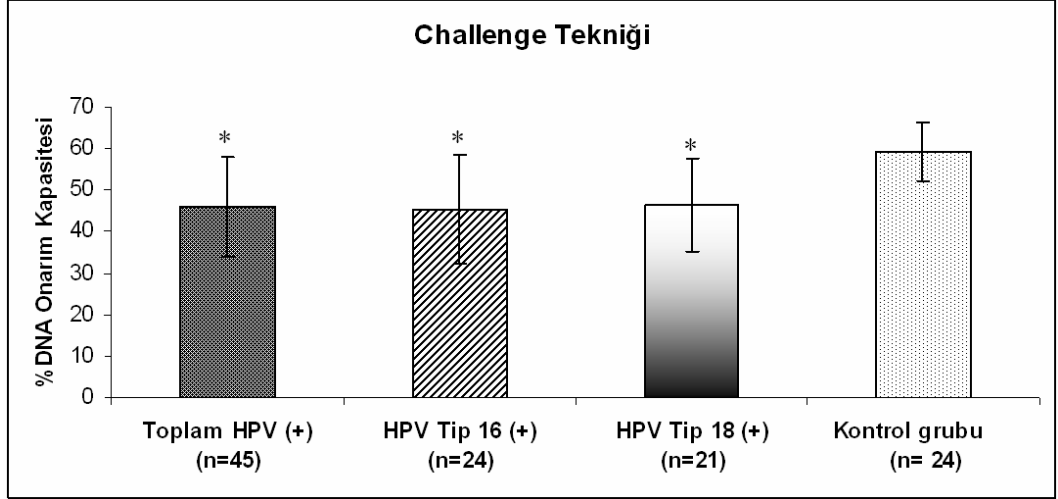
Bütün gruplar kontrol grubuna göre farklılık göstermemiştir. (p>0,05)



Kontrol grubuna göre \* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,001$



Bütün gruplar kontrol grubuna göre farklılık göstermemiştir. ( $p > 0,05$ )



Kontrol grubuna göre \*p<0,0001

**Tablo IV.5** HPV 16 pozitif gruba ait bireysel özellikler ve genel bulgular

**Tablo IV.6 HPV 18 pozitif gruba ait bireysel özellikler ve genel bulgular**

Kod. Kod.	Yaş Yaş	Sigara Sigara	Patoloji Patoloji	Doğum Doğum	PKL- PKL- comet comet	SSH- SSH- comet comet	%KA/met. %KA/met.	Challenge Tekniği		
								XR XR	XR + XR + onarım onarım	% DNA Onarım % DNA Onarım Kapasitesi
1	30	-	-	+	9,25	-	1	12,64	6,90	45,39
1	32	-	+	+	8,70	10,13	0	24,80	11,37	54,14
2	39	-	-	+	-	-	0	-	-	-
2	29	-	-	-	7,66	9,91	1	19,46	10,72	44,92
3	33	-	-	+	8,74	7,13	0	15,79	7,79	50,65
3	34	-	-	+	8,06	8,38	0	38,71	14,62	62,24
4	38	-	-	+	6,32	7,08	0	33,80	17,31	48,78
4	42	-	-	+	6,04	7,59	0	16,92	8,01	52,64
5	43	-	-	+	10,79	9,60	1	13,96	7,96	43,02
5	41	-	+	+	13,32	12,48	0	22,74	14,14	37,82
6	36	-	-	+	7,05	7,98	0	16,40	6,10	62,77
6	37	-	+	+	13,07	9,58	1	30,76	14,07	54,28
7	28	-	-	-	8,08	6,05	0	36,38	10,14	72,13
7	39	-	+	+	12,57	9,64	0	21,27	14,96	29,68
8	34	-	-	+	6,23	6,40	0	27,40	9,86	64,01
8	28	-	-	-	9,01	8,17	0	31,86	15,57	51,12
9	41	-	-	+	-	-	1	-	-	-
9	27	-	-	+	9,08	8,78	0	20,48	7,284	64,44
10	44	-	+	+	8,61	7,89	1	14,53	7,16	50,71
10	42	-	+	+	7,69	9,32	1	20,15	11,40	43,42
11	37	-	+	+	13,52	7,13	0	18,10	8,19	54,77
11	40	-	+	+	13,74	9,29	0	20,24	13,52	33,20
12	41	-	+	-	11,34	9,15	1	18,27	9,96	45,50
12	38	-	-	+	9,98	8,16	0	26,93	14,43	46,41
13	39	-	-	+	-	-	0	-	-	-
13	43	-	-	+	6,24	9,22	0	21,43	10,04	53,17
14	29	-	-	-	7,69	7,08	0	16,48	7,32	55,60
14	32	-	-	+	10,49	9,47	0	20,14	10,99	45,44
15	42	-	-	+	-	-	0	-	-	-
15	34	-	-	-	7,43	8,80	0	32,27	14,75	54,27
16	47	-	+	-	12,74	8,90	1	11,05	6,30	43,00
16	45	-	+	+	-	-	0	-	-	-
17	33	-	-	+	7,41	6,93	0	26,50	10,50	60,36
17	41	+	-	+	-	-	1	-	-	-
18	29	-	-	+	7,16	5,39	0	23,64	10,12	57,17
18	37	+	+	+	10,85	11,38	0	20,68	15,39	25,59
19	26	-	+	+	11,62	8,52	1	16,22	11,36	29,98
19	36	+	+	+	13,23	11,94	2	25,05	15,57	37,84
20	37	+	-	+	6,42	7,89	0	35,29	19,23	45,52
20	24	+	-	-	11,26	8,35	1	26,39	15,40	41,66
21	49	+	+	+	13,75	9,58	0	18,52	11,61	37,29
21	38	+	+	+	11,20	9,28	0	29,26	10,48	64,19
22	32	+	+	+	14,03	8,27	1	8,74	5,67	35,14
22	40	+	-	+	14,10	11,44	1	23,19	11,64	49,82
23	36	+	-	+	9,27	8,20	0	19,18	11,00	42,64
23	32	+	+	+	12,31	10,85	1	21,82	15,08	30,90
24	48	+	+	-	7,72	8,87	0	14,27	10,36	27,43
25	44	+	+	+	10,91	9,07	2	12,74	8,59	32,58
26	46	+	-	+	-	-	0	-	-	-
27	34	+	-	-	-	-	0	-	-	-
28	36	+	+	+	11,30	11,81	0	27,57	18,70	32,15
29	35	+	+	+	10,55	10,46	0	23,54	18,67	20,66
30	41	+	+	+	14,93	14,37	1	25,36	17,60	30,62
31	46	+	+	+	-	-	2	-	-	-

**Tablo IV.7** Kontrol grubuna ait bireysel özellikler ve genel bulgular

Kod.	Yaş	Sigara	Patoloji	Doğum	PKL- comet	SSH- comet	%KA/met.	Challenge Tekniği		
								XR	XR + onarım	% DNA Onarım Kapasitesi
1	28	-	-	-	7,78	6,29	1	24,43	9,81	59,85
2	33	-	-	-	10,75	5,47	0	29,83	10,65	64,28
3	34	-	-	-	8,00	6,36	1	35,48	13,19	62,82
4	35	-	-	+	8,75	6,39	0	22,66	9,63	57,51
5	37	-	-	+	9,80	4,16	0	37,18	14,71	60,44
6	31	-	-	+	8,07	5,02	0	28,86	12,85	55,48
7	37	-	-	+	7,16	9,91	1	34,73	16,80	51,62
8	41	-	-	+	6,72	6,76	0	37,49	12,18	67,51
9	42	-	-	+	9,58	4,45	0	32,24	11,25	65,10
10	37	-	-	+	9,52	6,00	0	27,33	13,08	52,13
11	48	-	-	+	10,50	6,60	0	39,14	11,33	71,04
12	23	+	-	-	8,50	6,76	0	28,26	16,23	42,57
13	45	+	-	+	9,51	5,28	0	30,64	10,57	65,52
14	42	+	-	+	8,05	6,86	0	36,17	10,25	71,65
15	31	+	-	+	10,88	6,63	1	36,46	16,04	56,01
16	42	+	-	+	10,63	6,14	0	19,67	8,65	56,03
17	40	+	-	+	11,43	8,41	1	35,60	18,65	47,60
18	37	+	-	+	8,02	7,62	0	19,81	8,42	57,51
19	33	+	-	-	12,75	7,22	1	29,75	11,96	59,80
20	41	+	-	+	10,37	7,62	0	24,61	8,79	64,27
21	36	+	-	+	8,50	6,48	1	26,90	12,15	54,84
22	30	+	-	-	11,73	6,28	2	26,64	10,98	58,76
23	31	+	-	+	11,70	6,23	0	16,40	7,49	54,31
24	36	+	-	+	10,66	5,76	1	29,83	11,01	63,08

## V. TARTIŞMA VE SONUÇ



Virüsler ile kanser arasındaki ilişkiye birçok çalışmada dikkat çekilmiş, virüslerin benign oluşumların yanı sıra neoplazi, displazi ve kanserle de ilişkili olduğu belirtilmiştir<sup>50</sup>. Virüsler tüm dünya genelinde kanser insidansının yaklaşık %16'sından, HPV'ler ise en az %10'undan sorumlu tutulmaktadır<sup>2,50</sup>.

Gelişmiş ülkelerde izleme programlarının düzenli uygulanması sonucu serviks kanseri insidansı düşmüş olsa da, tüm dünya genelinde özellikle de gelişmekte olan ülkelerde korunulabilir ve tedavi edilebilir bir kanser olan serviks kanseri hala önemli bir problemdir<sup>95</sup>. Serviks kanseri çok çeşitli faktörlerden etkilenen çevresel bir hastalıktır ve risk faktörleri hastalığın gelişiminde önemli yere sahiptir<sup>152</sup>. Günümüzde serviks kanseri gelişiminde genetik ve kazanılmış duyarlılığın önemine dair çok az çalışma vardır<sup>15</sup>.

Yüksek riskli HPV tipleri ile enfeksiyon serviks kanseri gelişimi açısından çok önemli bir risk faktörüdür. Günümüzde, HPV enfeksiyonu ile oluşan genotoksik etkinin ve DNA onarım mekanizmalarındaki değişikliklerin serviks kanseri gelişimindeki rolü üzerinde önemle durulmaktadır.

HPV DNA'sının tespiti servikal kansere yatkınlık ve hastalığın takibi açısından oldukça önemlidir. HPV DNA'sı primer olarak hedef dokuda veya tümör oluşumunda bulunmasına karşılık periferal kanda da tespit edilmiştir.

Çalışmamızda HPV pozitif bireylerde ve kontrol grubunda periferal kan lenfositlerinde comet ve kromozomal aberasyon yöntemleri uygulanarak DNA hasarı, challenge tekniği ile ise bireysel DNA onarım kapasiteleri belirlenmiştir. Ayrıca, servikal sürüntü hücrelerinde comet tekniği ile hedef hücre grubundaki DNA hasarı da değerlendirilmiştir.

Periferel kan mononükleer hücrelerinin enfeksiyon varlığında hedef dokuya hücum ettiği ve mikroorganizmaları hedef dokudan aldığı bilinmektedir. Periferel kan mononükleer hücreleri bu mekanizma ile HPV taşıyıcısı haline gelir ve kan dolaşımına virüsün yayılmasına sebep olur<sup>153</sup>.

Pornthanakasem ve arkadaşları, periferel kanda HPV DNA'sının diagnostik bir araç olarak servikal kanser vakalarında kullanılıp kullanılmayacağını araştırmış, duyarlılığın servikal sürüntüye göre çok düşük olması sonucu yeterli hassasiyete sahip olmadığı kararına varmışlardır. Ancak periferel kanda HPV DNA'sı tespitinin metastaz ile yakından ilişkili olduğuna serviks kanserinin prognozunun takibinde kullanılabileceğine dikkati çekmişlerdir<sup>154</sup>. Servikal kanser metastatik bir kanser türüdür. Metastaz gelişimi kanser hastalığında hastalığın seyrini, hastanın yaşam süresini ve kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Periferel kan ile HPV DNA'sının tüm vücudu dolaşabilmesi sonucu metastaz gelişimi, plazmada HPV DNA'sının tespiti sayesinde kontrol altına alınabilir<sup>155</sup>.

Ho ve arkadaşları, invaziv servikal kanser hastalarının %25'inden fazlasında periferel kanda RT-PCR ile HPV 16, -18 veya -52 DNA'sını tespit etmişlerdir. Ancak aynı hastaların servikal sürüntülerinde bu oranın çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir<sup>156</sup>. Periferel kanda HPV DNA'sının hedef dokuya göre daha düşük oranda tespit edilebilmesi duyarlılıkla ilgili problemleri gündeme getirmiş, viral yükün daha az olduğu hücre gruplarında PCR ile ilgili tekniklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmasına sebep olmuştur. Kullanılan PCR yöntemi (PCR veya RT-PCR), koşulları veya primer dizilerindeki modifikasyonlarla yöntemin daha düşük viral yükü tespiti ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır<sup>157</sup>.

Periferal kan lenfositlerinin tüm vücudu dolaşması nedeniyle hedef organdaki biyolojik etkileri iyi bir şekilde temsil ettiği düşünülmektedir ve bu yüzden DNA hasarı ve kromozomal aberasyonlarla genotoksik riskin belirlenmesinde yaygın kullanıma sahiptir<sup>21</sup>. Bu yüzden çalışmamızda HPV 16 ve 18 tiplemesi servikal sürüntü hücrelerinde yapılmasına karşılık, bireysel duyarlılık ve genotoksik etkiler hem periferal kanda hem de servikal sürüntü hücrelerinde araştırılmıştır.

Yüksek riskli HPV 16 ve 18 enfeksiyonu ile eksprese edilen E6 ve E7 onkoproteinleri başlıca p53 ve pRB gibi tümör baskılayıcı genler ile etkileşir. Bu tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sonucu hem hasarlanan DNA onarılamaz, hem de apoptozis mekanizması inhibe olur. Sonuçta E6, E7 genlerinin ekspresyonu ile birlikte DNA hasarı birikir ve karsinojenik süreç başlar<sup>15,158</sup>.

Çalışmamızda; HPV 16 ve 18 pozitif bireyler, HPV negatif ve sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubuna kıyasla periferal kan lenfositlerinde comet tekniği ve kromozomal aberasyon yöntemi ile istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir ( $p>0,05$ ). Ancak hedef hücre grubu olan servikal sürüntü hücrelerinde comet tekniği uygulandığında toplam HPV pozitif bireylerin, HPV 16 ve 18 pozitif bireylerin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek kuyruktaki %DNA değerlerine sahip olduğu görülmüştür.

HPV viral integrasyonu servikal neoplazi gelişiminde önemli bir parametredir. Virüsün epizomal formda, entegre veya her iki formun bir arada olması malign transformasyonu etkilemektedir<sup>159</sup>. Düşük seviyeli servikal intraepitel lezyonlarda bile pRB'nin inaktivasyonu tespit edilmiştir ve bu durumun virüsün fiziksel pozisyonuyla ilişkili olduğu belirtilmiştir<sup>160</sup>.

HPV enfeksiyonunun DNA hasarı ile ilişkisi değerlendirildiğinde periferal kan lenfositlerine kıyasla hedef hücre grubu olan servikal sürüntü hücrelerinin kullanımı daha iyi sonuç vermekte, bu durum periferal kan lenfositlerinin bir çok endojen veya ekzojen maruziyetten etkilenmesi ile, virüsün periferal kanda daha çok epizomal formda olması olasılığı ile veya viral yükün servikal sürüntü hücrelerine kıyasla daha düşük seviyede olması ile açıklanabilir.

HPV enfeksiyonu sonucunda patoloji gelişimi değerlendirilmiş, HPV 16 pozitif bireylerin %42'sinde, HPV 18 pozitif bireylerinse %48'inde patoloji saptanmıştır. HPV ile indüklenen genomik instabilitenin erken dönemde servikal intraepitel öncül lezyonlarda olduğu ve karsinojenik süreç ile arttığı bilinmektedir<sup>16</sup>. Çalışmamızda patoloji gelişiminin DNA hasarı üzerindeki etkisi incelendiğinde; toplam HPV pozitif - patoloji geliştirmiş bireylerin periferal kan lenfositlerinde ve servikal sürüntü hücrelerinde comet yöntemi ile kontrol grubuna (sırasıyla;  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ) ve patoloji geliştirmemiş HPV pozitif bireylere (sırasıyla;  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,001$ ) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek DNA hasarına sahip olduğu belirlenmiştir. HPV 16 ve 18 pozitif gruplarda da patoloji gelişimi her iki teknikle de kuyruktaki %DNA değerlerini arttırmıştır. Kromozomal aberasyon yöntemi ile de HPV pozitif patoloji geliştirmiş bireyler, patoloji geliştirmemiş bireylere göre daha yüksek DNA hasarına sahipken ( $p < 0,05$ ), kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ( $p > 0,05$ ). Patoloji gelişimi, HPV 16 pozitif bireylerde de kromozomal aberasyon sıklığını istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırırken ( $p < 0,05$ ), HPV 18 pozitif bireylerde bu artış anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ).

Challenge tekniği ile de patoloji geliştirmiş bireylerin % DNA onarım kapasiteleri kontrol grubuna ( $p < 0,0001$ ) ve patoloji geliştirmemiş HPV pozitif bireylere ( $p < 0,0001$ ) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür.

Bizim sonuçlarımızla uyumlu şekilde, Udumudi ve arkadaşları 1998 yılında servikal displazi hastalarında serviks epitel hücrelerinde comet yöntemini uygulamışlar, Periferal kan lökositlerinde ve servikal epitel hücrelerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek DNA hasarı tespit etmişlerdir. MNNG ile indükleyerek DNA onarım kapasitelerini belirlemişler ve prekanseröz olgunun şiddeti ile ilişkili olarak DNA onarım kapasitesinin azaldığını belirtmişlerdir. Ancak bu çalışmada HPV enfeksiyonunun etkisi araştırılmamıştır<sup>161</sup>.

Servikal patoloji gelişimi ile oluşan DNA hasarı birçok çalışmada farklı teknikler uygulanarak gösterilmiştir. Allen ve arkadaşları tarafından 37 skuamöz servikal karsinomlu hastada, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon tekniği ile kromozomal aberasyonlar tespit etmiştir<sup>162</sup>. Benzer şekilde Yu Huang ve arkadaşları da 28 serviks, 7 vulvar tümörlü HPV pozitif hastalarda karşılaştırmalı genomik hibridizasyon tekniği ile HPV enfeksiyonu ve integrasyonu sonucu kromozomal değişikliklerin oluştuğunu ve bunun da tümör gelişimine katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir<sup>163</sup>. Hopman ve arkadaşları ise servikal neoplazi geliştirmiş hastalardan aldıkları servikal biyopsilerde HPV 16 ve 18 DNA'sını tespit etmiş, yine servikal biyopsi örneklerinde FISH tekniği ile 1, 17 ve X kromozomlarında kromozomal aberasyonları değerlendirmişlerdir. Sonuçta HPV 16 ve 18 integrasyonu ile kromozomal aberasyonlar arasında anlamlı bir ilişki tespit etmişlerdir<sup>164</sup>. Harris ve arkadaşları ise, karyotipleme, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ve spesifik olarak 17 ve 18 numaralı kromozomlar için de FISH teknikleri kullanılarak birçok kromozomda hem sayısal hem de yapısal aberasyonlar tespit edilmiştir<sup>165</sup>. Mian ve arkadaşları HPV'nin sebep olduğu premalign lezyonlardaki kromozomal değişikliklerin servikal karsinogeneziste önemli rolü olduğunu 7, 3 ve X kromozomlarında FISH tekniği ile göstermişlerdir<sup>57</sup>. HPV enfeksiyonunun indüklediği kromozomal değişikliklerin en yaygın gözlemediği kromozomlar 1, 3, 11 ve 17 numaralı kromozomlar olsa da bunlardan başka birçok kromozomda gerek sayısal gerekse yapısal hasarlar tespit edilmiştir<sup>61,165</sup>.

Leal-Garza ve arkadaşları, skuamöz intraepitel lezyonu olan bireyler ve servikal kanser hastalarını kontrol grubu ile periferik kanda ve serviks epitel hücrelerinde mikroçekirdek yöntemi uygulayarak karşılaştırmışlar. Çalışmanın sonucunda servikal lezyonun aşaması ile mikroçekirdek değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir paralellik bulmuşlar ve mikroçekirdeğin valide edildiği takdirde servikal taramalarda rutin olarak kullanılabilir kadar hassas bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir<sup>166</sup>.

Calinisan ve arkadaşları HPV 16, 18, 31 ve 33 ile blastositleri enfekte etmişler. HPV 16 ile enfekte olan blastositlerde comet tekniği ile belirlenen DNA hasarının kontrole göre daha yüksek olduğunu, ancak bu ilişkinin diğer HPV tipleri ile tespit edilemediğini belirtmişlerdir. Embriyonun blastosit aşamasında HPV 16 DNA'sı ile enfekte olması sonucunda embriyonik gelişimin engelleneceğini açıklamışlardır<sup>167</sup>.

Konakçı hücre proliferasyonunun artması ve virüse bağlı immünosüpresyon gelişimi genel olarak herhangi bir viral ajana bağlı kanser gelişiminde önemli aşamalar olarak kabul edilmektedir. Viral ajanlarla enfeksiyonda yaşam tarzının, coğrafi, sosyoekonomik ve çevresel faktörlerin yanı sıra kalıtsal özelliklerin de önemli rolü vardır. Magnusson ve arkadaşları, İsveç'te 1958-1993 yılları arasındaki kayıtları araştırmış, serviks kanserine yakalanmış kadınların ikinci derece akrabalarının, çocuklarının ve evlat edindikleri çocukların serviks kanserine yakalanma oranlarını belirlemişler. Sonuçlar İsveç'teki serviks kanseri vakalarında çevresel faktörlerden çok genetik yatkınlığın ön planda olduğunu göstermiştir<sup>168</sup>. Serviks kanserinde genetik duyarlılığı açıklayabilmek amacıyla yapılan çalışmalarda hangi polimorfizmlerin serviks kanseri ile ilişkili olabileceği konusunda henüz bir fikir birliğine varılamamakla birlikte, bugüne kadar ağırlıklı olarak GSTM1, p53, XRCC1, XRCC3 ve OGG1 polimorfizmleri üzerinde durulmuştur<sup>101-104</sup>.

Çalışmamızda, Challenge tekniği ile %DNA onarım kapasiteleri incelendiğinde, toplam HPV pozitif bireylerin, HPV 16 ve 18 pozitif bireylerin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış %DNA onarım kapasitelerine sahip olduğu görülmüştür. Bu durum hem Challenge yönteminin duyarlılığının periferik kan lenfositlerinde uyguladığımız comet tekniğine ve kromozomal aberasyon yöntemine kıyasla daha yüksek olduğunu göstermektedir, hem de HPV enfeksiyonunun DNA onarım mekanizmasını olumsuz yönde etkilediğine dikkat çekmektedir.

P53 nonspesifik olarak radyasyonun indüklediği tek veya çift sarmal kırıklarına bağlanır ve bu sayede DNA onarımı veya hücrenin programlı ölümü gerçekleşir<sup>169</sup>. HPV enfeksiyonu varlığında zaten inaktive olan p53 sistemi DNA hasarını onarmada yetersiz kalır ve apoptozis inhibe olur. Bir diğer olası mekanizma da, DNA tek sarmal kırıklarının ve genetik instabilitenin onarılmasında görevli XRCC1 proteini ile HPV E6 proteinlerinin etkileşmesi sonucu DNA onarımının azalabileceğidir<sup>110</sup>. Çalışmamız bu hipotezi doğrular şekilde, challenge tekniği ile HPV pozitif bireylerde azalan DNA onarım kapasitesini belirlemiştir. HPV enfeksiyonunun yanı sıra patoloji gelişimi ve sigara içme alışkanlığı da DNA onarım kapasitesinde olumsuz etkiye sahiptir.

Yaş ile HPV 16 pozitif bireylerin serviks sürüntü hücrelerinde kuyruktaki %DNA değerleri arasında pozitif korelasyon vardır ( $p < 0.05$ ), ayrıca HPV 18 pozitif bireylerde kromozomal aberasyon tekniği sonuçları ile ilk koit yaşı arasında pozitif korelasyon belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ).

Çalışmamızda HPV pozitif bireylerde patoloji gelişimi ile sigaranın ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur. HPV 16 pozitif bireylerde de patoloji gelişimi sigara alışkanlığı ile ilişkili bulunmasına ( $p < 0,05$ ) karşılık HPV 18 pozitif bireylerde anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ( $p > 0,05$ ).

Enfeksiyöz bir ajan varlığında sigara içmek kanser gelişimi açısından en önemli korunulabilir risk faktörüdür<sup>2</sup>. HPV pozitif bireylerde sigara içme alışkanlığı ile servikal kanser riskinin arttığı çok merkezli vaka kontrol çalışmaları ile gösterilmiştir<sup>84</sup>. Serviks karsinojenlerin metabolizasyonunda görevli enzimleri eksprese eder, ancak HPV varlığında bu enzimlerin modifiye olması sonucunda karsinojenik süreç başlar<sup>170,171</sup>.

Sigara içme alışkanlığı, periferik kan lenfositlerinde DNA hasarını indükler. Comet tekniği oluşan DNA hasarının izlenmesinde uygun bir biyogösterge olarak kullanılmaktadır<sup>172</sup>. Comet tekniği ile periferik kan lenfositlerinde kontrol grubunda sigara içen bireyler, sigara içmeyen bireylere göre daha yüksek DNA hasarına sahiptirler ( $p < 0,05$ ). Ayrıca, HPV pozitif grupta da sigara içen bireyler sigara içmeyenlere göre daha yüksek DNA hasarına sahiptirler ( $p < 0,01$ ). Ancak kromozomal aberasyon tekniği ile sigara içme alışkanlıkları değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ( $p > 0,05$ ).

Servikal sürüntü hücrelerinde comet tekniğini uygulandığında, HPV pozitif sigara içen bireylerin HPV pozitif sigara içmeyen bireylere göre daha yüksek DNA hasarına sahip olduğu görülmüştür ( $p < 0,001$ ). Challenge tekniği ile de HPV pozitif sigara içen bireyler hem kontrol grubunun sigara içenlerine göre hem de HPV pozitif sigara içmeyenlere göre anlamlı derecede daha düşük DNA onarım kapasitesine sahiptirler.

Sonuçlarımızla uyumlu şekilde, Simons ve arkadaşları, sigara içme alışkanlığı sonucunda serviks epitelinde DNA katım ürünlerinin oluştuğunu ve bu durumun da serviks kanseri gelişimi ile ilişkisi olduğunu belirtmişlerdir<sup>173</sup>. Sigara içen bireylerin servikal mukus örneklerinde içmeyenlere kıyasla anlamlı derecede yüksek benzo(a)piren ve dihidrodol, fenol, tetraol türevleri GC-MS yöntemi ile tespit edilmiş. Ayrıca BPDE–DNA katım ürünlerinin oluşumunun sigara içenlerde sigara içmeyen gruba göre iki kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir<sup>174</sup>. Sigara içen bireylerin servikal mukus



örneklerinde sigara içmeyen bireylere oranla anlamlı derecede yüksek nikotin ve kotinin konsantrasyonları tespit edilmiştir. Tütün bileşenlerinin gerçekten servikse kadar ulaştığı ve kanser epidemiyolojisinde rol oynayabileceği sonucuna varmışlardır<sup>175</sup>. Sigara içen bireylerin servikal mukus örneklerinde içmeyenlere kıyasla anlamlı derecede yüksek potent bir karsinogen olan NNK [nitrosamin 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon] tespit edilmiş ve servikal kanser ile sigara arasındaki ilişkiye dikkati çekmiştir<sup>176</sup>.

Sonuç olarak, bu çalışma ile yüksek riskli HPV 16 ve 18 ile enfeksiyonun özellikle hedef hücre grubu olan servikal sürüntü hücrelerinde DNA hasarına sebep olduğu, ancak periferik kan lenfositlerinde bu etkinin tespit edilemediği görülmüştür. Comet tekniği servikal sürüntü hücrelerinde HPV enfeksiyonunun indüklediği DNA hasarını belirlemede uygun bir biyogöstergedir. HPV enfeksiyonunun indüklediği DNA hasarının tespitinde patoloji gelişimi ve sigara içme alışkanlıkları da önem kazanmaktadır. Duyarlılığın biyogöstergesi olan radyasyonla indüklenmiş Challenge tekniği ile HPV enfeksiyonu sonucu DNA onarım kapasitelerinin azaldığı, patoloji gelişimi ve sigara içme alışkanlığının da DNA onarım kapasitelerini olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir. Bireyin genetik duyarlılığı servikal kanser gelişiminde son derece önemlidir. Servikal kanser öncül lezyonlarının bazı bireylerde kendi kendine iyileşmesi bazı bireylerde kanser gelişimine sebep olması ve HPV ile enfekte olan kadınların çok az bir kısmı servikal kansere yakalanması genetik duyarlılığın servikal kanserdeki önemini doğrulamaktadır. HPV enfeksiyonunda DNA onarım kapasitesinin Challenge tekniği ile belirlenmesinden, servikal kansere yatkınlığın ve sağlık riskinin öngörülmesinde yararlanılabilir.

## VI. ÖZET

Viral enfeksiyonlar insanlarda kanser gelişimi için önemli bir kaynaktır. İnsanlarda görülen tüm kanser vakalarının yaklaşık %20'sinin viral kaynaklı olduğuna inanılmaktadır. Serviks kanseri kadınlarda ikinci en yaygın malignansidir. Human papillomavirus (HPV) enfeksiyonu dünyada en yaygın cinsel yolla bulaşan hastalıktır ve serviks kanserinin en önemli etkenidir. Tüm serviks kanseri vakalarının yaklaşık %80-90'ında HPV DNA'sı tespit edilmiştir ve 1995 yılında IARC HPV 16 ve 18'i insan karsinojeni (Grup 1) olarak sınıflandırmıştır.

Çalışmamız HPV enfeksiyonuna bağlı gelişebilecek genotoksisite ve DNA onarım farklılıklarını tespit etmek amacıyla, 31 HPV 16, 23 HPV 18 pozitif kadından ve 24 kişilik, yaşları çalışma grubumuzla uyumlu olacak şekilde seçilmiş HPV negatif sağlıklı kontrol grubundan oluşmuştur. HPV tipleri RT-PCR ile yapılmıştır.

HPV pozitif grupta, periferal kan lenfositlerinde kromozomal aberasyon ve comet tekniği ile belirlenen kromozomal aberasyon frekansı ve kuyruktaki %DNA kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık göstermemiştir, ancak hedef hücre grubu olan servikal sürüntü hücrelerinde comet tekniği uygulandığında HPV pozitif bireyler istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek DNA hasarı belirlenmiştir ( $p < 0,0001$ ).

Duyarlılığın biyogöstergesi olarak kullanılan Challenge tekniği ile HPV pozitif grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük %DNA onarım kapasitesi belirlenmiştir. Çalışmamızın sonuçları, Servikal sürüntü hücrelerinin periferal kan lenfositlerine göre HPV'nin indüklediği DNA hasarını belirlemede daha hassas olduğunu ve Comet tekniğinin bu hasarı belirlemede bir biyogösterge olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

DNA onarım kapasitesinin çeşitli maruziyetlerde ve enfeksiyonlarda farklılık gösterebileceği duyarlılığın biyogöstergesi olan Challenge tekniği ile hassas bir şekilde saptanabilmektedir. Bu teknikten klinikte HPV pozitif bireylerin serviks kanserine duyarlılığının belirlenmesinde yararlanılabilir.

## VII. SUMMARY

Viral infections are important sources for human cancers. Approximately 20% of all human cancers are thought to be caused by viruses. Cervical cancer is the second most frequent malignancy in women. Human papillomavirus (HPV) infection is the most common sexually transmitted disease in the world and the main cause of cervical cancer. HPV DNA is detected approximately 80-90% of all cervical cancers and in 1995, IARC classified HPV 16 and 18 as human carcinogens (Group 1).

This study was comprised of 31 HPV 16, 23 HPV 18 positive women and 24 age-matched HPV negative healthy control individuals to identify the genotoxicity and DNA repair variability caused by HPV infection. HPV typings were detected by RT-PCR.

Chromosomal aberration frequency and tail intensity% in HPV positive group and control group were not statistically different by chromosomal aberration and comet techniques in peripheral blood lymphocytes ( $p > 0,05$ ), however, a statistically significant increase in DNA damage ( $p < 0,0001$ ) was observed by comet assay in cervical cells of HPV positive individuals' which is the target cell group for HPV infection.

Challenge assay which is used as the biomarker of susceptibility demonstrated statistically significantly reduced DNA repair capacity in HPV positive group as compared with the control group ( $p < 0,0001$ ). These results demonstrate that cervical cells are much more sensitive than peripheral lymphocytes for detecting the HPV induced DNA damage and comet assay can be used as a biomarker for detecting this damage.

The difference in the DNA repair capacity in various exposures and infections can be sensitively determined by Challenge assay which is one of the

biomarkers of susceptibility. This technique can be utilized clinically for identification of cervical cancer susceptibility in HPV positive individuals.

## VIII. KAYNAKLAR

1. MUNGER, K., HAYAKAWA, H., NGUYEN, C.L., MELQUIOT, N.V., DUENSING, A., DUENSING, S.: Viral carcinogenesis and genomic instability, *EXS*, 96, 179-99, (2006)
2. HERRERA, L.A., BENITEZ-BRIBIESCA, L., MOHAR, A., OSTROSKY-WEGMAN, P.: Role of infectious diseases in human carcinogenesis, *Environ Mol Mutagen.*, 45, 284-303, (2005)
3. STOLER, M.H.: Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis, *Int J Gynecol Pathol.*, 19, 16-28, (2000)
4. SCHEURER, M.E., TORTOLERO-LUNA, G., ADLER-STORTHZ, K.: Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention, *Int J Gynecol Cancer*, 15, 727-46, (2005)
5. SANCLEMENTE, G., GILL, D.K.: Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis, *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, 16, 231-40, (2002)
6. ALANI, R.M., MUNGER, K.: Human papillomaviruses and associated malignancies, *J Clin Oncol.*, 16, 330-7, (1998)
7. STRAUSS, S., SASTRY, P., SONNEX, C., EDWARDS, S., GRAY, J. : Contamination of environmental surfaces by genital human papillomaviruses, *Sex Transm Infect.*, 78, 135-8, (2002)
8. WILEY, D., MASONGSONG, E.: Human papillomavirus: the burden of infection, *Obstet Gynecol Surv.*, 61, 3-14, (2006)
9. BRENNAN, S.M., SYRJANEN, K.J.: Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis, *Sao Paulo Med J.*, 121, 128-32, (2003)
10. EINSTEIN, M.H., GOLDBERG, G.L.: Human papillomavirus and cervical neoplasia, *Cancer Invest.*, 20, 1080-5, (2002)

11. BOSCH, F.X., MUNOZ, N.: The viral etiology of cervical cancer, *Virus Res.*, 89, 183-90, (2002)
12. JASTREBOFF, A.M., CYMET, T.: Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy, *Postgrad Med J.*, 78, 225-8, (2002)
13. DIMAIO, D., LIAO, J.B.: Human papillomaviruses and cervical cancer, *Adv Virus Res.*, 66, 125-59, (2006)
14. SEVERSON, J., EVANS, T.Y., LEE, P., CHAN, T., ARANY, I., TYRING, S.K.: Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and therapy, *J Cutan Med Surg.*, 5, 43-60, (2001)
15. AU, W.W.: Life style, environmental and genetic susceptibility to cervical cancer, *Toxicology*, 198, 117-20, (2004)
16. DUENSING, S., MUNGER, K.: Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins, *Prog Cell Cycle Res.*, 5, 383-91, (2003)
17. DRAIN, P.K., HOLMES, K.K., HUGHES, J.P., KOUTSKY, L.A.: Determinants of cervical cancer rates in developing countries, *Int J Cancer*, 100, 199-205, (2002)
18. DENNY, L.A., WRIGHT, T.C. JR.: Human papillomavirus testing and screening, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, 19, 501-15, (2005)
19. NORPPA, H., BONASSI, S., HANSTEEN, I.L., HAGMAR, L., STROMBERG, U., ROSSNER, P., BOFFETTA, P., LINDHOLM, C., GUNDY, S., LAZUTKA, J., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIANOVA, E., SRAM, R.J., KNUDSEN, L.E., BARALE, R., FUCIC, A.: Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk, *Mutation Research*, 600, 37–45, (2006)
20. BONASSI, S., HAGMAR, L., STROMBERG, U., MONTAGUD, A.H., TINNERBERG, H., FORNI, A., HEIKKILA, P., WANDERS, S., WILHARDT, P., HANSTEEN, I.L., KNUDSEN, L.E., NORPPA, H.: Chromosomal aberrations in

lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health, *Cancer Res.*, 60, 1619-25, (2000)

21. CEBULSKA-WASILEWSKA, A.: Response to challenging dose of X-rays as a predictive assay for molecular epidemiology, *Mutat Res.*, 544, 289-97, (2003)
22. SEDLACEK, T.V.: Advances in the diagnosis and treatment of human papillomavirus infections, *Clin Obstet Gynecol.*, 42, 206-20, (1999)
23. KOUTSKY, L.A, WOLNER-HANSEN, P.: Genital papillomavirus infections: current knowledge and future prospects, *Obstet Gynecol Clin North Am.*, 16, 541-64, (1989)
24. SYRJANEN, K.J.: Epidemiology of human papillomavirus (HPV) infections and their associations with genital squamous cell cancer, *APMIS*, 97, 957-70, (1989)
25. DE VILLIERS EM, FAUQUET C, BROKER TR, BERNARD HU, ZUR HAUSEN H.: Classification of papillomaviruses, *Virology*, 324, 17-27, (2004)
26. BURD, E.M.: Human papillomavirus and cervical cancer, *Clin Microbiol Rev.*, 16, 1-17, (2003)
27. LOWLY, D.R., HOWLEY, P.M.: Chapter:66 Papillomaviruses in "Fields Virology", (KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., ed.), Fourth ed., Vol.2, 2231-2264, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia-USA, (2001)
28. MUNOZ, N., CASTELLSAGUE, X., DE GONZALEZ, A.B., GISSMANN, L.: Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer, *Vaccine*, 24, 1-10, (2006)
29. ZUR HAUSEN H.: Papillomaviruses in human cancers, *Proc Assoc Am Physicians*, 111, 581-7, (1999)
30. FAVRE, M., RAMOZ, N., ORTH, G.: Human Papillomaviruses: General Features, *Clinics in Dermatology*, 15, 181-198, (1997)
31. BASEMAN, J.G., KOUTSKY, L.A.: The epidemiology of human papillomavirus infections, *J Clin Virol*, 32, 16-24, (2005)



32. WINER, R.L., LEE, S.K., HUGHES, J.P., ADAM, D.E., KIVIAT, N.B., KOUTSKY, L.A.: Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students, *Am J Epidemiol.*, 157, 218-26, (2003)
33. DUNNE, E.F., MARKOWITZ, L.E.: Genital human papillomavirus infection, *Clin Infect Dis.*, 43, 624-9, (2006)
34. MCMURRAY, H.R., NGUYEN, D., WESTBROOK, T.F., MCANCE, D.J.: Biology of human papillomaviruses, *Int J Exp Pathol.*, 82, 15-33, (2001)
35. KOUTSKY, L.: Epidemiology of Genital Human Papillomavirus Infection, *Am J Med.*, 102, 3-8. (1997)
36. ZUR HAUSEN, H.: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application, *Nat Rev Cancer*, 2(5), 342-50, (2002)
37. AULT, K.A.: Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract, *Infect Dis Obstet Gynecol.*, 14(1), 1-5, (2006)
38. GARCIA-VALLVE, S., ALONSO, A., BRAVO, I.G.: Papillomaviruses: different genes have different histories, *Trends Microbiol.* 13(11), 514-21, (2005)
39. WOLF, J.K., RAMIREZ, P.T.: The molecular biology of cervical cancer, *Cancer Invest.*, 19(6), 621-9, (2001)
40. GARLAND, S.M., FAULKNER-JONES, B.E., FORTUNE, D.W., QUINN, M.A.: Cervical cancer--what role for human papillomavirus?, *Med J Aust.*, 156(3), 204-12, (1992)
41. STUBENRAUCH, F., LAIMINS, L.A.: Human papillomavirus life cycle: active and latent phases, *Semin Cancer Biol.*, 9(6), 379-86, (1999)
42. MOSCICKI, A.B., SCHIFFMAN, M., KJAER, S., VILLA, L.L.: Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer, *Vaccine*, 24, 42-51, (2006)

43. ENEMARK, E.J., CHEN, G., VAUGHN, D.E., STENLUND, A., JOSHUA-TOR, L.: Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus, *Mol Cell.*, 6, 49-58, (2000)
44. DELL, G., GASTON, K.: Human papillomaviruses and their role in cervical cancer, *Cell Mol Life Sci.*, 58, 1923-42, (2001)
45. MUNGER, K., HOWLEY, P.M.: Human papillomavirus immortalization and transformation functions, *Virus Res.*, 89, 213-28, (2002)
46. ZHENG, Z.M., BAKER, C.C.: Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation, *Front Biosci.*, 11, 2286-302, (2006)
47. KESSIS, T.D., SLEBOS, R.J., NELSON, W.G., KASTAN, M.B., PLUNKETT, B.S., HAN, S.M., LORINCZ, A.T., HEDRICK, L., CHO, K.R.: Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 3988-3992, (1993)
48. VON KNEBEL DOEBERITZ, M.: New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections, *European Journal of Cancer*, 38, 2229–2242, (2002)
49. BUTEL, J.S.: Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease, *Carcinogenesis*, 21, 405-26, (2000)
50. ZUR HAUSEN, H.: Viruses in human cancers, *Science*, 254, 1167-73, (1991)
51. WEINBERG, R.A.: The cat and mouse games that genes, viruses, and cells play, *Cell*, 88, 573-5, (1997)
52. GOLLIN, S.M.: Mechanisms leading to chromosomal instability, *Semin Cancer Biol.*, 15, 33-42, (2005)
53. AU, W.W., SIERRA-TORRES, C.H., TYRING, S.K.: Acquired and genetic susceptibility to cervical cancer, *Mutat Res.*, 544, 361-4, (2003)
54. HESELMAYER, K., SCHROCK, E., DU MANOIR, S., BLEGEN, H., SHAH, K., STEINBECK, R., AUER, G., RIED, T.: Gain of chromosome 3q defines the

transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix, Proc Natl Acad Sci USA., 93, 479-84, (1996)

55. DUENSING, S., MUNGER, K.: The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability, Cancer Res., 62, 7075-82, (2002)
56. GIANNOUDIS, A., EVANS, M.F., SOUTHERN, S.A., HERRINGTON, C.S.: Basal keratinocyte tetrasomy in low-grade squamous intra-epithelial lesions of the cervix is restricted to high and intermediate risk HPV infection but is not type-specific, Br J Cancer, 82, 424-8, (2000)
57. MIAN, C., BANCHER, D., KOHLBERGER, P., KAINZ, C., HAITEL, A., CZERWENKA, K., STANI, J., BREITENECKER, G., WIENER, H.: Fluorescence in Situ Hybridization in cervical smears: detection of numerical aberrations of chromosomes 7,3, and X and relationship to HPV infection, Gynecologic Oncology, 75, 41-46, (1999)
58. JIN, Y., ZHANG, H., TSAO, S.W., JIN, C., LV, M., STROMBECK, B., WIEGANT, J., WAN, T.S.K., YUEN, P.W., KWONG, Y.L.: Cytogenetic and molecular genetic characterization of immortalized human ovarian surface epithelial cell lines: consistent loss of chromosome 13 and amplification of chromosome 20, Gynecologic Oncology, 92, 183-191, (2004)
59. SMITH, P.P., BRYANT, E.M., KAUR, P., MCDUGALL, J.K.: Cytogenetic analysis of eight human papillomavirus immortalized human keratinocyte cell lines, Int J Cancer, 44, 1124-31, (1989). Abs.
60. WHITE, A.E., LIVANOS, E.M., TLSTY, T.D.: Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins, Genes Dev., 666-77, (1994). Abs
61. MATTHEWS, C.P., SHERA, K.A., MCDUGALL, J.K.: Genomic changes and HPV type in cervical carcinoma, Proc Soc Exp Biol Med., 223, 316-21, (2000)

62. HESELMEYER, K., MACVILLE, M., SCHROCK, E., BLEGEN, H., HELLSTROM, A.C., SHAH, K., AUER, G., RIED, T.: Advanced-Stage Cervical Carcinomas Are Defined by a Recurrent Pattern of Chromosomal Aberrations Revealing High Genetic Instability and a Consistent Gain of Chromosome Arm 3q, *Genes, Chromosomes & Cancer*, 19:233–240 (1997)
63. DUENSING, S.: A tentative classification of centrosome abnormalities in cancer, *Cell Biol Int.*, 29, 352-9, (2005)
64. DUENSING, S., DUENSING, A., FLORES, E.R., DO, A., LAMBERT, P.F., MUNGER, K.: Centrosome abnormalities and genomic instability by episomal expression of human papillomavirus type 16 in raft cultures of human keratinocytes, *J Virol.*, 75, 7712-6, (2001)
65. SKYLDBERG, B., FUJIOKA, K., HELLSTROM, A.C., SYLVEN, L., MOBERGER, B., AUER, G.: Human papillomavirus infection, centrosome aberration, and genetic stability in cervical lesions, *Mod Pathol.*, 14, 279-84, (2001)
66. DUARTE-FRANCO, E., FRANCO, E.L.: Cancer of the Uterine Cervix, *BMC Womens Health*, 4, 1-13, (2004)
67. PINTO, A.P., CRUM, C.P.: Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequence, *Clin Obstet Gynecol.*, 43, 352-62, (2000).  
Abs.
68. DUNNE, E.F., NIELSON, C.M., STONE, K.M., MARKOWITZ, L.E., GIULIANO, A.R.: Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature, *J Infect Dis.*, 94, 1044-57, (2006)
69. TJIONG, M.Y., OUT, T.A., TER SCHEGGET, J., BURGER, M.P., VAN DER VANGE, N.: Epidemiologic and mucosal immunologic aspects of HPV infection and HPV-related cervical neoplasia in the lower female genital tract: a review, *Int J Gynecol Cancer*, 11, 9-17, (2001)

70. CHIRENJE, Z.M.: HIV and cancer of the cervix, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, 19, 269-76, (2005)
71. DAO, D.D., SIERRA-TORRES, C.H., ROBAZETTI, S.C., DE GOMEZ, M.N., KONIG, R., LEMA, C., LESTER, L.J., AU, W.W., TYRING, S.K.: HLA-DQB1 and cervical cancer in Venezuelan women, *Gynecol Oncol.*, 96, 349-54, (2005)
72. LEVIE, M.D., EINSTEIN, M.H., GOLDBERG, G.L.: Cervical intraepithelial neoplasia: an overview of diagnosis and management, *Cancer Invest.*, 20, 769-76, (2002)
73. BURCHELL, A.N., WINER, R.L., DE SANJOSE, S., FRANCO, E.L.: Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection, *Vaccine*, 24, 52-61, (2006)
74. GOLDIE, S.J., KIM, J.J., MYERS, E.: Chapter 19: Cost-effectiveness of cervical cancer screening, *Vaccine*, 24, 164-70, (2006)
75. CHAN, P.K., CHANG, A.R., CHEUNG, J.L., CHAN, D.P., XU, L.Y., TANG, N.L., CHENG, A.F.: Determinants of cervical human papillomavirus infection: differences between high- and low-oncogenic risk types, *J Infect Dis.*, 185, 28-35, (2002)
76. SILINS I, KALLINGS I, DILLNER J.: Correlates of the spread of human papillomavirus infection, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 9, 953-9, (2000)
77. AF GEIJERSSTAM, V., EKLUND, C., WANG, Z., SAPP, M., SCHILLER, J.T., DILLNER, J., DILLNER, L.: A survey of seroprevalence of human papillomavirus types 16, 18 and 33 among children, *Int J Cancer*, 80, 489-93, (1999)
78. CASTELLSAGUE, X., BOSCH, F.X., MUNOZ, N.: Environmental co-factors in HPV carcinogenesis, *Virus Res.*, 89(2), 191-9, (2002)
79. CASTELLSAGUE, X., BOSCH, F.X., MUNOZ, N.: The male role in cervical cancer, *Salud Publica Mex.*, 45, 345-53, (2003)

80. HO, G.Y., BIERMAN, R., BEARDSLEY, L., CHANG, C.J., BURK, R.D.: Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women, *N Engl J Med.*, 338, 423-8, (1998)
81. HERRERO, R., HILDESHEIM, A., BRATTI, C., SHERMAN, M.E., HUTCHINSON, M., MORALES, J., BALMACEDA, I., GREENBERG, M.D., ALFARO, M., BURK, R.D., WACHOLDER, S., PLUMMER, M., SCHIFFMAN, M.: Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica, *J Natl Cancer Inst.*, 92, 464-74, (2000)
82. MACKAY, J., AMOS, A.: Women and tobacco, *Respirology*, 8, 123-30, (2003)
83. RIECK, G., FIANDER, A.: The effect of lifestyle factors on gynaecological cancer, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, 20, 227-51, (2006)
84. PLUMMER, M., HERRERO, R., FRANCESCHI, S., MEIJER, C.J., SNIJDERS, P., BOSCH, F.X., DE SANJOSE, S., MUNOZ, N.; IARC Multi-centre Cervical Cancer Study Group, Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case--control study, *Cancer Causes Control*, 14, 805-14, (2003)
85. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies, *Int J Cancer*, 118, 1481-95, (2006)
87. CASTLE, P.E., WACHOLDER, S., SHERMAN, M.E., LORINCZ, A.T., GLASS, A.G., SCOTT, D.R., RUSH, B.B., DEMUTH, F., SCHIFFMAN, M.: Absolute risk of a subsequent abnormal pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women, *Cancer*, 95, 2145-51, (2002)
88. CERQUEIRA, E.M., SANTORO, C.L., DONOZO, N.F., FREITAS, B.A., PEREIRA, C.A., BEVILACQUA, R.G., MACHADO-SANTELLI, G.M.: Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix. Association and interaction

between cigarette smoking and progression to malignant transformation? *Acta Cytol*, 42, 639-49, (1998)

89. SOOD, A.K.: Cigarette smoking and cervical cancer: meta-analysis and critical review of recent studies, *Am J Prev Med.*, 7, 208-13, (1991) (Abs)
90. SZAREWSKI A, JARVIS MJ, SASIENI P, ANDERSON M, EDWARDS R, STEELE SJ, GUILLEBAUD J, CUZICK J.: Effect of smoking cessation on cervical lesion size, *Lancet*, 347, 941-3, (1996)
91. GREEN, J., BERRINGTON DE GONZALEZ, A., SMITH, J.S., FRANCESCHI, S., APPLEBY, P., PLUMMER, M., BERAL, V.: Human papillomavirus infection and use of oral contraceptives, *Br J Cancer*, 88, 1713-20, (2003)
92. CASTLE, P.E., WALKER, J.L., SCHIFFMAN, M., WHEELER, C.M.: Hormonal contraceptive use, pregnancy and parity, and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 among oncogenic HPV DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology, *Int J Cancer*, 117, 1007-12, (2005)
93. SMITH, J.S., GREEN, J., BERRINGTON DE GONZALEZ, A., APPLEBY, P., PETO, J., PLUMMER, M., FRANCESCHI, S., BERAL, V.: Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review, 361, 1159-67, (2003)
94. CASTELLSAGUE, X., DIAZ, M., DE SANJOSE, S., MUNOZ, N., HERRERO, R., FRANCESCHI, S., PEELING, R.W., ASHLEY, R., SMITH, J.S., SNIJDERS, P.J., MEIJER, C.J., BOSCH, F.X.: International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group, Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention, *J Natl Cancer Inst.*, 98, 303-15, (2006)
95. CANAVAN, T.P., DOSHI, N.R.: Cervical cancer, *Am Fam Physician.*, 61, 1369-76, (2000)

96. FRANCO, E.L., VILLA, L.L., RUIZ, A., COSTA, M.C.: Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types, *J Infect Dis.*, 172, 756-63, (1995)
97. ROCK, C.L., MICHAEL, C.W., REYNOLDS, R.K., RUFFIN, M.T.: Prevention of cervix cancer, *Crit Rev Oncol Hematol.*, 33, 169-85. (2000)
98. CASTLE, P.E., GIULIANO, A.R.: Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors, *J Natl Cancer Inst Monogr.*, 31, 29-34, (2003)
99. GARCIA-CLOSAS, R., CASTELLSAGUE, X., BOSCH, X., GONZALEZ, C.A.: The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence, *Int J Cancer.* 117, 629-37, (2005)
100. NORPPA, H.: Genetic susceptibility, biomarker responses, and cancer, *Mutat Res.*, 544, 339-48, (2003)
101. SIERRA-TORRES, C.H., AU, W.W., ARRASTIA, C.D., CAJAS-SALAZAR, N., ROBAZETTI, S.C., PAYNE, D.A., TYRING, S.K.: Polymorphisms for chemical metabolizing genes and risk for cervical neoplasia, *Environ Mol Mutagen.*, 41, 69-76, (2003)
102. WU, M.T., LIU, C.L., HO, C.K., WU, T.N.: Genetic polymorphism of p53 and XRCC1 in cervical intraepithelial neoplasm in Taiwanese women, *J Formos Med Assoc.*, 103, 337-43, (2004)
103. DE RUYCK, K., VAN EIJKEREN, M., CLAES, K., MORTIER, R., DE PAEPE, A., VRAL, A., DE RIDDER, L., THIERENS, H.: Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 62, 1140-9, (2005)
104. STOREY, A., THOMAS, M., KALITA, A., HARWOOD, C., GARDIOL, D., MANTOVANI, F., BREUER, J., LEIGH, I.M., MATLASHEWSKI, G.: Role of a



p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer, *Nature*, 393, 229-34, (1998)

105. RADHAKRISHNA PILLAI, M., SREEVIDYA, S., POLLOCK, B.H., JAYAPRAKASH, P.G., HERMAN, B.: Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer, *Gynecol Oncol.*, 87, 268-73, (2002)
106. NISHIKAWA, A., FUJIMOTO, T., AKUTAGAWA, N., IWASAKI, M., TAKEUCHI, M., FUJINAGA, K., KUDO, R.: p53 Polymorphism (codon-72) has no correlation with the development and the clinical features of cervical cancer, *Int J Gynecol Cancer*, 10, 402-407, (2000)
107. SETTHEETHAM-ISHIDA, W., KANJANAVIROJKUL, N., KULARBKAEW, C., ISHIDA, T.: Human papillomavirus genotypes and the p53 codon 72 polymorphism in cervical cancer of Northeastern Thailand, *Microbiol Immunol.*, 49, 417-21, (2005)
108. JEE, S.H., WON, S.Y., YUN, J.E., LEE, J.E., PARK, J.S., JI, S.S.: Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis, *Int J Gynaecol Obstet.*, 85, 301-8, (2004)
109. LI, T., LU, Z.M., GUO, M., WU, Q.J., CHEN, K.N., XING, H.P., MEI, Q., KE, Y.: p53 codon 72 polymorphism (C/G) and the risk of human papillomavirus-associated carcinomas in China, *Cancer*, 95, 2571-6, (2002)
110. IFTNER, T., ELBEL, M., SCHOPP, B., HILLER, T., LOIZOU, J.I., CALDECOTT, K.W., STUBENRAUCH, F.: Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1, *The EMBO Journal*, 21, 4741-4748, (2002)
111. SCHILLER, J.T., NARDELLI-HAEFLIGER, D.: Chapter 17: Second generation HPV vaccines to prevent cervical cancer, *Vaccine*, Suppl 3, 147-53, (2006)

112. DA SILVA, D.M., EIBEN, G.L., FAUSCH, S.C., WAKABAYASHI, M.T., RUDOLF, M.P., VELDERS, M.P., KAST, W.M.: Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments, *J Cell Physiol.*, 186, 169-82, (2001)
113. LEHTINEN, M., HERRERO, R., MAYAUD, P., BARNABAS, R., DILLNER, J., PAAVONEN, J., SMITH, P.G.: Chapter 28: Studies to assess the long-term efficacy and effectiveness of HPV vaccination in developed and developing countries, *Vaccine*, 24, 233-41, (2006)
114. KANE, M.A., SHERRIS, J., COURSAGET, P., AGUADO, T., CUTTS, F.: Chapter 15: HPV vaccine use in the developing world, *Vaccine*, 24, 132-9, (2006)
115. SHERRIS J, FRIEDMAN A, WITTET S, DAVIES P, STEBEN M, SARAIYA M.: Chapter 25: Education, training, and communication for HPV vaccines, *Vaccine*, 24, 210-8, (2006)
116. ARVAS M, GEZER A, Human Papillomavirus Vaccines, *J Turkish-German Gynecol Assoc*, 7, 250-255, (2006)
117. WRIGHT, T.C., VAN DAMME, P., SCHMITT, H.J., MEHEUS, A.: Chapter 14: HPV vaccine introduction in industrialized countries, *Vaccine*, 24, 122-31, (2006)
118. <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2003/NEW00890.html>, FDA Approves Expanded Use of HPV Test (02.02.2007)
119. INSINGA, R.P., GLASS, A.G., RUSH, B.B.: The health care costs of cervical human papillomavirus--related disease, *Am J Obstet Gynecol.*, 191, 114-20, (2004)
120. SCHLECHT, N.F., BURK, R.D., PALEFSKY, J.M., MINKOFF, H., XUE, X., MASSAD, L.S., BACON, M., LEVINE, A.M., ANASTOS, K., GANGE, S.J., WATTS, D.H., DA COSTA, M.M., CHEN, Z., BANG, J.Y., FAZZARI, M., HALL, C., STRICKLER, H.D.: Variants of human papillomaviruses 16 and 18 and their

natural history in human immunodeficiency virus-positive women, *J Gen Virol.*, 86, 2709-20, (2005)

121. BERUMEN, J., ORDONEZ, R.M., LAZCANO, E., SALMERON, J., GALVAN, S.C., ESTRADA, R.A., YUNES, E., GARCIA-CARRANCA, A., GONZALEZ-LIRA, G., MADRIGAL-DE, L.A., CAMPA, A.: Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study, *J Natl Cancer Inst.*, 93, 1325-30, (2001)
122. KIRSCHNER, B., SIMONSEN, K., JUNGE, J.: Comparison of conventional Papanicolaou smear and SurePath liquid-based cytology in the Copenhagen population screening programme for cervical cancer, *Cytopathology*, 17, 187-94, (2006)
123. SHEARY, B., DAYAN, L.: Cervical screening and human papillomavirus, *Aust Fam Physician.*, 34, 578-80, (2005)
124. BASEN-ENGQUIST, K., PASKETT, E.D., BUZAGLO, J., MILLER, S.M., SCHOVER, L., WENZEL, L.B., BODURKA, D.C.: Cervical cancer, *Cancer*, 98, 2009-14, (2003)
125. SCHLECHT, N.F., PLATT, R.W., DUARTE-FRANCO, E., COSTA, M.C., SOBRINHO, J.P., PRADO, J.C., FERENCZY, A., ROHAN, T.E., VILLA, L.L., FRANCO, E.L.: Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia, *J Natl Cancer Inst.*, 95, 1336-43, (2003)
126. GARLAND, SM, FAULKNER-JONES BE, FORTUNE DW, QUINN MA.: Cervical cancer--what role for human papillomavirus? *Med J Aust.*, 156, 204-212, (1992)
127. SHARMA, A., MENON, U.: Screening for gynaecological cancers, *Eur J Surg Oncol.*, 32, 818-24, (2006)
128. CLAVEL, C., MASURE, M., LEVERT, M., PUTAUD, I., MANGEONJEAN, C., LORENZATO, M., NAZEYROLLAS, P., GABRIEL, R., QUEREUX, C.,

- BIREMBAUT, P.: Human papillomavirus detection by the hybrid capture II assay: a reliable test to select women with normal cervical smears at risk for developing cervical lesions, *Diagn Mol Pathol.*, 9, 145-50, (2000)
129. HUBBARD, R.A.: Human papillomavirus testing methods, *Arch Pathol Lab Med.*, 127, 940-5 (2003)
130. SHAH, K.V., SOLOMON, L., DANIEL, R., COHN, S., VLAHOV, D.: Comparison of PCR and hybrid capture methods for detection of human papillomavirus in injection drug-using women at high risk of human immunodeficiency virus infection, *J Clin Microbiol.*, 35, 517-9, (1997)
131. BRYANT-GREENWOOD, P.: Molecular diagnostics in obstetrics and gynecology, *Clin Obstet Gynecol*, 45, 605-21, (2002)
132. CHEN, Y.C., HUNTER, D.J.: Molecular epidemiology of cancer, *CA Cancer J Clin.*, 55, 45-54, (2005)
133. FENECH, M.: Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer, *Drug Discov Today.*, 7, 1128-37, (2002)
134. ALBERTINI, R.J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G.R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A.T., NORPPA, H., SHUKER, D.E., TICE, R., WATERS, M.D., AITIO, A.: IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety, *Mutat Res.*, 463, 111-72, (2000)
135. MATEUCA, R., LOMBAERT, N., AKA, P.V., DECORDIER, I., KIRSCH-VOLDERS, M.: Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *Biochimie*, 88, 1515-31, (2006)
136. OBE, G., PFEIFFER, P., SAVAGE, J.R., JOHANNES, C., GOEDECKE, W., JEPPESEN, P., NATARAJAN, A.T., MARTINEZ-LOPEZ, W., FOLLE, G.A., DRETS, M.E.: Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution, *Mutat Res.*, 504, 17-36, (2002)

137. ROSSNER, P., BOFFETTA, P., CEPPI, M., BONASSI, S., SMERHOVSKY, Z., LANDA, K., JUZOVA, D., SRAM, R.J.: Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer, *Environ Health Perspect.*, 113, 517-20, (2005)
138. OLIVE, P.L.: DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology, *Int J Radiat Biol.*, 75, 395-405, (1999)
139. SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res.*, 175, 184-91, (1988)
140. FAUST, F., KASSIE, F., KNASMULLER, S., BOEDECKER, R.H., MANN, M., MERSCH-SUNDERMANN, V.: The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies, *Mutat Res.*, 566, 209-29, (2004)
141. COLLINS, A.R.: The comet assay. Principles, applications, and limitations, *Methods Mol Biol.*, 203, 163-77, (2002)
142. MOLLER, P.: The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures, *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 98, 336-45, (2006)
143. MOLLER, P.: Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA, *Mutat Res.*, 612, 84-104, (2006)
144. VIJAYA LAKSHMI, A.N., RAMANA, M.V., VIJAYASHREE, B., AHUJA, Y.R., SHARMA, G.: Detection of influenza virus induced DNA damage by Comet Assay, *Mutation Research*, 442, 53-58, (1999)
145. AU, W.W., OBERHEITMANN, B., HEO, M.Y., HOFFMANN, W., OH, H.Y., Biomarker Monitoring for Health Risk Based on Sensitivity to Environmental Mutagens, *Rev Environ Health*, 16, 41-64, (2001)
146. PERERA, F.P.: Molecular Epidemiology: On the Path to Prevention?, *J.Natl.Cancer Inst.*, 92, 602-612, (2000)
147. OBERHEITMANN, B., SCHAFFER, J., DALLY, H., GARMS, A., FRENTZEL-BEYME, R., HOFFMANN, W.: The Chromosome-Based Challenge Assay

Using Fluorescence in Situ Hybridization: A Possible Test for Increased Cancer Susceptibility, *Mutation Research*, 428, 157-164, (1999)

148. AU, W.W., WILKINSON, G.S., TYRING, S.K., LEGATOR, M.S., EI-ZEIN, R., HALLBERG, L., HEO, M.Y.: Monitoring Populations for DNA Repair Deficiency and for Cancer Susceptibility, *Environmental Health Perspectives*, 104, 579-584, (1996)
149. HE, J.L., CHEN, W.L., JIN, L.F., JIN, H.Y.: Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation, *Mutat Res.*, 223-31, (2000)
150. PORTIER, C.J., BELL, D.A.: Genetic Susceptibility: Significance in Risk Assessment, *Toxicology Letters*, 102-103, 185-189, (1998)
151. DİNÇ, B.: Kolposkopi uygulanan hastalarda Real-Time PCR ile Human Papillomavirus (HPV) tanısı, Uzmanlık tezi, Gazi Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara 2005
152. HAVERKOSL, H., ROHRER, M., PICKWORTH, W.: The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial, *Biomed & Pharmacother*, 54, 54-9, (2000)
153. BODAGHI, S., WOOD, L.V., ROBY, G., RYDER, C., STEINBERG, S.M., ZHENG, Z.M.: Could human papillomaviruses be spread through blood?, *J Clin Microbiol.*, 43, 5428-34, (2005)
154. PORNTANAKASEM W, SHOTELERSUK K, TERMRUNGRUANGLERT W, VORAVUD N, NIRUTHISARD S, MUTIRANGURA A.: Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer., *BMC Cancer.*, 1:2, (2001)
155. SATHISH, N., ABRAHAM, P., PEEDICAYIL, A., SRIDHARAN, G., JOHN, S., SHAJI, R.V., CHANDY, G.: HPV DNA in plasma of patients with cervical carcinoma., *J Clin Virol.*, 31, 204-9, (2004)
156. HO, C.M., YANG, S.S., CHIEN, T.Y., HUANG, S.H., JENG, C.J., CHANG, S.F.: Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in

the peripheral blood of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol.*, 99, 615-21, (2005)

157. WEI, Y.C., CHOU, Y.S., CHU, T.Y.: Detection and typing of minimal human papillomavirus DNA in plasma, *Int J Gynaecol Obstet.*, *in press*, (2007)
158. DUENSING, S., MUNGER, K.: Centrosomes, genomic instability and cervical carcinogenesis, *Critical Rev. in Eukaryotic Gene Exp.*, 13, 9-23, (2003)
159. HUDELIST, G., MANAVI, M., PISCHINGER, K.I., WATKINS-RIEDEL, T., SINGER, C.F., KUBISTA, E., CZERWENKA, K.F.: Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade., *Gynecol Oncol.*, 92, 873-80, (2004)
160. KALOF, A.N., COOPER, K.: p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia, *Adv Anat Pathol.*, 13, 190-4, (2006)
161. UDUMUDI, A., JAISWAL, M., RAJESWARI, N., DESAI, N., JAIN, S., BALAKRISHNA, N., RAO, K.V., AHUJA, Y.R.: Risk assessment in cervical dysplasia patients by single cell gel electrophoresis assay: a study of DNA damage and repair, *Mutat Res.*, 412,195-205, (1998)
162. ALLEN, D.G., WHITE, D.J., HUTCHINS, A.M., SCURRY, J.P., TABRIZI, S.N., GARLAND, S.M., ARMES, J.E.: Progressive genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in squamous cell cervical cancer, *Br J Cancer*, 83, 1659-63, (2000)
163. Yu Huang, F., Kwoka, Y.K.Y., Laub, E.T., Tangb, M.H.Y., Hextan, T.Y.N., Ngana, Y.S.: Genetic abnormalities and HPV status in cervical and vulvar squamous cell carcinomas, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 157, 42–48, (2005)
164. HOPMAN, A.H.N, SMEDTS, F., DIGNEF, W., UMMELEN, M., SONKE, G.,MRAVUNAC, M., VOOIJS, G.P., SPEEL, E.J.M, RAMAEKERS, F.C.S.:

Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities, *J Pathol*, 202, 23–33, (2004)

165. HARRIS, C.P., LU, X.Y., NARAYAN, G., SINGH, B., MURTY, V. V. V. S., RAO, P.H.: Comprehensive Molecular Cytogenetic Characterization of Cervical Cancer Cell Lines, *Genes, Chromosomes & Cancer*, 36, 233–241, (2003)
166. LEAL-GARZA, C.H., CERDA-FLORES, R.M., LEAL-ELIZONDO, E., CORTES-GUTIERREZ, E.I.: Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer, *Mutat Res.*, 515, 57-62, (2002)
167. CALINISAN, J.H., CHAN, S.R., KING, A., CHAN, P.J.: Human papillomavirus and blastocyst apoptosis, *J Assist Reprod Genet.*, 19, 132-6, (2002)
168. MAGNUSSON, P.K.E., SPAREN, P., GYLLENSTEN, U.B.: Genetic link to cervical tumours, *Nature*, 400, 29-30, (1999)
169. FEI, P., EL-DEIRY, W.S.: P53 and radiation responses, *Oncogene* 22, 5774–5783 (2003)
170. PATEL, K.R., ASTLEY, S., ADAMS, D.J., LACEY, C.J., ALI, S.W., WELLS, M.: Expression of cytochrome P450 enzymes in the cervix. An immunohistochemical study, *Int J Gynecol Cancer*, 3, 159 – 63, (1993)
171. FARIN, F.M., BIGLER, L.G., ODA, D., MCDUGALL, J.K., OMIECINSKI, C.J.: Expression of cytochrome P450 and microsomal epoxide hydrolase in cervical and oral epithelial cells immortalized by human papillomavirus type 16 E6/E7 genes. *Carcinogenesis*, 16, 1670– 4, (1995)
172. HOFFMANN, H., HOGEL, J., SPEIT, G.: The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta analysis, *Mutagenesis*, 15, 1-12, (2005)
173. SIMONS, A.M, PHILLIPS, D.H., COLEMAN, D.V.: Damage to DNA In cervical epithellum related to smoking tobacco, *BMJ*, 306, 1444-8, (1993)



174. MELIKIAN, A.A., SUN, P., PROKOPCZYK, B., EL-BAYOUMY, K., HOFFMANN, D., WANG, X., WAGGONER, S.: Identification of benzo[a]pyrene metabolites in cervical mucus and DNA adducts in cervical tissues in humans by gas chromatography-mass spectrometry, *Cancer Lett.*, 146, 127-34 (1999)
175. MCCANN, M.F., IRWIN, D.E., WALTON, L.A., HULKA, B.S., MORTON, J.L., AXELRAD, C.M.: Nicotine and cotinine in the cervical mucus of smokers, passive smokers, and nonsmokers, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 1, 125-9, (1992) (abs)
176. PROKOPCZYK, B., COX, J.E., HOFFMANN, D., WAGGONER, S.E.: Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers, *J Natl Cancer Inst.*, 89, 868-73 (1997)

**ÖZGEÇMİŞ**  
**Eren (Civelek) Özçağlı**

**Adres** : Gazi Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi  
F.Toksikoloji Anabilim Dalı  
06330 Etiler-ANKARA

**Telefon** : +90 532 553 8043

**Email** : eren@gazi.edu.tr

**Doğum yeri ve tarihi** : İstanbul - 18 Haziran 1976

**EĞİTİM:**

**1994-1998** Lisans; Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi  
**1998-** Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji  
Anabilim Dalında araştırma görevlisi,  
**2000 (Eylül-Kasım)** Davetli araştırmacı, Center for Environmental  
Research and Technology-Epidemiology Dept.,  
Bremen University, Germany  
**1998-2001** Yüksek lisans; Gazi Üniversitesi, Eczacılık  
Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı  
Araştırma konusu; " Kurşuna maruz akü fabrikası  
işçilerinde genotoksik hasarın challenge tekniği ile  
araştırılması "

**2001-** Doktora; Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,  
Toksikoloji Anabilim Dalı

**ULUSLARARASI YAYINLAR**

1. Karahalil, B., Sardas, S., Kocabas, N.A., Alhayiroglu, E., Karakaya, A.E, **Civelek, E.**: Chromosomal aberrations under basal conditions and after treatment with X-ray in human lymphocytes as related to the GSTM1 genotype, Mutation Research 2002 Mar 25;515(1-2):135-40.
2. Biri, A., **Civelek, E.**, Karahalil, B., Şardaş, S.: Assessment of DNA damage in women using oral contraceptives, Mutation Research 2002 Nov 26;521(1-2):113-9.
3. Cok, I., Sardas, S., Kadioglu, E., **Ozcagli, E.**: Assessment of DNA damage in glue sniffers by use of the alkaline comet assay. Mutat Res. 2004 Feb 14;557(2):131-6
4. Karakaya, A.E., **Ozcagli, E.**, Ertas, N., Sardas, S.: Assessment of abnormal DNA repair responses and genotoxic effects in lead exposed workers. Am J Ind Med. 2005 Apr;47(4): 358-63.

5. **Ozcagli,E.**, Biri,A., Şardaş,S.: Determination of DNA Damage by Comet Assay in the Women under Hormone Replacement Therapy, *Maturitas*. 2005 Jul 16;51(3):280-5.
6. Sardas, S., Izdes, S., **Ozcagli, E.**, Kanbak, O., Kadioglu, E.: The role of antioxidant supplementation in occupational exposure to waste anaesthetic gases. *Int Arch Occup Environ Health*. 2006 Nov;80(2):154-9.
7. Atesagaoglu, A., Omurlu, H., **Ozcagli, E.**, Sardas, S., Ertas, N.: Mercury exposure in dental practice, *Oper Dent*. 2006 Nov-Dec;31(6):666-9.

#### **ULUSLARARASI KONGRELERDE SUNULMUŞ BİLDİRİLER**

1. **Civelek,E.**, Sardas,S., Cuhruk,H., Karakaya,AE.: The Use of Challenge Assay in Determining DNA Repair Capacity of Operating Room Personnel Exposed to Anaesthetic Gases by Single Cell Gel Electrophoresis Technique. 6<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical Sciences ISOPS-6, Ankara-Turkey, June 27-29, 2000
2. Cok,I., **Civelek,E.**, Arıkan,G., Sardas,S.: Assessment of Possible DNA Damage in Glue Sniffers by Single Cell Gel Electrophoresis Technique. 6<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical Sciences ISOPS-6, Ankara-Turkey, June 27-29, 2000.
3. **Civelek,E.**, Sardas,S., Cuhruk,H., Karakaya,AE.: Assessment of DNA Repair Capacity of Operating Room Personnel Exposed to Anaesthetic Gases by Comet Assay. Biomarkers of genetic and acquired susceptibility, Bremen-Germany, August 31-September 1, 2000.
4. Cok,I., **Civelek,E.**, Arıkan,G., Sardas,S.: Determination of Genotoxic Damage by Alkaline Comet Assay in Glue Sniffers. EUROTOX-2000, London-England, September 17-20, 2000.
5. **Civelek,E.**, Karakaya,AE, Ertas,N, Ilgit,E, Sardas,S.: Assessment of Genotoxic Damage in Lead Exposed Battery Manufacturers by Challenge Assay. EUROTOX-2001, İstanbul-Turkey, September 13-16, 2001.
6. Karahalil,B., Kocabas,N.A., **Civelek,E.**, Karakaya,A.E., Sardas,S.: The Evaluation of Relation to GSTM1 Genetic Polymorphism and Chromosomal Aberrations and Challenge Assay. EUROTOX-2001, İstanbul-Turkey, September 13-16, 2001.
7. Alhayiroglu E., **Civelek E.**, Izdes S., Sardas S.: Assessment of DNA Damage in Nurses Occupationally Exposed to Anesthetic Gases And Protective Role of Antioxidant Supplementation. 7<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical Sciences. Ankara-Turkey, June 24-27, 2003.

8. **Civelek E.**, Sardas S., Karahalil B., Biri, A.: Assessment of DNA damage in women using oral contraceptives. 5<sup>th</sup> International Congress of Turkish Society of Toxicology. Antalya-Turkey, October 30- November 2, 2003.
9. **Civelek E.**, Sardas S., Kocabas N.A., Karahalil B., Alhayiroglu E., Karakaya A.E.: Chromosomal Aberrations Under Basal Conditions and After Treatment with X-ray in Human Lymphocytes as Related to the GSTM1 Genotype. 5<sup>th</sup> International Congress of Turkish Society of Toxicology. Antalya-Turkey, October 30- November 2, 2003.
10. Izdes S., Sardas S., Alhayiroglu E., Kaymak Ç., **Civelek E.**: Assessment of Genotoxic Damage by Alkaline Comet Assay in Nurses Occupationally Exposed to Anaesthetic Gases or Antineoplastic Drugs. 5<sup>th</sup> International Congress of Turkish Society of Toxicology. Antalya-Turkey, October 30- November 2, 2003.
11. Kadioglu, E., **Ozcagli, E.**, Cok, I., Sardas, S.: Assessment of DNA Damage in Glue Sniffers by use of the Alkaline Comet Assay. 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, EEMS 2005. Kos Island-Greece, July 3-7, 2005.
12. **Ozcagli, E.**, Kadiglu, E., Izdes S., Kaymak, C., Sardas, S.: Assessment of Genotoxic Damage by Alkaline Comet Assay in Nurses Occupationally Exposed to Anaesthetic Gases or Antineoplastic Drugs. 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, EEMS 2005. Kos Island-Greece, July 3-7, 2005.
13. Sardas, S., **Ozcagli, E.**, Biri, A.: Assessment of DNA damage in postmenopausal women under hormone replacement therapy. 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, EEMS 2005. Kos Island-Greece, July 3-7, 2005.
14. Kocabas Aygun, N., **Ozcagli, E.**, Cakmak, G.D., Coskun, E., Kadioglu, E., Durmaz, E., Karahalil, B., Burgaz, S., Sardas, S.: Effects of Glutathione S-transferase (GST) polymorphisms on chromosomal aberrations and micronucleus frequencies in a Turkish population. 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, EEMS 2005. Kos Island-Greece, July 3-7, 2005.
15. **Ozcagli, E.**, Sardas, S., Biri, A.: Assessment of DNA damage in postmenopausal women under hormone replacement therapy. 42<sup>nd</sup> Congress of European Societies of Toxicology EUROTOX-2005, Cracow-Poland, September 11-14, 2005.
16. **Ozcagli E.**, Biri A., Bozdayi G., Baltaci V., Sardas S.: Detection of Human Papillomavirus Type 16 and 18 induced DNA damage. HPV and Cancer Conference, Berlin-Germany, September 29- October 1, 2005.
17. **Ozcagli E.**, Biri A., Bozdayi G., Baltaci V., Sardas S.: Detection of Human Papillomavirus Type 16 and 18 induced DNA damage. HPV

and Cancer Conference, Berlin-Germany, September 29- October 1, 2005.

18. **Ozcagli E.**, Sardas S., Izdes S., Kanbak O., Kadioglu E.: The role of antioxidant supplementation in occupational exposure to waste anaesthetic gases, 8<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-8), Ankara-Turkey, June 13-16, 2006.
19. Cimen, B., Kararli, S., **Ozcagli, E.**, Yurdun, T., Sardas, S.: Effects of using different kinds of smokeless tobacco on DNA damage; "Maras Powder", 6<sup>th</sup> International Congress of Turkish Society of Toxicology. Antalya-Turkey, November 2-5, 2006.
20. **Ozcagli, E.**, Sardas, S., Biri, A., Ciftci, B., Korucuoglu, U., GURSOY, R.: Determination of DNA damage in women using Raloxifene, 6<sup>th</sup> International Congress of Turkish Society of Toxicology. Antalya-Turkey, November 2-5, 2006.
21. Kaymak, C., Kadioglu, E., **Ozcagli, E.**, Osmanoglu, G., Izdes, S., Agalar, C., Basar, H., Sardas, S.: Oxidative DNA damage and total antioxidant status evaluation in gram-negative sepsis rat model, 6<sup>th</sup> International Congress of Turkish Society of Toxicology. Antalya-Turkey, November 2-5, 2006.

#### ULUSAL KONGRELERDE SUNULMUŞ BİLDİRİLER

Atesagaoglu, A., Omurlu, H., Ertas, N., Sardas, S., **Civelek, E.**: The relationship between DNA damage and blood mercury levels of students and dentists at a dental school in Gazi University Turkey. 7. Kardiyoloji Sempozyumu ve 8. Konservatif Diş tedavisi Bilim Dalları Toplantısı, İzmir, Turkey, May 1-4, 2003

#### KATILDIĞIM EĞİTİM KURSLARI

1. "Principles of Risk Assessment" EUROTOX Education Course, Varna-Bulgaria, (1999)
2. "Proteom Analizleri ve Uygulama Alanları" A.Ü.Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara (Haziran 2005)
3. "İleri Işık Mikroskopi Kursu" A.Ü.Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara (6-7 Mayıs 2006)
4. "Genom Bilimi Kursu" A.Ü.Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara (10-11 Mayıs 2006)