

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÜST SOLUNUM YOLLARI MALİGN  
LEZYONLARINDA  
HPV TİP 16, 18, 31 VE 33'ÜN ARAŞTIRILMASI**

**DR. EBRU KORKMAZ**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. ADNAN SEYREK**

**(Bu çalışma, 1242 Nolu Proje ile FÜBAP tarafından desteklenmiştir)**

**ELAZIĞ- 2007**

## DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr.....

### DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

.....

..... **Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafınızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

.....

**Danışman**

**Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri**

.....

.....

.....

.....

.....

## TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgileriyle bana yol gsteren Anabilim Dalı BaŐkanımız Prof. Dr. Zülal AŐçı TORAMAN'a, öğretim üyelerimiz Prof. Dr. Mustafa YILMAZ, Doç. Dr. Ahmet KIZIRGİL'e, ayrıca bu tezin oluşturulmasındaki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Yasemin BULUT ve tez danışmanım Prof. Dr. Adnan SEYREK'e, örnek toplama ve arşiv taraması konusunda desteklerini esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İbrahim ÖZERCAN'a ve tüm Anabilim Dalı personeline teşekkürü bir borç bilirim.

Aynı ortamda çalışma fırsatı bulduğum tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı personeline teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim ve öğretim hayatım süresince bana her zaman destek olan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi ve minnettarlığımı sunarım.

# İÇİNDEKİLER

## SAYFA NO

<b>1. ÖZET</b> .....	1
<b>2. ABSTRACT</b> .....	2
<b>3. GİRİŞ</b> .....	3
<b>3.1. Human papillomavirusun genel özellikleri</b> .....	5
<b>3.1.1. Sınıflandırma</b> .....	5
<b>3.1.2. İsimlendirme</b> .....	10
<b>3.2. Yapı</b> .....	10
<b>3.3. Patogenez</b> .....	14
<b>3.4. İmmünite</b> .....	17
<b>3.5. Replikasyon</b> .....	18
<b>3.6. Oluşturdukları hastalıklar ve klinik belirtiler</b> .....	20
<b>3.6.1. Deri infeksiyonları</b> .....	21
<b>3.6.2. Mukozal infeksiyonlar</b> .....	21
<b>3.6.3. Servikal displazi ve neoplazi</b> .....	22
<b>3.7. HPV infeksiyonlarının tanısı</b> .....	24
<b>3.7.1. Hibridizasyon testleri</b> .....	24
<b>3.7.2. Hibrid yakalama testi</b> .....	26
<b>3.7.3. Polimeraz zincir reaksiyonu</b> .....	26
<b>3.8. Epidemiyoloji</b> .....	28
<b>3.9. HPV infeksiyonlarında tedavi ve korunma</b> .....	29
<b>3.10. HPV aşılıarı</b> .....	31

<b>3.10.1. Profilaktik aşılar</b> .....	31
<b>3.10.2. Terapötik aşılar</b> .....	33
<b>4. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	34
<b>4.1. Hastaların seçimi</b> .....	34
<b>4.2. Örneklerin toplanması ve analize hazırlanması</b> .....	34
<b>4.3. Kimyasal maddeler, sarf malzemeleri ve cihazlar</b> .....	34
<b>4.4. Parafin blok kesitlerinden DNA izolasyonu</b> .....	35
<b>4.5. Oligonükleotidler (primerler)</b> .....	37
<b>4.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)</b> .....	38
<b>4.6.1. Beta- globin spesifik PZR</b> .....	38
<b>4.6.2. HPV spesifik PZR</b> .....	39
<b>4.6.3. HPV tiplendirme spesifik PZR</b> .....	41
<b>4.7. PZR optimizasyonu</b> .....	41
<b>4.8. Agaroz jel elektroforezi</b> .....	41
<b>5. BULGULAR</b> .....	43
<b>6. TARTIŞMA</b> .....	47
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	56
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	72

## TABLolar LİSTESİ

	<u>SAYFA NO</u>
<b>TABLO 1.</b> Human papillomavirusun sınıflandırılması.....	7
<b>TABLO 2.</b> Anogenital HPV tiplerinin onkojenik risk sınıflandırılması .....	10
<b>TABLO 3.</b> HPV’de saptanan genler ve fonksiyonları.....	16
<b>TABLO 4.</b> HPV tanı yöntemlerinin karşılaştırılması.....	27
<b>TABLO 5.</b> Çalışmada kullanılan HPV primerleri.....	37
<b>TABLO 6.</b> HPV PZR pozitiflik oranları .....	46

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### SAYFA NO

<b>ŞEKİL 1.</b> HPV partikülü .....	11
<b>ŞEKİL 2.</b> HPV'nin elektron mikroskopik resmi .....	11
<b>ŞEKİL 3.</b> HPV'nin şematize edilmiş hali .....	12
<b>ŞEKİL 4.</b> HPV genomu (sirküler) .....	13
<b>ŞEKİL 5.</b> HPV genomu (lineer).....	13
<b>ŞEKİL 6.</b> HPV'nin replikasyonu .....	20
<b>ŞEKİL 7.</b> HPV- kanser ilişkisi .....	23
<b>ŞEKİL 8.</b> Çalışmada kullanılan primerlerin HPV genomundaki yerleri .....	38
<b>ŞEKİL 9.</b> $\beta$ - globin pozitif PZR ürünleri (268 bç).....	43
<b>ŞEKİL 10.</b> MYO9/MY11-GP5+/GP6+ pozitif PZR ürünleri (143 bç).....	44
<b>ŞEKİL 11.</b> HPV 16 pozitif PZR ürünleri (225 bç).....	45
<b>ŞEKİL 12.</b> HPV 18 pozitif PZR ürünleri (143 bç) .....	45

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>HPV</b>	: Human papillomavirus
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PCR</b>	: Polymerase chain reaction.
<b>SIL</b>	: Squamous intraepithelial lesion
<b>CIN</b>	: Cervical intraepithelial neoplasia
<b>VLP</b>	: Virus like particle
<b>SCC</b>	: Squamous cell carcinoma
<b>HSIL</b>	: High- grade squamous intraepithelial lesion
<b>LSIL</b>	: Low- grade squamous intraepithelial lesion
<b>ORF</b>	: Open reading frame
<b>LCR</b>	: Long control region
<b>ISH</b>	: In situ hibridizasyon
<b>SBH</b>	: Southern blot hibridizasyon
<b>DBH</b>	: Dot blot hibridizasyon
<b>FISH</b>	: Floresan in situ hibridizasyon
<b>rRNA</b>	: Ribozomal RNA
<b>bç</b>	: Baz çifti
<b>kbç</b>	: Kilo baz çifti
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	: Distile su
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>mM</b>	: Milimol



## ÖZET

Bu çalışmanın amacı, üst solunum yolları malign lezyonlarında Human papillomavirus (HPV) görülme sıklığını ve tiplerini belirleyerek, HPV'nin bu kanserlerin gelişmesindeki rolünün açıklanmasına katkıda bulunmaktır.

Human papillomavirus varlığının araştırılması için, üst solunum yolları kanseri tanısı konulmuş olan 100 hasta ile kontrol grubu olarak üst solunum yolları benign lezyonu tanısı konulmuş olan 25 hastaya ait arşivlenmiş parafinize doku örneği Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemiyle analiz edilmiştir. HPV tip 16, 18, 31 ve 33'ün saptanması ve tiplendirilmesi amacıyla, L1 ve E6 primerleri ve tipe özgül primerler kullanılarak nested PCR yapılmıştır.

Örneklerden 25 tanesi yeterli DNA içermediği için çalışmadan çıkarılmıştır. Yetmişbeş üst solunum yolu kanseri örneğinin 25 tanesi (%33) HPV DNA yönünden pozitif olarak bulunmuş; HPV pozitif örneklerin 11 tanesinde (% 44) HPV 16 DNA, 8 tanesinde ise (% 32) HPV 18 DNA pozitif bulunmuştur. Bir olguda HPV 16 ve HPV 18 birlikteliği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, HPV'nin, üst solunum yolları malign lezyonlarının birçoğunda etiyolojik bir rol oynadığı düşünülmektedir. Çalışmamızda elde edilen bulgular, HPV tip 16 ve 18'in üst solunum yolları malign lezyonlarındaki olası rolünü desteklemektedir. Türkiye'deki HPV infeksiyonlarının epidemiyolojisinin daha iyi aydınlatılabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Human Papillomavirus (HPV), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Üst Solunum Yolları Malign Lezyonları

## **ABSTRACT**

### **Investigation of HPV Type 16, 18, 31 and 33 in Malign Lesions of Upper Respiratory Tract**

The aim of this study was to determine the prevalence and type of human papillomavirus (HPV), and to explain its role in malign lesions of the upper respiratory tract.

Archived paraffin block specimens taken from 100 cases of upper respiratory tract carcinomas were analysed for the presence of human papillomavirus infection, using Polymerase Chain Reaction technique. A nested PCR assay was designed for the detection and typing of HPV genotypes 16, 18, 31 and 33 using L1 and E6 consensus primers and HPV type- specific primers.

Twenty five samples which were found to have inadequate DNA were excluded from the study. HPV DNA was detected in 25 (33%) of the 75 malign lesions of upper respiratory tract. Of the 25 HPV DNA positive samples, HPV 16 DNA was detected in 11 (44 %), and HPV 18 DNA was detected in 8 (32 %). HPV genotyping revealed double HPV infection in one case.

In conclusion, HPV appears to play an etiological role in many malign lesions of upper respiratory tract. The results of our study is consistent with a causative role of HPV 16 and 18 in the pathogenesis of malign lesions of upper respiratory tract. More detailed studies are necessary for elucidating the epidemiology of HPV infections in Turkey.

**Key Words:** Human papillomavirus (HPV), Polymerase Chain Reaction (PCR), Malign Lesions of Upper Respiratory Tract

### 3. GİRİŞ

Human papillomavirus (HPV), deri ve müköz membranların benign ve malign lezyonlarında saptanan, 120'den fazla farklı genotipi olan bir gruptan ibarettir. Papillomaviruslar, farklı anatomik bölgelere eğilim göstermeleri ve oluşturdukları lezyon tipleri açısından subtiplere ayrılırlar. Servikal kanserlerde yapılan çalışmalar baz alınarak; HPV tipleri; yüksek riskli (16, 18, 45, 56, 58), orta riskli (31, 33, 35, 39, 51, 52, 59, 67, 68, 70) ve düşük riskli (6, 11, 42, 43, 44, 53, 61, 72, 74, 81, 83, 84) olarak gruplandırılmışlardır (1- 3).

Human papillomavirus spektrumunun çeşitliliği ve yüksek insidansı, HPV tiplerinin belirlenmesinde güvenilir metotların kullanıma sokulmasını gerekli kılmıştır. Human papillomavirus genotiplerinin ortaya konulması sadece epidemiyolojik açıdan değil, hastalığın seyrinin takip edilebilmesi açısından da gereklidir (4).

Oral kavite ve orofarinks kanserleri dünyadaki önemli toplum sağlığı problemlerinden biridir. Etiyolojik faktörlerin başında % 90'lık bir oranla tütün ve alkol kullanımı yer almaktayken, beslenme yetersizlikleri ve kötü ağız hijyeni de risk faktörleri arasındadır. Human papillomavirus, tüm servikal kanserlerde etiyolojik ajan olarak gösterilmiştir. Tümörlerdeki viral aktiviteye ilişkin daha önce yapılmış çalışmalar HPV'nin aynı zamanda oral kavite ve orofarinks kanserlerinde de rol oynadığını göstermiştir. Baş ve boyunda gözlenen kanserler içerisinde, orofarinks ve oral kavite kanserlerinde HPV daha sık saptanmıştır. Saptanan subtipler arasında da HPV 16 baskın tip olarak gösterilmiştir (4).

Oral kavite, genital bölgedekine benzer olarak, sıklıkla bakteriyel flora içeren bir epitel tabakası ile çevrilidir. Bu mikroorganizmalardan bazıları potansiyel olarak karsinojenik olabilir. Human papillomavirusun genital bölgede uterus serviksinde kanser

gelişiminde suçlu olduğu düşünülürse, bu ilişkinin oral epitelyal kanser gelişiminde de mümkün olabileceği görülebilir. Bu yüzden, bu virusun oral kavitedeki sıklığını ve dolayısıyla bölgedeki malign neoplazmalarla ilişkisini bilmek önemli hale gelmiştir (5).

Baş ve boynun skuamöz hücreli karsinomları, her yıl yaklaşık 500.000 yeni olgu oranı ile, dünyada görülen en yaygın 8. malignitedir. Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapideki önemli gelişmelere rağmen prognozda belirgin düzelme izlenmemektedir. Tütün ve alkol kullanımı gibi risk faktörlerinin yanında, yüksek riskli HPV infeksiyonlarının da lokalizasyona bağlı olarak baş ve boyun kanserlerinde % 20-50 oranında tespit edildiği görülmüştür (6).

Human papillomavirus infeksiyonunun baş ve boyun kanserlerinde prognostik bir faktör olarak kullanılıp kullanılmayacağı konusu hala tartışmalıdır. Son zamanlarda tedavinin yönlendirilmesinde sadece klinik evreler yol göstericidir. Yapılmış olan çalışmalar, HPV pozitifliği ile klinik hastalık sıklığının bağlantılı olduğunu, HPV varlığının prognoz açısından ek olarak kullanılabilir bir marker olabileceğine işaret etmektedir (6).

Ülkemizde yapılan laboratuvar çalışmaları bu virus infeksiyonunun yaygın olduğunu göstermektedir. Ülkemizde bu virusun genotiplendirilmesine yönelik sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Günümüzde yüksek riskli belirli HPV tiplerine karşı koruma sağlayabilen aşuların geliştirilmesi ve birçok ülkede kullanım lisansı almış olmaları, bölgesel tip dağılımı verilerinin önemini arttırmıştır. Bu çalışmada infekte hastalardaki parametreler virus genotiplerine göre kategorize edilmek suretiyle, genotip-patogenez ilişkisi hakkında bilimsel katkı sağlanacaktır. Ayrıca çalışmamız, HPV'nin bölgemizdeki epidemiyolojik profilini belirleyerek alınması gereken öneriler noktasında bilgi birikimini arttıracaktır.

### **3.1. HUMAN PAPİLLOMAVİRUSUN GENEL ÖZELLİKLERİ**

Human papillomavirus, epitelyotropik bir virus olup deri ve mukozalarda papillomatöz, hiperplastik ve verrüköz lezyonlara neden olur. Virusun yol açtığı lezyonlar genellikle lokalize olup kendiliğinden iyileşir veya latent infeksiyonlar oluşur. Ancak belli HPV tipleri displazi ve kanser gelişiminde kofaktör olarak rol oynar (7). Papillomavirus, özellikle serviks, anogenital bölge, deri, üst solunum ve sindirim yolları kanserlerinde etiyolojik ajan olarak saptanmış onkojenik bir DNA virusudur (5, 8).

Papillomavirus yüksek oranda konağa özgü bir virus olup hücre kültürlerinde üretilemez ve birkaç tipi dışında hepsi sadece epitelyal hücreleri infekte edebilir (9). Geliştirilmiş laboratuvar tanı yöntemleri ve özellikle moleküler biyolojik tanı yöntemleri ile yapılmış olan çalışmalar sonucu, 120'den fazla HPV genotipi saptanmış, ancak bunların yaklaşık 80 kadarı tam olarak genotiplendirilmiştir. Genotiplendirilen HPV'lerin 35'inin anogenital verrüler ve servikal intraepitelyal neoplaziler ile ilişkili olduğu saptanmıştır (10). Papillomavirusun bilinen tek konağı insandır ve türler arası HPV bulaşması bildirilmemiştir. Virus, deri ve mukozadaki mikrotravmalar yoluyla skuamöz epitelyumun bazal hücrelerine ulaşarak bu hücreleri infekte eder (11).

#### **3.1.1. SINIFLANDIRMA**

Papillomaviruslar, polyomaviruslar ve simian vacuolating viruslar 1950'lerin ortalarından 1960'lara kadarki süre içinde yapılan elektron mikroskopisi ve temel nükleik asit özelliklerine göre çift zincirli sirküler DNA'ları ve zarfsız ikosahedral partiküller olmaları nedeniyle aynı familya içinde değerlendirilmiş ve bu aileye ilk iki harflerinin birleşiminden oluşan Papovaviridae adı verilmiştir. 1980'lerde yapılan çalışmalar, bu ilişkinin çok yüzeysel olduğunu, bu virusların fiziksel ve kimyasal ortak özellikleri paylaşmasına karşın, temel biyolojik ve genomik organizasyonlarındaki

önemli farklılıklarından dolayı ayrı bir aile olarak sınıflandırılmaları gerektiğini göstermiştir. Polyomavirusların genomlarının yaklaşık 5 kilobaz çifti (kbç) büyüklüğünde olmasına karşın papillomavirusların genomu yaklaşık 8 kbç'dir. Polyomavirusların 2 transkripsiyon ünitesi varken papillomavirusların sadece bir ünitesi vardır. Ayrıca polyomaviruslar ve papillomaviruslar nükleik asit ve aminoasit dizilerinde benzer özellikler taşımamaktadırlar (12). Bu özelliklerinden dolayı bu virusların iki farklı aile oldukları sonucuna varılmış ve papillomavirus ailesi (*Papillomaviridae*) Uluslararası Virus Taksonomi Konseyi (International Council on Taxonomy of Viruses-ICTV) tarafından resmen onaylanmıştır (13, 14).

Papillomaviruslar, doğada yaygın ve esas olarak gelişmiş vertebralı canlılarda bulunurlar. Günümüz itibarıyla papillomaviruslar için, orijin aldıkları türe, aynı tür içindeki genetik ilişki derecesine, doku tropizmine ve neden oldukları lezyon tiplerine göre önerilen farklı sınıflandırma şekilleri vardır (15).

Yüksek derecede tür ve doku tropizm özelliği gösteren ve farklı mukozal ve dermal bölgelere eğilimi olan human papillomaviruslar, bu özelliklerine dayanılarak 4 grupta toplanmıştır:

- 1- Mukokutanöz grup (deri ve oral epiteli infekte eden gruptur).
- 2- Hücresel immün sistemin nadir görülen bir genetik bozukluğu olarak kabul edilen ve güneş ışınlarıyla temas halinde invaziv skuamöz hücreli karsinoma dönüşebilen, HPV ile birliktelik gösteren deri lezyonları ile karakterize epidermodysplasia verruciformis hastalarından izole edilen HPV tiplerinin oluşturduğu grup.
- 3- Anogenital grup (40'dan fazla HPV tipinin yer aldığı gruptur).
- 4- Ungula ile ilişkili olan grup (15).

Yaygın HPV tipleri ve oluşturdukları hastalıklar Tablo I’de gösterilmiştir (16).

**Tablo 1.** Human papillomavirusun sınıflandırılması (16).

HPV tipi	Lezyon
<u>Mukokutanöz grup</u>	
1	Verruca plantaris
2, 4	Verruca vulgaris, verruca plantaris
3, 10, 28	Verruca plana
7	Butcher’s warts (kasap siğili)
13, 32	Fokal epitelyal hiperplazi (oral)
26, 27	Verruca vulgaris (immüsupresyon)
29, 38	Verruca vulgaris
36	Aktinik keratoz
37	Keratoakantoma
41	Squamous cell carcinoma (SCC)
<u>Epidermodysplasia verruciformis</u>	
5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 36, 47, 49	Macular warts
<u>Genital lezyonlar</u>	
6, 11	Condyloma accuminata, respiratuar papilloma
16, 31, 33, 34, 35	Servikal intraepitelyal lezyon (SIL), SCC
18	SIL, SCC, adenokarsinom
39, 45, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 72	SIL, nadiren SCC
40, 51, 52, 53, 54, 70	SIL
42	Penil lezyon, LSIL (low grade SIL)
43, 44	LSIL, genellikle HSIL (high grade SIL)
74, 81, 83, 84	LSIL
82	LSIL, HSIL, SCC

Papillomavirusların ikinci sınıflandırılma şekli, güncel olarak kullanılmakta olan en son sınıflandırma şekli olup, HPV'nin L1 proteinindeki DNA sekans bölgeleri baz alınarak yapılan filogenetik sınıflandırmadır (13, 14):

**1- Süpergrup A:** Genital yolla bulaşan mukozal HPV tipleri süpergrup A (Alfa papillomaviruslar) içerisinde yer alır. Bu grupta bulunan HPV tip 6 ve 11 gibi viruslar, özellikle cinsel yolla bulaşan patojenler olup cinsel yönden aktif popülasyonu etkilemektedir. Bu viruslar, benign papillomlarla ilişkili lezyonlardır ve genital bölge dışında oral bölgede de enfeksiyona neden olabilmektedir. Bunun tersine süpergrup A içindeki HPV tip 16 ve 18 gibi yüksek onkojenik riskli HPV tipleri bazı bireylerde ileri derece neoplazi ve kansere ilerleyebilen mukozal lezyonlara neden olabilmektedir. Bununla birlikte süpergrup A içinde, HPV tip 2 ve HPV tip 10 gibi primer olarak kutanöz bölgelere tropizm gösteren viruslar da vardır. HPV tip 2 ve yakın ilişkideki süpergrup A papillomaviruslar primer olarak siğillerin en sık nedenidir.

**2- Süpergrup B:** Papillomavirusların ikinci ana grubu süpergrup B (Beta papillomaviruslar) içinde yer alır. Human papillomavirus tip 5 gibi subgrup B1 içinde yer alan viruslar genel olarak asemptomatik ve latent enfeksiyonlara neden olurken immün suprese ve bağışıklık sisteminde bozukluk olan kişilerde problemlere neden olabilirler. Bu tür hastalarda HPV enfeksiyonu bölgesinde cilt kanserleri gelişebilir. Bu durum, melanom dışı deri kanserlerinin gelişiminde subgrup B1 viruslarının rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Subgrup B2 (Gama papillomaviruslar) içinde yer alan HPV tip 4 gibi viruslar, genel popülasyonda HPV tip 2 gibi süpergrup A papillomaviruslardakine benzer şekilde kutanöz siğillere neden olmaktadır.

**3- Süpergrup E:** Diğer HPV'ler süpergrup E (Mü ve Nü papillomaviruslar) içerisinde yer alırlar. Bu grup içerisinde bilinen sadece üç tane insan virusu vardır ve



bunların tümü genel populasyonda kutanöz papillomalara neden olurlar. Bunlar arasında üzerinde en çok çalışılan tip HPV tip 1'dir ve HPV tip 2 gibi kutanöz siğillere neden olmaktadır (13, 14).

Üçüncü sınıflandırma ise spesifik HPV tiplerinin sıklıkla birliktelik gösterdikleri lezyonlar baz alınarak, yaygın anogenital HPV tipleri arasında yapılmış ve onkojenik potansiyellerine göre HPV tipleri 3 gruba ayrılmıştır (15, 16):

**1- Düşük riskli grup:** Bu gruptaki viruslar, genellikle anogenital sistemde condyloma accuminata, düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (low grade squamous intraepithelial lesion; LSIL), nadiren yüksek dereceli SIL (high grade squamous intraepithelial lesion; HSIL) ile birliktelik göstermelerine karşın, invaziv skuamöz hücreli karsinomlarda hemen hemen hiç tespit edilememiştir. Human papillomavirus tip 6, 11, 42, 43, 44, 53 bu gruptadır. HPV tip 6 ve 11 anogenital siğillerin % 90'ında saptanmıştır.

**2- Yüksek riskli grup:** Bu gruptaki viruslar, anogenital sistemde en sık olarak servikal invaziv skuamöz hücreli karsinomdan izole edilmişlerdir. Human papillomavirus tip 16, 18, 45, 56 ve 58 bu grupta yer almaktadır. Human papillomavirus tip 16 sıklıkla servikal skuamöz hücreli karsinomla birliktelik gösterirken, HPV 18 daha çok servikal adenokarsinomlarla ilişkili bulunmuştur.

**3- Intermediate (orta) riskli grup:** Bu gruptaki viruslar ise yüksek riskli gruba nazaran invaziv servikal kanserlerde daha az tespit edilmiş olan virus tipleridir. Human papillomavirus tip 31, 33, 35, 39, 51, 52, 59 ve 68 intermediate grupta yer almalarına rağmen, prototipik yüksek riskli viruslardakilerle benzer lezyonlarla birliktelik göstermeleri yüzünden yüksek riskli HPV tipleri olarak düşünülmektedir (15, 16).

Onkojenik potansiyellerine göre HPV tipleri Tablo 2'de gösterilmiştir (16).

**Tablo 2.** Anogenital HPV tiplerinin onkojenik risk sınıflandırılması (16).

Risk	HPV tipi
Düşük onkojenik risk	6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 61, 72, 74, 81, 83, 84
Yüksek onkojenik risk	16, 18, 45, 56, 58
Orta onkojenik risk	31, 33, 35, 39, 51, 52, 59, 67, 68, 70

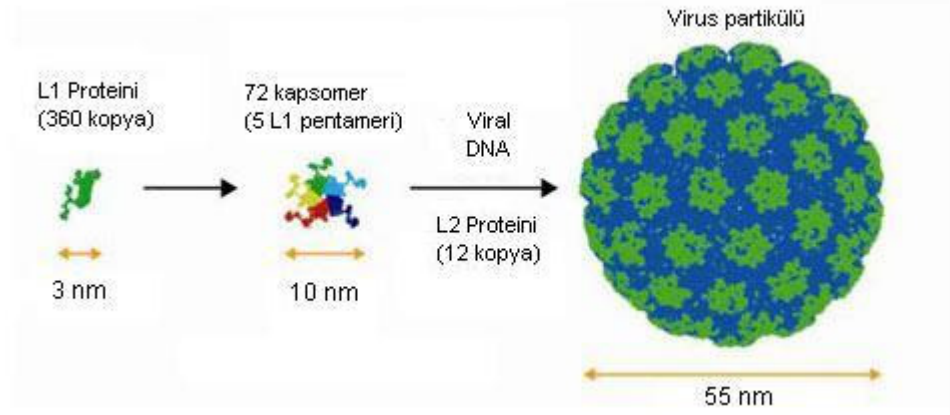
### 3.1.2. İSİMLENDİRME

Günümüzde papillomaviruslar için yeni bulunan izolatları onaylama, Papillomavirus Referans Merkezi (Heidelberg/Almanya) tarafından yapılmaktadır. İsimlendirme için kriter, izolatların L1 geninde % 10 üzerinde nükleotid dizi farklılığı olmasıdır. Dizi farklılığı % 2- 10 ise bu tipler “subtip-alttip” olarak tanımlanmaktadır. Eğer farklılık % 2’den daha az ise “varyant” olarak nitelendirilir (1, 12). Ayrıca tür içinde farklı bir HPV tipi olarak tanımlanabilmesi için, bir HPV izolatının diğer bilinen tiplerden % 50’nin altında bir DNA homolojisi göstermesi gerekmektedir (15).

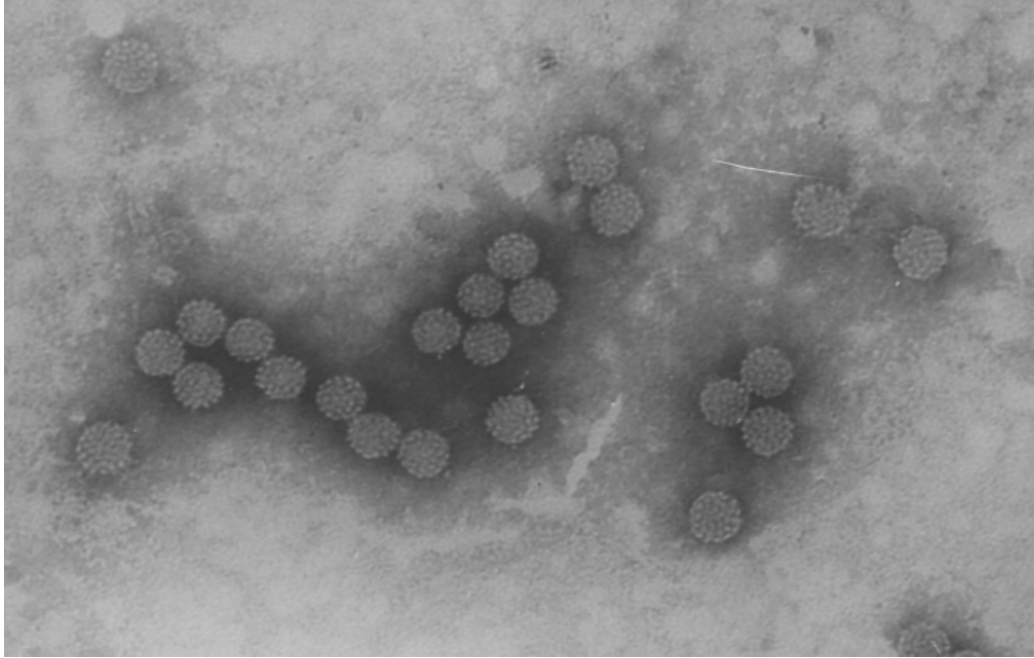
### 3.2. YAPI

Human papillomavirus, *Papillomaviridae* familyasında bulunan 50-55 nanometre büyüklüğünde ikosahedral kapsidi ve çift iplikli sirküler DNA’sı olan zarfsız bir virustur. Major kapsid proteini olan L1 moleküllerinin birleşmesiyle kapsomerler, kapsomerlerin birleşmesiyle de kapsid oluşur. Oluşan bu kapside viral DNA’nın ve minör kapsid proteini olan L2’nin eklenmesiyle virus meydana gelir (9). Virus partikülünü oluşturan birimler şekil 1’de şematize edilmiştir.

Human papillomavirusun elektron mikroskopik resmi şekil 2’de gösterilirken şekil 3’te HPV partikülünün üç boyutlu şekli şematize edilmiştir.



**Şekil 1.** HPV partikülü (17).

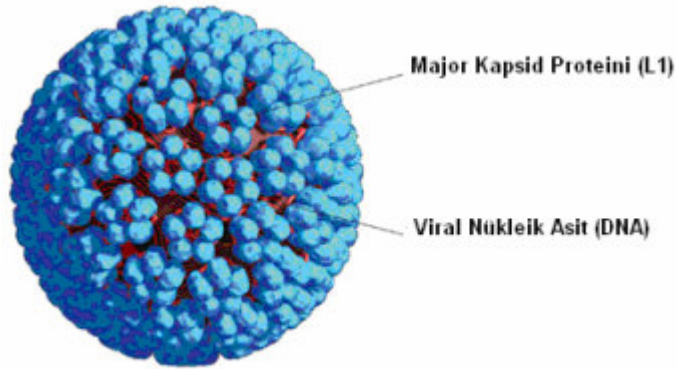


**Şekil 2.** HPV'nin elektron mikroskopik resmi (18).

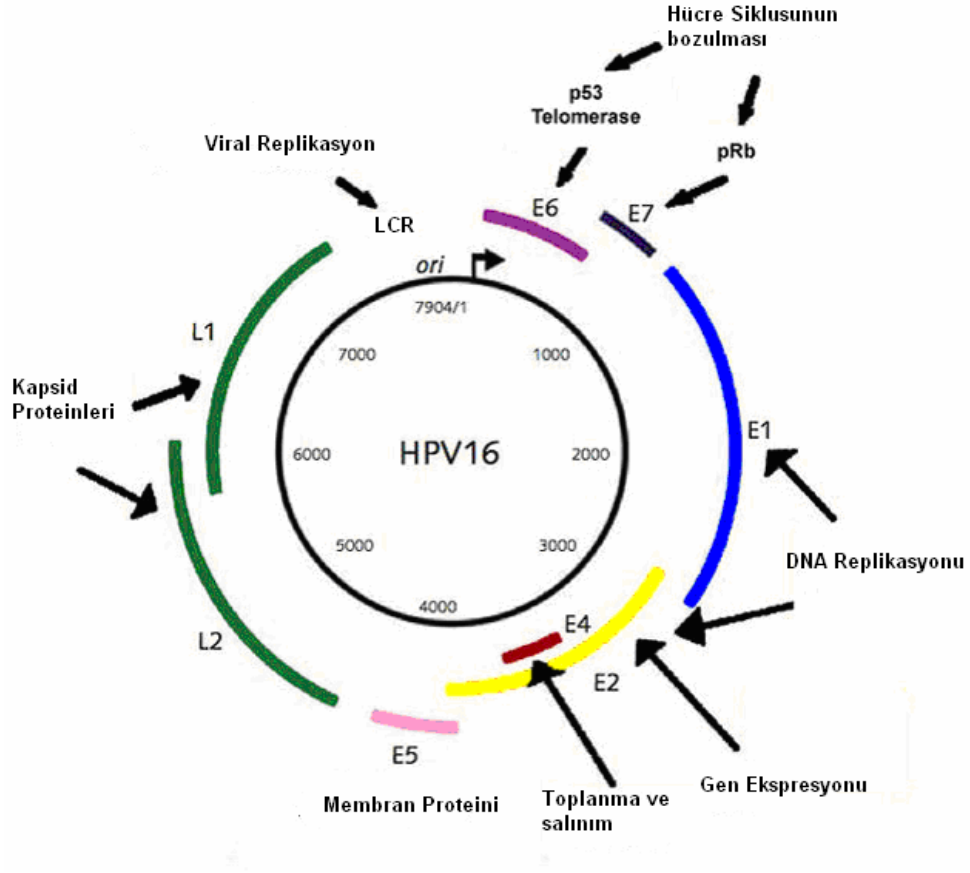
Viral genom yaklaşık 8000 baz çifti uzunluğunda olup erken bölge (early region), geç bölge (late region) ve uzun kontrol bölgesi (long control region; LCR) olmak üzere 3 bölgeye ayrılır. Erken bölgede 8 adet ORF (open reading frame: açık okuma bölgesi), geç bölgede 2 adet ORF bulunur. Bütün HPV ORF'leri virusun sadece

bir sarmalı üzerinde lokalize olmuştur. E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8 ORF' leri tarafından kodlanan erken (E; early) proteinler viral replikasyonu ve hücrelerde yüksek viral kopya sayısını sağlar. Erken bölge, aynı zamanda HPV genomunun hücre transformasyonu yapıcı birimlerini de içermektedir. Geç (L; late) proteinlerden L1 geni major kapsid proteinini ve L2 geni minör kapsid proteinini kodlar (9, 16).

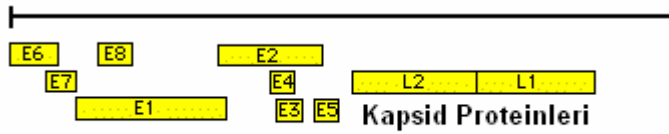
Long control region; kodlanmayan bölge olup viral DNA replikasyon orijini bulunduran bölgedir. Erken proteinlerden E1 ve E2 kompleks oluşturarak LCR'deki orijine bağlanır ve replikasyonu başlatır (19- 21). LCR, 400 bç'lik, farklı transkripsiyon aktivatörleri ve inhibitörleri için bağlanma noktaları içeren kompleks bir düzenleyici bölgedir. Bu aktivatör ve inhibitörler, aktivatör protein-1 (AP-1), nükleer faktör (NF-1/CTF), Oct-1, Sp-1 YY1 ve keratinosit–spesifik faktör (KFF-1)'dür. Bunlar gibi transkripsiyonel faktörlerin LCR'ye bağlanması, erken bölgedeki ORF'lerin transkripsiyonunu düzenler ve sürdürülmesine yardımcı olur. Bu bölge, ayrıca, spesifik HPV tiplerinin sınıflandırılmasında da önemli rol oynamaktadır (9, 16). Şekil 4 ve 5'te HPV genomunun lineer ve sirküler formları şematize edilmiştir.



Şekil 3. HPV'nin şematize edilmiş hali (22).



Şekil 4. HPV genomu (sirküler) (23).



Şekil 5. HPV genomu (lineer) (23).

### 3.3. PATOGENEZ

Papillomavirus genomu bazal hücrelerin nükleusunda epizomal halde bulunur ve rolling cycle (yuvarlanan çember) replikasyon modeli ile nükleusta çoğalır (11).

E1 proteini viral DNA replikasyonu, E2 proteini ise hem viral replikasyon hem de transkripsiyonun kontrolü için gereklidir. Bu proteinler HPV genomunun bazal hücrelerin nükleusunda epizomal halde kalmasını ve replikasyonun devamını sağlar. E1 ve E2 kompleks oluşturarak LCR'deki replikasyon orijinine bağlanır ve DNA replikasyonunu başlatır. E1 proteininin helikaz ve ATPase aktivitesi de vardır. E2 proteini, HPV'nin replikasyon orijinindeki E1 komplekslerinden oluşan enzimatik yönden aktif yapıyı HPV'nin replikasyon orijinine iletmeye yardımcıdır. E2 proteinleri, ayrıca erken bölge ORF'lerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde de önemli rol oynamaktadır. E2 proteini tarafından düzenlenen 2 kilit protein E6 ve E7'dir. E2'nin ekspresyonu E6 ve E7'yi repress ederek hücrelerde E6 ve E7'nin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca E2 proteininin aşırı ekspresyonu hücrede apoptozis ile sonuçlanmaktadır (11, 15, 16).

E4 ve E5 ORF'nin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, virusun olgunlaşması ve viral replikasyon için önemli olduğu düşünülen proteinleri kodladıkları sanılmaktadır. E4 proteininin hücreye şeklini veren sitoskeletona bağlanarak yapısını bozduğu, ayrıca kornifiye tabakanın yapısını bozarak viral partiküllerin hücrelerden salınımına izin verdiği düşünülmektedir (20). E4, aynı zamanda keratinosit intermediate filament ağının bozulmasına da yol açmaktadır (11).

E5 proteininin hücre membranındaki üreme faktörü reseptörlerine bağlanarak hücre proliferasyonunu stimüle ettiği öne çıkan görüşler arasındadır. E5 ayrıca, çok zayıf bir transformasyon aktivitesine sahip olmasının yanısıra, hücre membranında bulunan

hidrofobik bir protein kodlamakta ve protein kinaz C (PKC) ile membran kinaz aktivasyonlarına da sebep olmaktadır (11, 16).

E6 ve E7 proteinleri hücreleri transforme edici proteinlerdir. Hücrelerin transformasyonu, viral DNA konak hücre genomuna entegre olduğunda gerçekleşir. Sadece yüksek riskli HPV tiplerinin genomu konak hücre DNA'sına entegre olur (20).

E6 proteini, endojen enzimatik aktivite gerektiren 150 aminoasitlik bir çinko bağlayan proteindir. E6, adenovirus E1B proteini ve SV40 Large T antijeni ile sekans homolojisi gösterir. Bu proteinlerin hepsi, önemli bir protein düzenleyicisi olan p53'ü bağlama kapasitesine sahiptir. p53 geni anahtar bir hücresel düzenleyici gendir ve tümör supresyonunu sağlar. p53 ekspresyonunun kaybı, malignensi gelişimi ile ilişkilidir. Ayrıca p53 geni bir onkogen özelliği kazanabilir, çünkü bu genin mutant formları baskın bir transformasyon yapıcı gen gibi davranabilir. Non-infekte hücrelerde, p53 düzeyinin artışı, anormal hücre proliferasyonu veya DNA hasarının bir göstergesi olabilir. p53'ün yükselmesi, hücre siklusunun G1 fazında hücre büyümesinin durmasını sağlar. Hücre büyümesinin G1'de durması, hücrelerin DNA tamiri yapması veya programlı hücre ölümü (apoptozis) ile elimine edilmesi için bir fırsattır. Human papillomavirus ile infekte hücrelerde p53 seviyeleri düşüktür. Çünkü E6 ile bağlı p53'ün ubiquitin bağlı yol ile hızlı proteolitik yıkımından sonra hücrede p53 miktarı azalır (9, 11, 16).

Human papillomavirus E6 onkoproteini, HPV E7 onkoproteinine kıyasla daha düşük bir transformasyon yapma özelliğine sahiptir. Bununla birlikte, E6 proteini, yüksek riskli HPV tiplerinde E7 proteininin transformasyon yapıcı etkisini önemli ölçüde arttırmaktadır (9, 14, 16).

E7 proteini, yüksek riskli HPV tiplerinde major transformasyondan sorumlu proteindir. E7, fosforile halde bulunan ve enzimatik aktivite gerektiren yaklaşık 100

aminoasitten ibaret, çinko bağlayan bir proteindir. E7, ras onkogeni ve hücre proliferasyonunda kritik rolü olan retinoblastoma geni (Rb) ve Rb ile bağlantılı p130 ve p170 proteinlerinin aktivasyonuna yol açar. Human papillomavirus E7 proteininin bu proteinlere bağlanmasının sonucu olarak, hücre proliferasyonunu inhibe eden bu endojen tümör supresör proteinleri inaktive olur. E7 proteini, yüksek riskli HPV tiplerinde Rb genine düşük riskli HPV tiplerine oranla daha sıkı ve kuvvetlice bağlanmaktadır. Benzer bir şekilde, yüksek riskli HPV tiplerinde p53 bağlanma affinitesi düşük riskli HPV tiplerine oranla daha yüksek bulunmuştur (9, 14, 16).

E7, adenovirus E1A polipeptidi ve polyomavirus SV40 Large T antijeni ile myc onkogeni ile sekans homolojisine sahiptir (16).

E3 ve E8'in fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (15, 16).

HPV'lerde saptanan genler ve fonksiyonları Tablo 3'de verilmiştir (15).

**Tablo 3.** HPV' de saptanan genler ve fonksiyonları (15).

GEN	FONKSİYON
E1	DNA replikasyonunun başlatılması, helikaz aktivitesi
E2	DNA replikasyonunun transkripsiyonel düzenlenmesi
E3	Bilinmiyor
E4	Sitoskeletonun bozulması
E5	Transformasyon proteini
E6	Transformasyon proteini, p53'ün parçalanması
E7	Transformasyon proteini, Rb'nin parçalanması
E8	Bilinmiyor
L1	Major kapsid proteini
L2	Minör kapsid proteini



Hücrelerin transformasyonu viral DNA konak hücre DNA'sına entegre olduğunda gerçekleşir. Sadece yüksek riskli HPV tiplerinin genomları konak hücre DNA'sına entegre olur. Düşük riskli HPV tiplerinin genomu benign ve düşük grade lezyonlarda hücre nükleusunda epizomal DNA olarak bulunur. Epizomal formda E2 ORF fiziksel olarak bütün bir haldedir ve E6-E7 ORF'lerinden transkripsiyon düzenlidir. Ancak, çoğu yüksek grade prekürsör lezyonda, özellikle HPV 16'nın yol açtığı karsinomların % 75'i, HPV 18'in yol açtığı karsinomların ise hemen hemen tümünde HPV genomu konak hücrenin kromozomal DNA'sına entegre olmaktadır. Human papillomavirus DNA'sının entegrasyonu sırasında normalde viral onkogenleri baskılayan E2 ORF'in yapısı bozulur ve viral onkoproteinler olan E6 ve E7 aktive olur. E6 proteini, tümör supresör protein p53'ün fonksiyonunu inhibe eder. Böylece hücrelerin genetik stabilitesinin korunamaması ve apoptozisin inhibe olması sonusunda hücrelerin transformasyon riski artar (9, 11, 14, 16).

### **3.4. İMMÜNİTE**

Human papillomaviruse karşı immün cevap geç oluşur. Human papillomavirus latent ve non-litik infeksiyon oluşturduğundan ve viremi fazı olmamasından dolayı HPV'ye karşı antikor oluşumu HPV DNA tespitinden 8- 18 ay kadar uzun bir süre sonra ve çok düşük düzeyde gelişir. Ayrıca HPV ile infekte keratinositlerin yüzeylerinde az miktarda HPV antijeni sunmaları da virusun immün cevaptan kaçmasına neden olur. Human papillomavirusun major kapsid proteini olan L1'e karşı gelişen tip spesifik IgG ve IgA antikorları serum ve servikal sekresyonlarda tespit edilir ve koruyucudur. Ancak HPV infeksiyonu geçirmiş kişilerin hepsinde bu antikor cevabı oluşmamaktadır. Servikal kanseri olan HPV 16 DNA pozitif kadınların yaklaşık % 50'sinde IgG antikor cevabı oluşur ve yıllarca kalabilir (24).

Hücrel immüitenin suprese olduğu HIV hastalarında ve transplantasyon yapılan kişilerde HPV infeksiyonları daha sık gözlenmektedir. Human papillomavirus lezyonlarının spontan regresyonunda hücrel immüite rol oynamaktadır. İmmün sistemi baskılanmış kişilerde HPV infeksiyonlarının sık görülmesi, hücrel bağışıklığın iyileşmede etkin olduğu fikrini desteklemektedir. Servikal HPV infeksiyonlarının çoğunda HLA- Klas 1 ekspresyonunun azaldığı görülürken HLA-Klas 2 ekspresyonunun artması dikkat çekicidir (25).

### **3.5. REPLİKASYON**

Human papillomavirusun hayat siklusu epitel hücrelerinin farklılaşmasına son derece bağlıdır. Virusun replikasyonu, infeksiyöz partiküllerin, bütünlüğü bozulmuş çok tabakalı epitelde, epidermisin bazal hücrelerini infekte etmesi ile başlar. İnfeksiyonun başlangıç yeri, immatür skuamöz epitelin HPV için reseptörler bulunduran bazal hücreleridir. Human papillomavirus için epitel hücrelerinde spesifik reseptörler tam bilinmemekle beraber heparan sülfat ve integrin'in virusun hücrelere bağlanmasında rol oynadığı belirlenmiştir (26, 27).

Papillomavirus bazal hücrelere girdiği zaman, 2 farklı biyolojik durum olabilir:

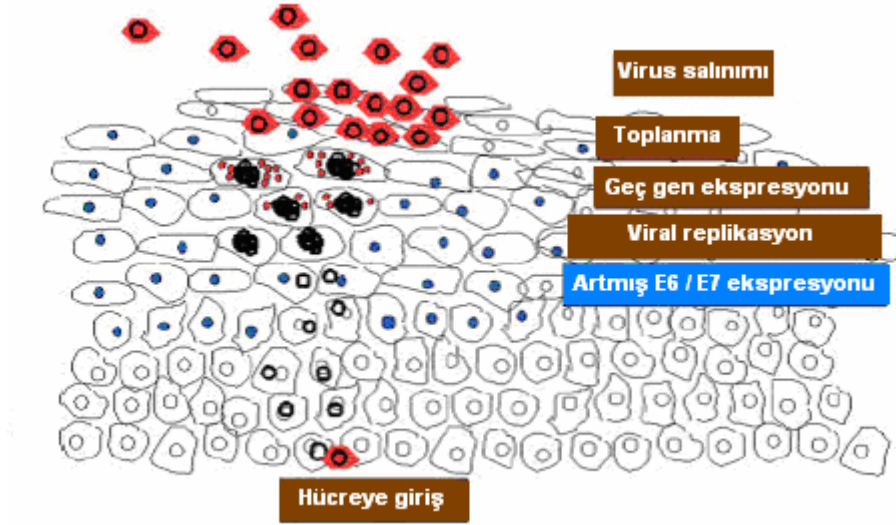
*1- Latent infeksiyon*, HPV DNA'nın bazal hücrelerde sessiz kaldığı ve virion üretiminin olmadığı nonproduktif infeksiyon durumudur. Latent infeksiyonlarda epizom olarak adlandırılan küçük bir miktar HPV genomu hücre nukleusunda serbest sirküler bir form halinde kalır. Epizomal DNA'nın replikasyonu epitelyal hücrelerin replikasyonuna sıkıca bağlıdır ve sadece konak hücre kromozomal DNA replikasyonu olduğu zaman gerçekleşebilir. Çünkü latent infeksiyonlarda tam bir viral partikül (virion) üretilmez, HPV infeksiyonunun karakteristik sitopatik etkileri gözlenmez ve HPV ancak moleküler metodlar kullanılarak belirlenebilir (16, 26).

**2- *Produktif infeksiyonda***, viral DNA replikasyonu konak hücre kromozomal DNA'sından bağımsız olarak gerçekleşir. Bu bağımsız viral DNA replikasyonunun sonucu büyük miktarlarda viral DNA ve infeksiyöz virion üretimidir. Viral DNA replikasyonu, çok tabakalı skuamöz epitelin intermediate ve superficial hücre tabakalarında gerçekleşir. Virus ile infekte hücreler olgunlaşarak epitel yüzeyine doğru göç ettikçe, hücresel kökenli, epitel tarafından üretilen transkripsiyonel faktörler, viral kapsid proteinlerinin üretimini stimüle ederler. Bu süreç, çok miktarda virion oluşumuna ve HPV infeksiyonunun sitolojik olarak tanımlanabilen karakteristik sitopatik etkilerinin ortaya çıkmasına imkan verir. Bu sitopatik etkiler; akantozis, sitoplazmik vakuolizasyon, koilositozis, multinükleasyon ve nükleer atipidir (16, 26).

Bazal hücrelerde erken proteinler E1 ve E2 eksprese edilir ve infeksiyon süresince viral DNA her hücrede 20- 100 genom olacak şekilde düşük düzeylerde replike olur. Epizomal HPV genomları bazal hücreler bölündükçe yeni hücrelere geçer. Bazal tabakadan ayrılan hücreler epitelyumun yüzeyine doğru ilerledikçe farklılaşır. Virion üretimi sadece suprabazal bölgedeki farklılaşmış hücrelerde yapılır. E1, E2, E4 ve E5 proteinleri sentez edildikçe viral genom sayısında artış meydana gelir. Epitelyumun üst katlarındaki hücrelerde geç viral proteinler olan L1 ve L2 kapsid proteinleri sentez edilerek nukleusta virus partiküllerinin birleşmesi sağlanır. Sonunda epidermal tabakanın yüzeyinden çok sayıda virus ile yüklü keratinositlerin dökülmesiyle viruslar salınmış olur (21, 27, 28).

Viral infeksiyona cevap olarak epitelyal hücrelerde nükleer atipi, artmış mitoz hızı ve sitoplazmik vakuolizasyon, perinükleer halka ve büyük, hiperkromatik nükleus ile karakterize koilositoz gibi sitopatik etkiler meydana gelir (9). Viral replikasyon bazal tabaka hariç epidermin diğer tabakalarında aşırı proliferasyona yol açar ve hücrelerde

hiperplazi ve hiperkeratozis oluşur. Prekanseröz lezyonlar, epitelyumdaki atipik değişikliklere göre düşük dereceli veya yüksek dereceli SIL olmak üzere gruplandırılır (26). Human papillomavirusun replikasyonu şekil 6’da şematize edilmiştir.



Şekil 6. HPV’nin replikasyonu (29).

### 3.6. OLUŞTURDUKLARI HASTALIKLAR VE KLİNİK BELİRTİLER

Human papillomavirusun klinik belirtileri asemptomatik ve benign lezyonlardan tekrarlayıcı ve tedaviye dirençli proliferatif tablolara kadar giden geniş bir yelpaze ile karşımıza çıkmaktadır. İnfeksiyon genel olarak lokalize kalmakta ve spontan olarak gerilemektedir. Lezyonların spontan regresyonundan veya uygun tedaviden sonra HPV genomu bazal hücrelerde epizomal formda latent olarak da kalabilmekte ve rekürren infeksiyon oluşturabilmektedir. Bazı kişilerde ise persistan HPV infeksiyonu gelişmekte ve HPV’nin oluşturduğu lezyonlar prekanseröz olabilmekte, kansere yol açabilmektedir. Bu geniş değişken klinik tablo, virusun tipine, lezyonun lokalizasyonuna, bireyin immünolojik durumuna ve epitelin türüne bağlanabilir (15).

**3.6.1. Deri infeksiyonları:** En sık çocuklarda ve gençlerde verrüköz lezyonlar tablosuyla ortaya çıkar.

1- *Verruca vulgaris*: Genellikle HPV genotip 2 ve 4 tarafından oluşturulan, en çok el ve parmaklarda olmak üzere vücudun her yerinde lokalize olabilen ağrısız lezyonlardır.

2- *Verruca plantaris*: Human papillomavirus tip 1 tarafından oluşturulan, ayak tabanında lokalize olan hiperkeratotik, endofitik ve ağrılı olan papüllerdir.

3- *Verruca plana*: Özellikle yüz, el sırtı ve bacaklarda görülen, sıklıkla HPV tip 3 ve 10'un etken olduğu, deri renginde veya pembe, fazla kabarıklık olmayan, 2-4 mm büyüklüğünde küçük papüllerdir (10, 15). Yirmi kutanöz HPV tipinin hemen hemen hepsi epidermodysplasia verruciformis hastalarından izole edilmiştir. Bu lezyonların çoğu çocukluk çağında gelişir ve tedaviye dirençlidir (15).

**3.6.2. Mukozal infeksiyonlar:** Genital, respiratuvar, oral mukozalar ve konjonktiva HPV'nin infeksiyöz etkisine en duyarlı olan bölgelerdir. Genital bölgeden 30'a yakın HPV tipi izole edilmiştir ve bu bölge birçok HPV tipi açısından rezervuar bölge olarak kabul edilmektedir. Genital bölge infeksiyonlarından en çok sorumlu tutulan tipler HPV tip 6, 11, 16, 18 ve 31'dir. Bunun yanında HPV 6 ve 11, ekzofitik kondillomların çoğu, respiratuvar papillomların hemen hemen tümü ve bazı oral ve konjonktival infeksiyonlardan da sorumludur. Human papillomavirus 16 ve 18 genital bölgenin bazı benign lezyonlarında konakçı iken, bu tiplerin özellikle premalign ve malign lezyonlardan sorumlu oldukları kanıtlanmıştır (15).

Oral kavitenin en sık görülen benign epitelyal tümörü oral papillomlardır ve her yaş grubunda görülebilir. Yüzeyleri düzensiz papiller görünümdeki bu lezyonlar cerrahi eksizyon sonrası nadiren tekrar oluşur. Larinks papillomları, larinksin en iyi huylu epitelyal tümürüdür. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda laringial papillomatöz

olgularının % 2'sinin skuamöz hücreli karsinom transformasyonuna uğradığı öne sürülmüştür (30). Human papillomavirus tip 13 fokal epitelyal hiperplazi ile ilişkilidir ve sadece ağız içinde bulunmaktadır (15).

**3.6.3. Servikal displazi ve neoplazi:** Human papillomavirus ile servikal kanser arasındaki ilişki ilk defa 1977 yılında zur Hausen tarafından bildirilmiştir (31).

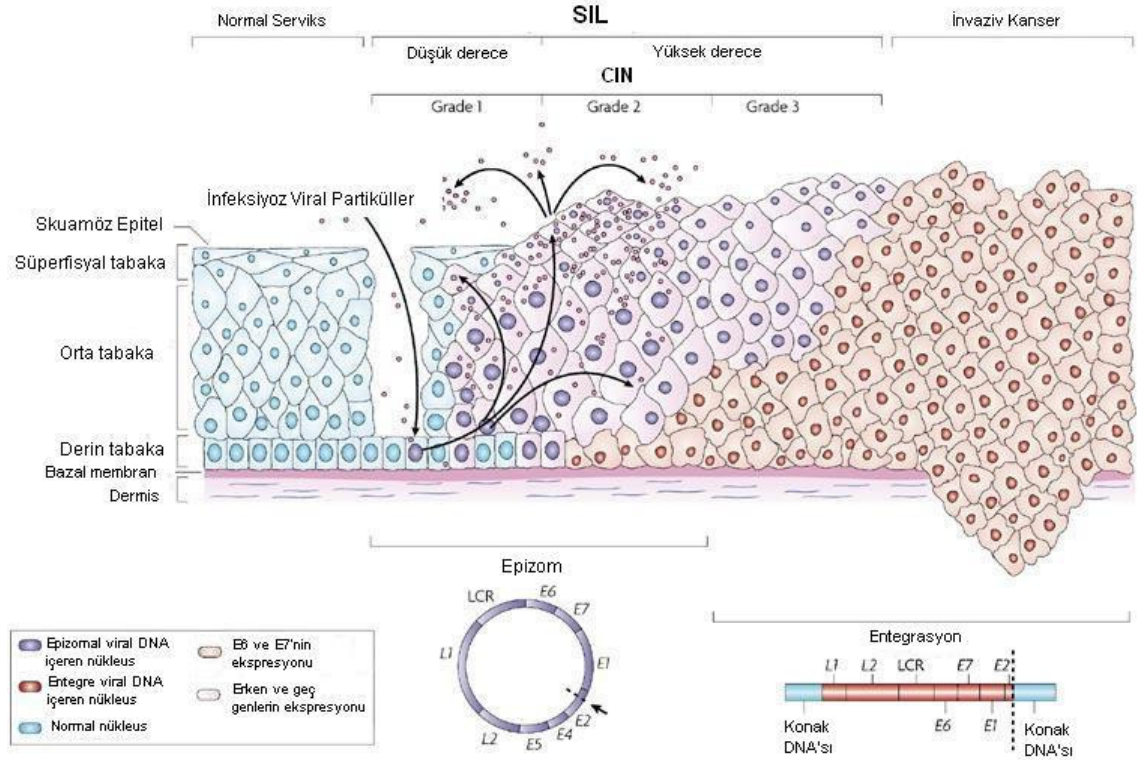
Human papillomavirus günümüzde bütün dünyada servikal kanserin primer etiyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir. Servikal kanser, tüm dünyada kadınlarda meme kanserinden sonra görülen ikinci en yaygın kanser türüdür. Dünyada her yıl 470.000'den fazla yeni servikal kanser vakası tanımlanmakta ve servikal kansere bağlı yaklaşık 250.000 ölüm bildirilmektedir (26).

Servikal kanser vakalarının % 75-80'i servikal kanser tarama programlarının etkili bir şekilde yapılamadığı gelişmekte olan ülkelerde görülür. Servikal kanser, prekanseröz lezyonların erken tespiti ve tedavisi ile büyük ölçüde önlenebilir bir hastalıktır. Erken teşhis çok önemlidir, çünkü prekanseröz lezyonların invaziv kansere ilerlemesi 10 yıldan uzun bir sürede gerçekleşmektedir.

Servikal kanser, skuamöz intraepitelyal lezyon (SIL) veya servikal intraepitelyal neoplazi (cervical intraepithelial neoplasia; CIN) denilen prekanseröz lezyonlardan gelişir. Prekanseröz lezyonlar epiteldeki atipik değişikliklere göre düşük dereceli SIL ve yüksek dereceli SIL olmak üzere gruplandırılır. CIN 1 LSIL'e, CIN 2 ve CIN 3 HSIL'e dahildir (Şekil 7). Servikal prekanseröz lezyonların diğer bir histopatolojik sınıflandırmasında ise CIN 1 hafif displazi, CIN 2 orta displazi, CIN 3 ağır displazi ve karsinoma in situ lezyonlarına karşılık gelir (26).

Özellikle HPV tip 16 ve 18'in serviks kanseri etiyolojisinde rol oynadığı, epidemiyolojik ve moleküler biyolojik verilere göre kesinlik kazanmıştır. Servikal

displazi, CIN ve primer kondilloma lezyonlarının çoğunda bu tipler yanında HPV tip 31 ve 45 de saptanmıştır (26).



Şekil 7. HPV- kanser ilişkisi (32).

Servikal kanserde karakteristik histopatolojik bulgu servikal örneklerden hazırlanan Papanicolau boyamasında görülen perinükleer sitoplazmik vakuolizasyon ve nükleer genişleme gösteren koilositotik hücrelerdir. Servikal kanser hücrelerinde HPV'nin genomu konak hücrenin kromozomuna entegre olmuştur. Entegre olan HPV geni hemen daima E2 genidir. E2 geni normal şartlar altında E5, E6 ve E7'nin ekspresyonunu azaltıcı bir işlev yaparken, entegrasyon sırasında E2 geninin parçalanması nedeniyle kontrolsüz E5, E6 ve E7 ekspresyonu olur. Oluşan E6 gen ürünleri konak hücrenin p53 supresör geninin yıkımını artırır ve apoptozisi inhibe eder.

E7 gen ürünleri ise konak hücrenin retinoblastoma gen ürünlerine bağlanak onları inhibe eder ve konak hücreni DNA sentezi ve mitozu sürükler (7, 15).

### **3.7. HPV İNFEKSİYONLARININ TANISI**

Papillomavirus infeksiyonlarının çoğu subklinik ve latent seyrettiği için genellikle klinik belirti vermez. Bu nedenle infeksiyonların tanısında virolojik tanı metodları kullanılır (26).

Human papillomavirus hücre kültürü veya laboratuvar hayvanlarında üretilememektedir. Serolojik testler ise yeterince duyarlı değildir. Major kapsid proteinlerine karşı oluşan uzun süreli humoral immün cevap, infeksiyonun akut veya kronik olduğu ayırımının yapılmasını imkansız kılmaktadır. Human papillomavirus ile infekte hücrelerde immünohistokimyasal yöntemlerle HPV kapsid antijenlerinin tespiti ise sensitivitesi çok az olmakla beraber ancak produktif HPV infeksiyonunda mümkündür. Bu nedenle HPV infeksiyonunun tanısı öncelikle viral nükleik asidin saptanması esasına dayanmaktadır (26).

Human papillomavirus infeksiyonlarının tanısında kullanılan moleküler tanı testleri üç grupta incelenebilir (26):

#### **3.7.1. Hibridizasyon testleri:**

- a- İn situ hibridizasyon (ISH)
- b- Southern blot hibridizasyon (SBH)
- c- Dot blot hibridizasyon (DBH)
- d- Floresan in situ hibridizasyon (FISH)

Nükleik asit problemleri, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında mikroorganizmaların identifikasyonu amacıyla kullanılan pratik araçlar olarak geliştirilmiştir. Bakterileri



morfolojik, biyokimyasal ve immünolojik özellikleri ile tanımlayan geleneksel fenotipik yaklaşımların aksine, organizmaları kendilerine has nükleotid dizileri ile tanımlar (33).

Nükleik asit probları, belli mikroorganizmaları ve bunların genlerini belirlemek için kullanılan, belirleyici moleküllerle işaretlenmiş DNA veya RNA fragmanlarıdır. Bir probun özgüllüğü, hedef organizmada bulunan nükleik asitlere bağlanacak olan probu oluşturan nükleik asit dizisinin özgüllüğüne bağlıdır. Hedef dizi, genomik DNA, mesajcı RNA, ribozomal RNA (rRNA) gibi genomik DNA transkriptleri veya genomik RNA olabilir. Günümüzde, küçük alt ünite rRNA moleküllerine karşılık gelen oligonükleotid proplar, tür identifikasyonuna yönelik olarak hazırlanan ticari kitlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu proplar, genellikle 50 bp'den kısa, tek iplikçikli oligonükleotidler olup kimyasal olarak sentezlenmektedir. Bu proplar, kendi kendilerine hibridize olamadıkları için, hedef dizilere hibridizasyon hareketini arttırmak için yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilirler (26, 33).

Hibridizasyon, birbirini tamamlayıcı nitelikte iki tek iplikçikli nükleik asit molekülünün birbirine bağlanmasıdır. Pratikte, bilinen diziye sahip işaretli bir prob, bir hedef bölgeye bağlanarak iki iplikçikli yeni bir molekül ortaya çıkarır. Daha sonra bu işaretli molekül belirlenir (33).

Hibridizasyon, hem probun hem de hedefin serbest hareket edebildiği sıvı bir ortamda gerçekleştirilebildiği gibi, hedef dizinin katı bir yüzeye bağlı olduğu, sadece probun hareketli olduğu katı ortamlarda da uygulanabilir:

1- Sıvı fazlı hibridizasyon: Reaksiyon kinetiğini hızlandırarak hızlı dubleks oluşumunu sağlar ve böylelikle deneyin süresini kısaltır. Bu formatın dezavantajı, daha saf nükleik asit kullanılması gerekliliği ve ortamda hedef olmayan ancak hedefe benzer nükleik asitlerin varlığında hibridizasyonun etkinliği ve özgüllüğünün azalabilmesidir.

2- Katı fazlı hibridizasyon: Çok sayıda örneğin aynı anda değerlendirilmesi için tercih edilen formattır. Bu formatta hedef nükleik asitler ayrılarak katı bir yüzeye (nitrosellülöz veya naylon membran) tutturulur. Hibridizasyon ve tespit etme yöntemleri sıvı formatta olduğu gibi gerçekleşir. Ancak bu formatın duyarlılığı, membrana bağlı dizilerin ulaşılabilirliğinin kısıtlanması durumunda azalabilmektedir. Formatın uygulamaları arasında, klonlanmış genlerin identifikasyonu için dot-blot hibridizasyonu, DNA fragmanlarının büyüklük ve dizilerini belirlemede kullanılan Southern blotlama ve RNA alt tiplerini belirlemede kullanılan Northern blotlama sayılabilir. Bu formatta bir örnek prob olarak birçok dizinin varlığı araştırılabilir (26, 33).

**3.7.2. Hibrid yakalama testi (hybrid capture):** Sinyal çoğaltma kullanılarak yapılan direkt DNA tespittir. Sentetik oligonükleotidler ile kaplanmış küçük cam veya metal boncuklar, sıvı fazlı hibridizasyon formatına benzer şekilde uygulanmaktadır. Oluşan hibridler, bağlanmayan problardan santrifüjleme veya manyetik alan uygulanması ile ayrılmaktadır. Bu amaçla kullanılan oligonükleotid, sıklıkla belirleyici bir prob ile eşlenen ‘yakalama probu’dur. Polimeraz Zincir Reaksiyonu’na göre özgülüğünün nispeten az olması, dezavantajdır (11, 26, 33).

**3.7.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR):** Bir veya birden fazla hedef molekülü, saptanabilecek düzeylere kadar çıkaran, in vitro ortamda enzimatik olarak çoğaltma yöntemlerinden biridir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu, DNA polimerazın DNA sarmalını kopyalayarak çoğaltma kabiliyetine dayanır. Bu enzim, hedef DNA sarmalına bağlı dizinin 3’ ucunda uzamayı başlatır. İki primer hedef DNA’nın tamamlayıcı sarmalına bağlandığı zaman, iki primer bağlanma alanı arasındaki sekans PZR’nin her döngüsünde katlanarak çoğaltılır. Reaksiyonda her döngü üç adımı içerir:

1- Hedef DNA çift sarmalının ayrıldığı DNA ısı denatürasyonu

2- Tamamlayıcı hedef dizilere primerlerin bağlandığı annealing

3- DNA polimerazın hedef dizileri primerler arasında uzattığı extension

Bu her üç adımı da içeren her döngünün sonunda PZR ürünleri teorik olarak iki katına çıkar. Tüm bu işlemler, ısı döngü cihazı (thermocycler) içinde olur.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu tekniği, basitliği ve esnekliği nedeniyle yaygınlaşmış olup mikrobiyal patojenlerin saptanması, klinik izolatların identifikasyonu ve suş alt tiplendirmelerinde kullanılmakta olan bir methodur. Human papillomavirus tanı yöntemleri arasında en duyarlı metod olan PZR, referans test olarak kabul edilmektedir (34, 35). Tablo 4'te günümüz itibariyle mevcut olan HPV tanı yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları gösterilmiştir (10).

**Tablo 4.** HPV tanı yöntemlerinin karşılaştırılması (10).

YÖNTEM	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
Southern Blot	Altın standart	Sınırlı klinik uygulama Karmaşıklık Standardizasyonu zor
FISH		Yeterince duyarlı değil Tip tayini yanlışlıkları Hatalı sonuçlar Zaman alıcı ve yorucu
HPV Profile	14-16 tip için probu var Kullanılabilirliği yüksek	Çok pahalı ve zahmetli Analitik duyarlılığı az
Hybrid capture	Duyarlılığı yüksek Kantitatif Hızlı ve ucuz	Özgüllüğü düşük
PZR	Tüm HPV tiplerini saptama	Kontaminasyon riski yüksek

### 3.8. EPİDEMİYOLOJİ

Human papillomavirus, genellikle fiziksel ve kimyasal ajanlarla inaktivasyona dirençlidir. Bu nedenle kontamine olmuş yüzeyler ve eşyalarla geçiş olasıdır. Bazal hücrelerin infeksiyöz virusla karşılaşmasının, seksüel temas veya epitelin deri abrazyonu gibi minör travmaya maruz kalması gibi nedenlerle olduğu düşünülmektedir (15).

Lezyonun lokalizasyonu, infeksiyöz virus partikül miktarı, travmanın şiddeti, HPV tipi ve bireyin bağışıklık durumu HPV geçişini etkileyen faktörlerdir. Hücresel immüitesi baskılanmış kişiler, HPV infeksiyonuna daha duyarlıdır. Çocuklarda ve genç erişkinlerde % 10'lara varan oranlarda plantar ve yaygın siğiller görülürken erişkinlerde daha az saptanması kazanılmış immüiteye bağlı olabilir (36).

Human papillomavirusun yol açtığı hastalıklar arasında siğiller, epidermodysplasia verruciformis, condyloma accuminata, serviks karsinomu, rekürren respiratuar papillomatozis, oral fokal epitelyal hiperplazi, konjonktiva papillomu ve diğer bölge karsinomları sayılabilir (37).

Human papillomavirus tip 13 ve HPV 32'nin yol açtığı oral bir hastalık olan fokal epitelyal hiperplazinin sıklıkla Kızılderililer ve Güney Afrikalılar arasında görüldüğü bildirilmiştir (38).

Genital organların HPV infeksiyonları halen en sık cinsel temasla bulaşan hastalıklar arasında yer almaktadır. Virus ile infekte asemptomatik kişiler virusun yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle tüm populasyonda HPV infeksiyonları sık görülmektedir. Seksüel yönden aktif kişilerin % 80'inin hayatlarında en az bir kez 1 ya da daha fazla HPV tipi ile infekte oldukları düşünülmektedir (39). Özellikle cinsel aktivitenin artış gösterdiği 15- 50 yaş arası bireylerde anogenital HPV infeksiyonları sık görülmektedir. Birçok kişide HPV infeksiyonu en çok 1 yıl içinde

immün sistem tarafından temizlenmekte ve spontan regresyon olmakta, kişi infekte olduğu HPV tipine karşı doğal yoldan bağışıklık kazanmaktadır (40).

Latent virus, fiziksel veya duygusal stres, gebelik, infeksiyonlar, kanser tedavisi gibi geçici veya kalıcı immün sistem baskılanması durumlarında tekrar aktif hale geçerek infeksiyon oluşturabilmektedir (15).

Anogenital ve servikal lezyonlarda farklı HPV tipleri gösterilmesine rağmen eşler arasında aynı tiplerin varlığı gösterilmiştir. Kadın genital sisteminde özellikle HPV 16 ve 18 ile, nadiren de diğer HPV tipleriyle infeksiyonun prekanseröz lezyonlar ve servikal karsinoma yol açtığı öne sürülmektedir. Displazilerin % 50-70'inin spontan olarak regrese olduğu ve çok az bir kısmının invaziv karsinoma ilerlediği rapor edilmiştir. İnvaziv karsinomda en sık tespit edilen HPV tipi HPV 16 iken (% 50), bunu HPV 18 (% 14), HPV 45 (% 8) ve HPV 31 (% 5) izlemektedir (41).

### **3.9. HPV İNFEKSİYONLARINDA TEDAVİ VE KORUNMA**

Human papillomavirus vücuda girdikten sonra infeksiyon çoğunlukla subklinik olarak seyreder. Olguların % 60'ında seropozitivite, % 10'unda DNA pozitifliği, % 4'ünde anormal sitoloji, % 1'inde aşikar kondillomlar oluşmaktayken % 25'inde infeksiyon tanınmamaktadır. Çoğu HPV infeksiyonu geçicidir. Düşük riskli HPV tiplerinde ortalama taşıyıcılık süresi 4 ay iken yüksek riskli HPV tiplerinde 8 aydır. Human papillomavirus infeksiyonları % 80 oranında tek tip HPV ile oluşturulur. İnfeksiyon lokal immün yanıt oluşturarak iyileşir. Virus vücuda girdikten sonra 8-12 ay içinde immün sistem virusu bertaraf etmekte ve kişi infekte olduğu HPV tipine karşı bağışıklık kazanmaktadır. Human papillomavirus testlerinin negatifleşmesi iyileşme kabul edilir. Ancak virusun tamamıyla eradikasyonu pek mümkün değildir, çünkü virus bazal epitelde epizomal olarak kalmaktadır (42).

Aynı HPV tipiyle infeksiyonun devam etmesi persistan hastalığı gösterir. Persistans için gerekli süre 12 ay olarak kabul edilmektedir. Virusun normal servikal hücreye girmesinden sonra oluşan benign hücresel değişiklikler ve daha sonrasında gelişen düşük dereceli SIL veya CIN olarak tanımlanan düşük malign potansiyelli lezyonların % 60 gibi büyük bir bölümü 2-3 yıl içinde spontan olarak gerilemekte ve kaybolmaktadır. İnfeksiyonun daha ileri gidebilmesi için sigara kullanımı, folik asit eksikliği, herpesvirus infeksiyonu birlikteliği gibi predispozan faktörler gereklidir. Yüksek riskli HPV tipleri varlığında kofaktörlerin de etkisiyle bu lezyonların % 15'i 3-4 yıl içinde yüksek dereceli SIL veya CIN 2/3 olarak tanımlanan yüksek malign potansiyelli prekanseröz lezyonlara dönüşür. Prekanseröz lezyonların da % 30-70'i 10 yıl içinde ilerleyerek servikal kansere dönüşür (42).

Human papillomavirus ile infekte olması muhtemel tıbbi aletlerin viruslar için uygulanan standart sterilizasyon prosedürlerine göre sterilize edilmesi, korunmada önem taşıyan bir faktördür. Kondom kullanımının anogenital HPV infeksiyonları, serviks kanseri, CIN ve diğer anogenital kanser türlerinde koruyucu olduğuna ilişkin kanıtlar vardır. Anogenital kanserlerin takibi ve önlenmesinde Pap smear bir tarama testi olarak önemli yer tutmaktadır (15).

Anogenital siğillerin tedavisinde güncel tedavi yaklaşımları kimyasal veya fiziksel tedavi yöntemleriyle lezyonları destrükte ederek veya immün cevabı uyararak hastalığı eradike etmeye yöneliktir. Salisilik asit, laktik asit, biklorasetik asit, triklorasetik asit gibi kimyasal ajanlar, podofilin ve podofiloks gibi antimetabolit ve antimitotikler, retinoidler, interferon, nükleik asit analogları (Ribavirin, Cidofovir) siğillerin tedavisinde kullanılacak seçeneklerdendir. Fiziksel yöntemler arasında ise, küretaj, soğuk bıçakla eksizyon, elektrokoter, kriyoterapi ve LASER uygulanabilir (16).

Epidermodysplasia verruciformis’li hastaların mevcut olan deri lezyonlarının malign transformasyona uğrama riskini en aza indirmek için mümkün olduğunca UV ışığa maruz kalmamaları önerilmektedir (16).

### **3.10. HPV AŞILARI**

Son yıllarda, HPV’ye karşı geliştirilmiş aşıların, servikal prekanseröz lezyonlar ve servikal kanserlerde önleyici bir faktör olabileceği görüşü üzerinde yoğunlaşmıştır. Zhou ve arkadaşları, 1991 yılında ökaryotik hücrelerde HPV 16’nın kapsid proteinleri olan L1 ve L2 genini çoğaltarak VLP (virus-like partikül) sentezlemek suretiyle HPV aşısı geliştirmiş ve aşı çalışmalarını başlatmada bir yol açmışlardır (43). Daha sonra başka araştırmacılar VLP’yi saflaştırmış ve HPV’nin sadece L1 geninin yüksek titrasyonda nötralizan antikor ve yardımcı T hücre cevabı oluşturabileceğini ispatlamışlardır (44- 48).

Human papillomavirus aşıları, profilaktik (koruyucu) ve terapötik (tedavi edici) aşılar olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Günümüze kadar yapılmış olan aşı çalışmaları daha çok profilaktik aşılar üzerine yoğunlaşmıştır. Profilaktik aşıda hedef, HPV infeksiyonunun olduğu bölgede etkin bir bağışık yanıt oluşturarak oluşacak infeksiyonu ve reinfeksiyonu önlemektir. Bu tür aşılar özellikle HPV infeksiyonu riski taşıyan kişilerde oldukça faydalı gibi görünmektedir. Bu özellikler göz önüne alındığında profilaktik aşı için HPV L1-L2, terapötik aşı için ise E6-E7 gen ürünleri ideal olarak görülmektedir (49).

**3.10.1. Profilaktik aşılar:** Human papillomavirusun kapsid proteinleri yapısındaki VLP’lerden geliştirilmiştir. 3 tipi vardır:

Tip 1: Sadece L1’den oluşan VLP

Tip 2: L1 ve L2 füzyon proteinlerinden oluşan VLPs

### Tip 3: Dış yüz self peptidlerinden oluşan VLPs

Profilaktik aşıda kullanılan antijenler nötralizan antikorlar oluşturarak doğal infeksiyonun seyri sırasında oluşan virus partiküllerinin yayılımını önleyecektir. Bunun yanı sıra hücrel immün cevap virus ile infekte hücrelere etkin olacak ve hastalığın eliminasyonunu sağlayacaktır (40).

Human papillomavirusun in-vitro hücre kültürlerinde üretilmemiş olması profilaktik aşı üretimi için uygun materyal aranmasına yol açmıştır. L1 proteininin ökaryotik hücrelerde ekspresyonu sonucunda VLP'ler halinde bir arada toplanması aşı çalışmalarında büyük bir aşama olarak kabul edilmektedir. VLP'ler morfolojik olarak doğal virionlara benzerlik göstermeleri yanında nötralizan antikorların oluşması için gerekli olan epitoplara da içermektedirler (50, 51).

VLP'ler çeşitli ekspresyon sistemlerinde L1 proteininin üretilmesi ile gerçekleştirilmiştir. VLP'lerin koruyucu etkileri birçok hayvan modelinde, serumda nötralizan antikor titresi artışı ile gösterilmiştir. Nötralizan antikor oluşturmasının yanı sıra VLP'lerin aynı zamanda hücrel immün yanıtı aktive etme özelliği de vardır. Yapılan bir çalışmada HPV 16 L1 VLP'ler ile immünize edilmiş farelerde proliferatif yardımcı T hücre cevabı geliştiği gösterilmiştir (52).

Son zamanlarda HPV 16 ile yapılan monovalan, HPV 16 ve 18 ile yapılan bivalan ve HPV 6, 11, 16 ve 18 ile yapılan quadrivalan aşılarından ümit verici sonuçlar elde edilmiştir (53). L1 proteinlerinden elde edilen bivalan HPV aşısının (Cervarix) 27 aylık takip süresi içinde yeni infeksiyonlara karşı % 92 ve persistan infeksiyonlara karşı % 100 koruduğu saptanmıştır. Human papillomavirus tip 6, 11, 16 ve 18 L1 VLP'lerinden rekombinan maya teknolojisi ile üretilmiş quadrivalan HPV aşısının (Gardasil), HPV 16 ve 18 bağlantılı CIN'den ve persistan infeksiyonlardan % 100, HPV



6, 11, 16 ve 18 bağlantılı CIN'den % 99 ve external genital lezyonlardan % 95 koruduğu tespit edilmiştir (40, 51, 54, 55).

**3.10.2. Terapötik aşilar:** Yüksek riskli HPV'lerin E6 ve E7 onkoproteinlerinden geliştirilmiştir (42). Bu onkoproteinlerle hazırlanan E6/E7 aşısı ile yapılan çalışmalar günümüzde devam etmekte olup bu konuda henüz tam bir etkinlik saptaması yapılmamış durumdadır. Ancak E6/E7 proteinlerinin immünojenitesinin artırılması ile daha kuvvetli bir etkinliğin elde edilmesi mümkün olabilir. Böylece kanser gelişmekte olan kişilerde de aşılamanın etkin olduğunun gösterilmesi aşılama da yeni bir ufuk açacaktır (56).

## **4. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **4.1. Hastaların Seçimi**

Çalışma, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile Patoloji Anabilim Dalı'nın ortak katkılarıyla gerçekleştirildi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunca onaylanan çalışmada, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1998- 2006 yılları arasında üst solunum yollarında (oral kavite, nazal kavite, orofarinks, nazofarinks, tonsilla palatina, larinks ) malignite tanısı almış 100 hastaya ait tümör örnekleri vaka grubunu oluşturdu. Kontrol grubu olarak farklı hastaların aynı anatomik bölgelerinden eksizyon yolu ile alınmış 25 benign lezyon çalışmaya dahil edildi.

### **4.2. Örneklerin Toplanması ve Analize Hazırlanması**

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda arşiv taraması yapılarak 1998- 2006 yılları arasında üst solunum yolları malignitesi tanısı almış olan hastalar ile kontrol grubunu oluşturan benign lezyon tanılı hastalar tespit edildi. Bu hastalara ait tüm histolojik preparatlar mikroskop altında taranarak tümör dokusu ve normal doku içeren preparatlar ile bunlara ait parafin bloklar ayrıldı. Parafine gömülü dokulardan mikrotom ile 5- 10 µm kalınlığında 5- 6 adet kesit alınarak 1.5 ml'lik steril ependorf tüplerine konuldu. Elde edilen örnekler HPV yönünden incelenmek üzere Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na iletildi ve DNA izolasyonu yapıncaya kadar 4°C'de saklandı.

### **4.3. Kimyasal maddeler, sarf malzemeleri ve cihazlar**

DNA izolasyon kiti (AbsoGene, RTA Lab, Kocaeli, Türkiye), primerler (Iontek), deoksinukleotid trifosfat (dNTP) seti (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Metabion), MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), buffer (Fermentas), Taq DNA polimeraz (Fermentas), 50 ve 100

bç'lik DNA markeri (Heliosis), agaroz (Applichem, Germany), ethidium bromide, bromphenol blue, xylene cyanole, alkol (Scharlau ET 006, Germany), elektroforez aparatı (Consort E833, Belgium), elektroforez tankı, fotoğraf makinesi ( Polaroid, UK) ve fotoğraf filmi (Polaroid 667), ısı bloğu (Major Science MD- 02, Belgium), santrifüj cihazı (Hettich Zentrifugen Mikro 22R, Germany), PZR cihazı (AB Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, Singapour), 10- 100 ve 1000 µl pipetler (Medisis), ultraviyole transilluminatör (Vilber Lourmat, France), elektronik hassas terazi (Sartorius BÇ 410, Germany), hız ayarlı vortex (VELP Scientifica, Italy), spektrofotometre (LKB Biochrom Ultraspec Plus 4054 UV/visible spectrophotometer, Cambridge, England).

#### **4.4. Parafin Blok Kesitlerinden DNA İzolasyonu**

Tüm örneklerden, AbsoGene DNA izolasyon kiti ile (Kocaeli, Türkiye), üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA izolasyonu yapıldı.

İzolasyon protokolü şu şekilde uygulandı:

- 1- 5- 10 µm'lik kesitler halinde alınmış olan parafinize doku örnekleri 1.5 ml'lik nuclease-free mikrosantrifüj tüplerine (ependorf) alındı.
- 2- Üzerlerine 1 ml xylene eklenerek vorteks cihazında karıştırıldı ve parafinin uzaklaştırılması amacıyla 10 dakika boyunca oda ısısında sindirime bırakıldı.
- 3- Tüm ependorf tüpleri 3 dk boyunca 14000 rpm'de santrifüj edilerek supernatant ayrıldı.
- 4- Bu işlemler parafinin tamamen giderilmesi için 2- 3 kez tekrarlandı.
- 5- Ependorf tüplerine 1 ml % 96- 100' lük etanol eklenerek iyice karıştırıldı ve 14000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek supernatant atıldı.
- 6- 1 ml % 90 etanol eklenip karıştırıldı ve 14000 rpm'de 3 dk santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra supernatant atıldı.

- 7- 1 ml % 70 etanol eklenerek karıştırıldı ve 14000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek supernatant atıldı.
- 8- Ependorf tüpleri 10 dk oda ısısında bırakılarak pellet kurutuldu.
- 9- Üzerlerine 200 µl DL solüsyonu ve 20 µl proteinaz K eklenerek karıştırıldı.
- 10- 56°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon boyunca her 10 dk'da bir tüp karıştırılarak partikül kalmayınca kadar dokunun sindirilmesi sağlandı.
- 11- 250 µl solüsyon B eklenerek karıştırıldı.
- 12- Kısaca santrifüj yapılarak (10000 rpm'de 30 sn) 65°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- 13- Üzerlerine 200 µl % 96-100'lük etanol eklenerek karıştırıldı.
- 14- Kısaca santrifüj edilerek karışım kitle beraber verilen koleksiyon tüpündeki kolona transfer edildi.
- 15- 1 dk boyunca 10000 rpm'de santrifüj edilerek sıvının aktığı tüp atıldı ve kolon yeni bir koleksiyon tüpüne sıkıştırıldı.
- 16- Üzerlerine 700 µl W1 solüsyonu eklenerek 10000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Sıvının aktığı tüp atılarak kolon yeni bir koleksiyon tüpüne sıkıştırıldı.
- 17- 700 µl W2 solüsyonu eklenerek 10000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Sıvının aktığı tüp atılarak kolon yeni bir koleksiyon tüpüne sıkıştırıldı.
- 18- 14000 rpm'de 30 sn boyunca santrifüj edildi.
- 19- Kolon 1.5 ml'lik koleksiyon tüpüne transfer edildi.
- 20- 200 µl E solüsyonu eklendi ve 3 dk oda ısısında bekletildi.
- 21- 14000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj edildi.

22- Kolon atılarak mikrosantrifüj tüpü, içine akmış olan sıvı ile birlikte alındı. Genomik DNA içeren bu sıvı, kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

Bu işlemler bittikten sonra, DNA izolasyonunun ve PZR yönteminin kontrolü amacıyla, elde edilen total DNA’ların miktarı, önce spektrofotometrede OD280/OD260’da ölçüldü. Daha sonra elde edilen DNA’ların 10 kat sulandırılması dH<sub>2</sub>O’da gerçekleştirildi. Her bir sulandırma ve β-globin primerleri ile gerçekleştirilen PZR neticesinde PZR’nin deteksiyon limiti yaklaşık 10 hücrel DNA olarak tespit edildi.

#### 4.5. Oligonükleotidler (primerler)

Çalışmada Iontek firmasına sentezlettirilmiş olan oligonükleotidler (primerler) kullanıldı. Primerlerin nükleotid dizileri ve PZR ürün boyutları Tablo 5’te gösterilmiştir.

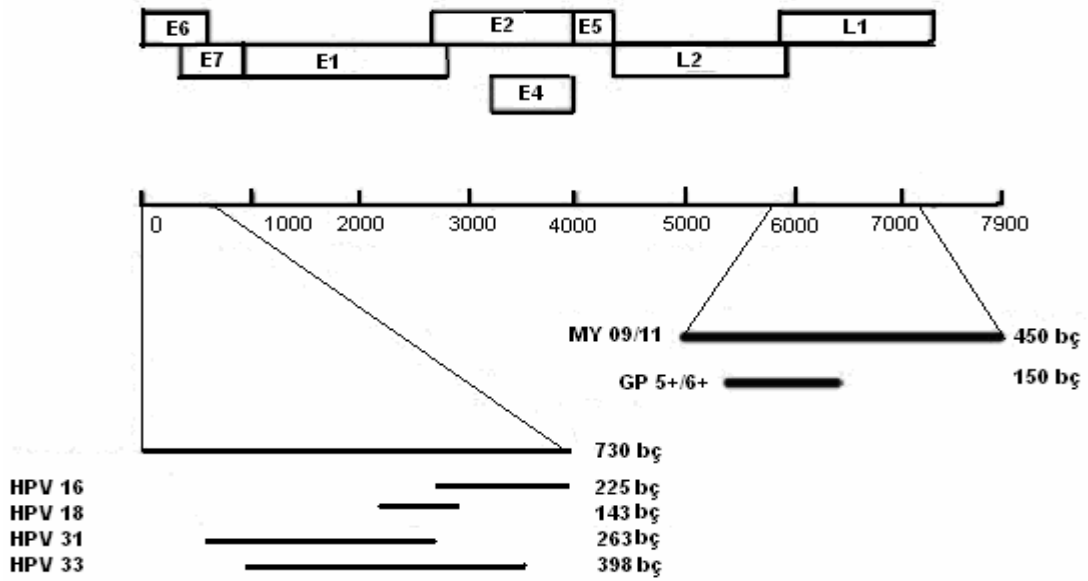
**Tablo 5.** Çalışmada kullanılan HPV primerleri (57, 58, 59).

	Primer adı	Primer sekansı (5’-3’)	PZR ürün boyutu (bp)
1	S-PCO4	gAA gAg CCA Agg ACA ggT AC	268
	S-GH20	CAA CTT CAT CCA CgT TCA CC	
2	MYO9	CgT CCM ARR ggA WAC TgA TC	450
	MY11	gCM CAg ggW CAT AAY AAT gg	
3	GP5+	TTT gTT ACT gTg gTA gAT ACT AC	143
	GP6+	gAA AAA TAA ACT gTA AAT CAT ATT	
4	HPV 16F	TCg ATg TAT gTC TTg TTg CAg	225
	HPV 16R	ggT TAC AAT ATT gTA ATg ggC	
5	HPV 18F	AAA CTA ACT AAC ACT ggg TTA TAC	143
	HPV 18R	ATg gCA CTg gCC TCT ATA gT	
6	HPV 31F	gAA ATT gCA TgA ACT AAg CTC g	263
	HPV 31R	CAC ATA TAC CTT TgT TTg TCA A	
7	HPV 33F	ACT ATA CAC AAC ATT gAA CTA	398
	HPV 33R	gTT TTT ACA CgT CAC AgT gCA	

(W:A ya da T, M: A ya da C, R: A ya da g) , (Y:C ya da T)

Şekil 8’de çalışmada kullanılan primerlerin HPV genomu üzerinde temsil ettikleri bölgeler şematize edilmiştir. Genomun L1 bölgesini kodlayan 450 bç’lik dışsal primer MYO9/MY11 ve 150 bç’lik içsel primer GP5+/GP6+ sağ tarafta gösterilmektedir.

Genomdaki yerlerine göre; E6 ve E7 proteinleri üzerinden seçilen 225 bç’lik HPV 16 505-729, 143 bç’lik HPV 18 378-521, 263 bç’lik HPV 31 137-399, 398 bç’lik HPV 33 172-569 arasında yer almakta ve şeklin sol alt kısmında gösterilmektedir.



Şekil 8. Çalışmada kullanılan primerlerin HPV genomundaki yerleri (57, 58, 59).

## 4.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

### 4.6.1. Beta- globin spesifik PZR:

Üst solunum yolları malignitesi tanılı 100 tümör dokusu ve 25 normal dokuya ait parafine gömülü doku kesitlerinden elde edilen DNA örnekleri için ilk olarak  $\beta$ - globin primerleri ile PZR kurularak hücresel DNA’nın varlığı ve DNA izolasyonunun başarısı

kontrol edildi. Çoğaltma için S-GH20 (5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3') ve S-PCO4 (5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3') primerleri kullanıldı (57). Polimeraz Zincir Reaksiyonu için, her bir tüpe örnek başına 5 µl MgCl<sub>2</sub>, 5 µl buffer, 4 µl dNTP (2.5 mM), her bir ileri (forward) ve geri (reverse) primerden 1 µl, 0.5 µl Taq DNA polimeraz ve 24.5 µl dH<sub>2</sub>O'dan oluşan PZR karışımı ve 10 µl template DNA konularak toplam 50 µl üzerinden PZR kuruldu. Tüpler cihaza yerleştirilerek ilk aşamada çift sarmal DNA moleküllerinin denatüre edilmesi amacıyla 94°C'de 4 dakikalık bir döngüye tabi tutuldu. Polimeraz Zincir Reaksiyonu işleminin ikinci aşaması ise sırasıyla 94°C'de 1 dakika ayrılma (denaturation, 56°C'de 1 dakika bağlanma (annealing), 72°C'de 1 dakika uzatma (elongation) olmak üzere 36 döngü üzerinden gerçekleştirildi. Otuzaltı siklusun sonunda nc aşama olan uzatma periyodu için 72°C'de 10 dakika tutuldu. Çoğaltma sonrası elde edilen 268 bç uzunluğundaki ürünler ethidium bromidli % 2'lik agaroz jelde yürütülerek elektroforezle ayırt edildi ve UV transilluminatör ile oluşan bantlar incelendi.

#### **4.6.2. HPV spesifik PZR**

Human papillomavirus tiplerine spesifik PZR kurulmadan önce, genel olarak hangi örneklerde HPV'nin olduğunun belirlenmesi amacıyla niversal MY09/MY11 primerleri kullanılarak PZR kuruldu. MY09/MY11 primerleri HPV genomunun L1 bölgesinin dışsal (outer) primerleri olarak değerlendirilmekte ve genomun 450 bç'lik bölümünü saptamaktadır. İçsel (inner) primer olan GP5+/GP6+ primerleri kullanılarak kurulan nested PCR'de ise, 1. PZR'de saptanan bu 450 b'lik bölümün iç kısmından bir parçanın 143 bç'lik olan bölümünün saptanması hedeflenmektedir. Kullanılan her iki primer de örneklerde HPV olup olmadığını belirlemeye yönelik niversal primerlerdir ve tüm HPV tiplerini saptayabilmektedirler.

MY/GP nested PCR için, ilk aşamada HPV genomunun L1 bölgesini araştırmaya yönelik L1 konsensus HPV primerleri MYO9 (5' CGT CC(A-C) GGA (A-T)AC TGA TC 3') / MY11 (5'GC(A-C) CAG GG(A-T) CAT AA(C-T) AAT GG 3') kullanıldı. Viral DNA'nın L1 bölgesini araştırmaya yönelik olan 450 baz çiftlik MYO9/MY11 primerleri ve 143 baz çiftlik GP5+/GP6+ primerleri, Sotlar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadan seçildi (57).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için, her bir tüpe örnek başına 5 µl MgCl<sub>2</sub>, 5 µl buffer, 4 µl dNTP (2.5 mM), her bir ileri ve geri primerden 1 µl, 0.5 µl Taq DNA polimeraz ve 24.5 µl dH<sub>2</sub>O'dan oluşan PZR karışımı ve 10 µl template DNA konularak toplam 50 µl üzerinden PZR kuruldu. Tüpler cihaza yerleştirilerek yukarıda anlatılan PZR şartları uygulandı.

Nested PCR aşamasında L1 konsensus HPV primerleri GP5+ (5' TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC 3') / GP6+ (5' GAA AAA TAA ACT GTA AAT ATT C 3') kullanıldı (57). Polimeraz Zincir Reaksiyonu için; her bir tüpe örnek başına 5 µl MgCl<sub>2</sub>, 5 µl buffer, 4 µl dNTP (2.5 mM), her bir ileri ve geri primerden 1 µl, 0.5 µl Taq DNA polimeraz ve 31.5 µl dH<sub>2</sub>O'dan oluşan PZR karışımı ve 2 µl template (1. PZR ürünü) konularak toplam 50 µl üzerinden PZR kuruldu. Tüpler cihaza yerleştirilerek yukarıda anlatılmış olan PZR şartları uygulandı ve beklenildiği gibi 143 bç 'lik ürünler elde edildi.

Çalışmanın her aşamasında pozitif ve negatif kontroller kullanıldı. Pozitif kontrol olarak laboratuvardaki rutin çalışmalarda, daha önce HPV 16/18 yönünden pozitif olduğu tespit edilen vajinal swap örneklerine ait DNA'lar kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise, hem DNA izolasyonu, hem de PZR aşamalarında steril DEPC'li (diethylpyrocarbonate) su (nuclease- free water) (Applichem, Germany) kullanıldı.



Tüm PZR çoğaltma ürünleri etidyum bromürlü % 2'lik agaroz jelde yürütülerek elektroforezle ayırt edildi ve UV transilluminatörde incelenerek oluşan bantlar görüldü. Human papillomavirus spesifik PZR sonucu elde edilen ve agaroz jelde 143 bp uzunluğunda DNA bandı gözlenen ürünlerde HPV infeksiyonu mevcuttur.

#### **4.6.3. HPV tiplendirme spesifik PZR:**

MY/GP nested PCR ile HPV pozitif tespit edilen tüm örneklerle HPV 16, 18, 31 ve 33 tiplerine ait primerler kullanılarak HPV tiplendirmesi yapıldı. HPV 16 primeri Ahn ve arkadaşlarının (58), HPV 18 primeri Soultzis ve arkadaşlarının (59), HPV 31 ve 33 primerleri ise Sotlar ve arkadaşlarının (57) yaptıkları çalışmalardan seçildi.

Human papillomavirus tiplendirmesi için; her bir tüpe örnek başına 5 µl MgCl<sub>2</sub>, 5 µl buffer, 4 µl dNTP (2.5 mM), her bir ileri ve geri primerden 1 µl, 0.5 µl Taq DNA polimeraz ve 24.5 µl dH<sub>2</sub>O'dan oluşan PZR karışımı ve 10 µl template DNA konularak toplam 50 µl üzerinden PZR kuruldu. Polimeraz Zincir Reaksiyonu şartları yukarıda anlatıldığı şekilde düzenlendi. Otuzaltı siklus sonrası çoğaltılan PZR ürünleri % 2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek UV transilluminatörde incelendi. HPV tiplerine özgü bant boyutlarına göre HPV tiplendirmesi yapılarak fotoğraflandı.

#### **4.7. PZR optimizasyonu:**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu denemelerinde optimum sonucun elde edilebilmesi için; siklularda, bağlanma ısılarında ve template DNA miktarlarında bazı değişiklikler yapıldı. 52°C, 56°C ve 58°C bağlanma ısıları denenerek yapılan PZR'lerde en iyi sonucun 56°C de saptandığı görüldü.

#### **4.8. Agaroz jel elektroforezi:**

Agaroz jelin yüzdesi DNA fragmanlarının beklenen baz ağırlıklarına göre belirlendi. % 2'lik agaroz jel hazırlamak için 2 gr agaroz tartılarak 100 ml TAE

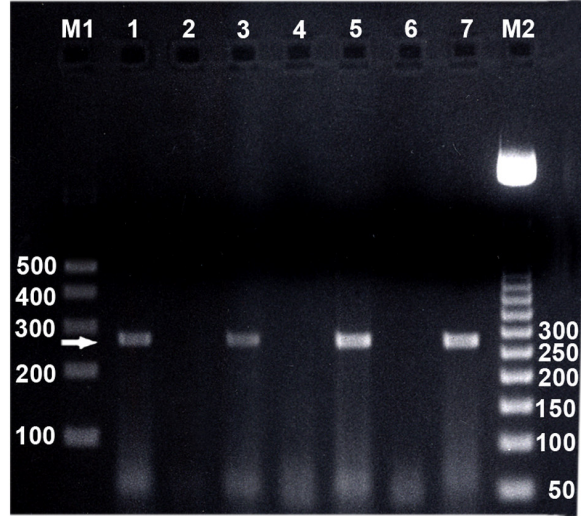
solüsyonunda kaynatılmak suretiyle eritildi. Bu solüsyonun stok şekli olan 50X tampon şu şekilde hazırlandı: 242 gr TRIS-base, 57.1 gr glacial asetik asit ve 100 ml 0.5 M EDTA (etilendinitrilotetraasetik asit, pH 8) 1 litre distile ve deiyonize suda çözüldü. Eriyen agaroz-TAE solüsyonu karışımı 60°C'ye soğutulduktan sonra, içine bantların ultraviyole ışık altında görünür hale gelmesini sağlamak için 15 µl ethidium bromide eklenerek iyice homojenize edildi. Sıvı halde olan jel, katılaşması için jel kalıbına döküldü.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ürünlerinden 10 µl alınıp 3 µl yükleme tamponu (bromphenol blue veya xylene cyanole) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Beklenen bant boyutlarının belirlenebilmesi amacıyla aynı jel üzerine 100 bp'lik DNA markeri de yüklendi. Jel sabit akımla çalışan elektroforez aparatı yardımıyla 15- 20 dk yürütüldü ve UV transilluminatör cihazı ile oluşan bantlar değerlendirilerek fotoğraflandı.

## 5. BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 100 hastanın 87'si erkek, 13'ü bayan idi. Hastaların yaşları 30- 82 arasında değişmekteydi. Tümörlerin 80 tanesi larinks, 8 tanesi oral kavite, 6 tanesi nazofarinks, 4 tanesi nazal kavite, 2 tanesi ise tonsil kanseri tanılarına sahipti.

S-GH20 ve S-PCO4 primerleri kullanılarak yapılan  $\beta$ -globin PZR'de malign lezyon tanılı 100 örneğin 75'i (% 75), sağlam doku örneklerinin ise 21'i (% 84)  $\beta$ -globin pozitif bulunmuştur. Bu değerler, parafin blok içindeki doku örneklerinden DNA izolasyonunun, kullanılan ekstraksiyon yöntemiyle ne oranda sağlıklı yapıldığını gösteren değerlerdir.  $\beta$ - globin negatif bulunan örnekler, yetersiz DNA içerdikleri veya hiç DNA içermedikleri düşünüldüğü için çalışmadan çıkarılmıştır. 268 baz çiftlik  $\beta$ -globin pozitif PZR ürünleri şekil 9'da gösterilmiştir.

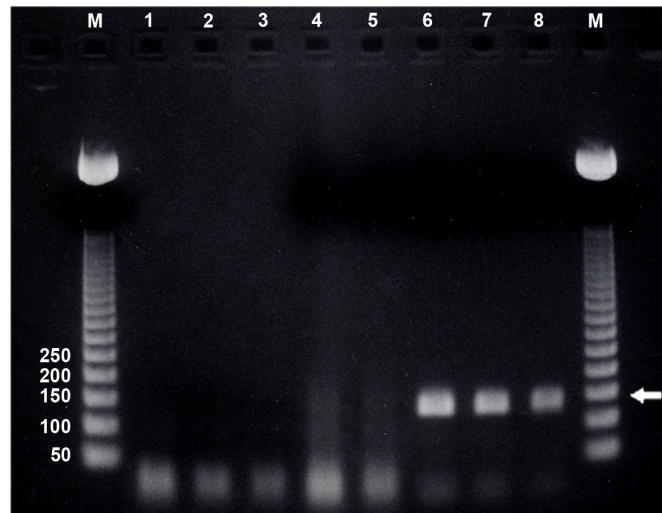


**Şekil 9.**  $\beta$ - globin pozitif PZR ürünleri (268 bç)

(M1: 100 bç'lik DNA markeri, 1, 3, 5, 7:  $\beta$ - globin + örnekler, 2: DNA izolasyonu negatif kontrol, 4, 6: PZR negatif kontroller, M2: 50 bç'lik DNA markeri)

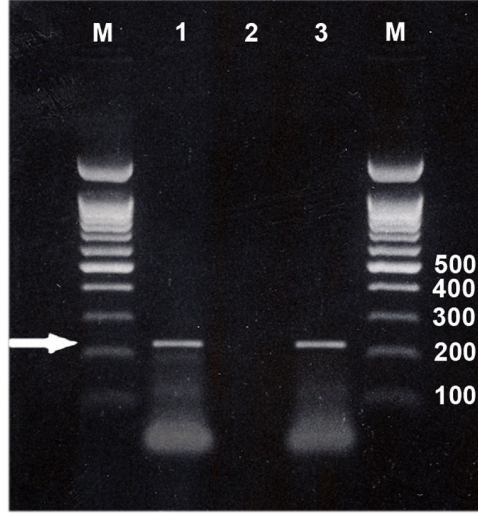
Human papillomavirus konsensus PZR için kullanılan MYO9/MY11 primerleri universal primerlerdir ve birçok farklı HPV tipinin hedef DNA'sına komplementerdir. GP5+/GP6+ primerleri ise L1 geninin MYO9-MY11 primerleri ile amplifiye edilen 450 bç'lik kısmının 143 bç'lik bölümünü çoğaltan primerlerdir. Orijinal GP5/GP6 primerlerinin 3' ucundan uzatılarak geliştirilen yeni versiyon GP5+/GP6+ primerleri GP5/GP6 primer sistemine oranla 10 kat daha sensitif bulunmuştur (26).

Çalışmamızda  $\beta$ - globin pozitif bulunan 75 malign örneğin 25 tanesi (% 33) ve 21 sağlam doku örneğinin 4 tanesi (% 19) genomun L1 bölgesine yönelik universal MYO9/MY11-GP5+/GP6+ oligonükleotidleri ile kurulan nested PCR sonrasında pozitif olarak bulunmuştur. Bu değerler, tümörlü dokuların % 33'ünde, kontrol grubunun ise % 19'unda tüm HPV tiplerine ait DNA bulunduğunu göstermektedir. 143 baz çifti ağırlığındaki GP5+/GP6+ pozitif PZR ürünleri şekil 10'da gösterilmiştir.

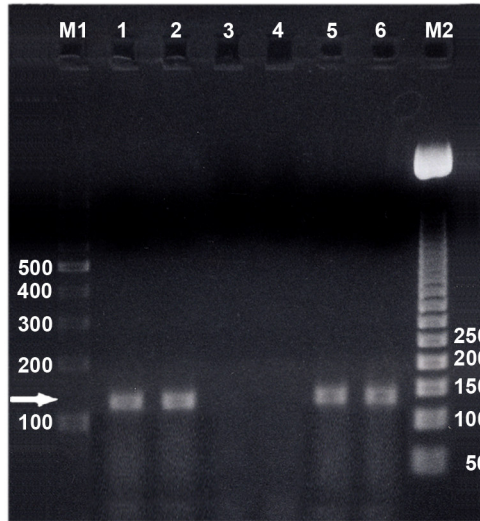


**Şekil 10.** MYO9/MY11- GP5+/GP6+ pozitif PZR ürünleri (143 bç)

(M: 50 bç'lik DNA markeri, 1: DNA izolasyonu negatif kontrol, 2-3: PZR negatif kontrol, 4-5: negatif örnek, 6, 7, 8: GP5+/GP6+ örnekler.)



**Şekil 11.** HPV 16 pozitif PZR ürünleri (225 bç)  
(M: 100 bç'lik DNA markeri, 1, 3: HPV 16 + örnekler, 2: PZR negatif kontrol)



**Şekil 12.** HPV 18 pozitif PZR ürünleri (143 bç)  
( M1: 100 bç'lik DNA markeri, 1, 2, 5, 6: HPV 18 + örnekler, 3: DNA izolasyonu negatif kontrol, 4: PZR negatif kontrol, M2: 50 bç'lik DNA markeri)

MYO9/MY11-GP5+/GP6+ pozitif örneklerden yapılan HPV tiplendirme spesifik PZR'de 25 malign örneğin 11'inde (% 44) HPV 16 DNA'sı, 8'inde (% 32) HPV 18

DNA'sı pozitif bulunurken, 4 sağlam doku örneğinin 1'inde (% 25) HPV 16 DNA, 1'inde de (% 25) HPV 18 DNA pozitifliği tespit edilmiştir.

Çalışmaya alınan 100 tümöral doku ve 25 sağlam doku örneğinin  $\beta$ - globin, MYO9/MY11-GP5+/GP6+ ve HPV DNA pozitiflik oranları tablo 6'da özetlenmiştir.

**Tablo 6.** HPV PZR pozitiflik oranları

	<u>TÜMÖRAL DOKU</u> (n: 100)	<u>KONTROL GRUBU</u> (n:25)
$\beta$ -GLOBİN	75 (% 75)	21 (% 84)
MYO9/MY11- GP5+/GP6+	25 (% 33)	4 (% 19)
HPV 16 DNA	11 (% 14.6)	1 (% 4.8)
HPV 18 DNA	8 (% 10.6)	1 (% 4.8)
HPV 16+ 18 DNA	1 (% 1.3)	—
HPV 31 DNA	—	—
HPV 33 DNA	—	—

Çalışmamızda, HPV DNA pozitif bulunan olgularda en fazla bulunan HPV tipi % 44'lük bir oranla HPV 16 (11/25) olurken, bunu % 32'lik bir oranla HPV 18 (8/25) izlemektedir.

Human papillomavirus tip 16 ve 18 birlikteliği HPV DNA pozitif olguların sadece 1 tanesinde (% 4) tespit edilirken, HPV 31 ve 33 olguların hiçbirisinde tespit edilememiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile HPV DNA tespit edilen ve edilmeyen olgular arasında yaş, cinsiyet ve tümör lokalizasyonu açısından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

## 6. TARTIŞMA

Anogenital ve servikal kanserlerin gelişiminde spesifik HPV tiplerinin varlığını araştırmak için çok sayıda epidemiyolojik, klinik, patolojik ve moleküler çalışma yapılmıştır ve günümüzde HPV'nin çoğu prekanseröz lezyonun ve servikal karsinomların patogeneğinde kritik rol oynadığı kabul edilmiştir (9, 60). Servikal lezyonlarda moleküler tekniklerin uygulanmaya başlanmasıyla birlikte, servikal kanser-HPV arasındaki ilişkinin anlaşılması, çok hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir (16).

Human papillomavirusun onkojenik potansiyele sahip bir virus olduğu ilk kez epidermodysplasia verruciformis (EV) tanısı almış olan hastalarda ortaya konulmuştur. Bu hastalarda spesifik HPV tipleri tarafından oluşturulan deri lezyonlarının güneşe maruz kalındığında malign transformasyona uğradığı görülmüştür (61, 62). Yüksek riskli HPV tipleri dünyanın her yerinde sıklıkla tespit edilmekle beraber, HPV 16 ve 18 tüm dünyada servikal kanserlerin en az % 70'inden sorumlu tutulmaktadır (63, 64). Serviks kanseri tanısı almış hastaların % 93'ünden fazlasında özellikle tip 16, 18, 31 ve 45 başta olmak üzere yüksek riskli HPV genotiplerine ait DNA tespit edilmiştir. Aynı HPV tipleri prekanseröz lezyonlar ve servikal intraepitelyal neoplazilerde de saptanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 1995 yılında yaptığı bir toplantıda epidemiyolojik ve biyolojik verilere dayanılarak en azından HPV 16 ve 18'in serviks kanserine yol açtığı kabul edilmiştir (65).

Yapılan pekçok çalışmada HPV ile anal epidermoid karsinom, vulva ve vajina kanserleri, penil epidermoid karsinomlar, özefagus ve akciğerin epidermoid karsinomları ve melanom dışı deri kanserleri gibi birçok kanser türü arasında da bağlantı kurulmuştur (66- 69).

Human papillomavirusun kadınlarda servikal kanser gelişimindeki patojenik rolü kesin olarak bilinmesine rağmen anogenital bölge dışındaki kanserlerdeki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. Epidemiyolojik çalışmalarda elde edilen bulgular ve laboratuvar kanıtları, tütün ve alkol kullanımı yanında, HPV'nin de baş ve boyun kanserlerinde etiyolojik bir ajan olabileceği yönünde güçlü sonuçlar vermektedir. Laringial skuamöz hücreli papillom ve rekürren respiratuar papillomatozisin HPV ile birlikteliği iyi bilinirken, HPV'nin laringial karsinomlardaki rolü hala tartışmalıdır (70).

Oral kavite ve orofarinks kanserleri, her yıl yaklaşık 500 000 yeni olgu ile dünyadaki önemli toplum sağlığı problemleri arasında yer alan, etiyojisinde tütün ve alkol kullanımı, beslenme yetersizlikleri ve kötü ağız hijyeninin suçlandığı 8. önemli malignite konumundadır (71). Alkol kullanımının mukozal yüzeyleri biyolojik olarak modifiye hale getirdiği, fonksiyonu bozulan mukozanın viral infeksiyonların yerleşme potansiyelini arttırdığı veya HPV'ye karşı immün cevabın bozulmasına yol açtığı düşünülmektedir (72).

Human papillomavirus ile oral kavite karsinogenezi arasındaki ilişki, sınırlı sayıda epidemiyolojik ve moleküler çalışma ile ortaya koyulmaya çalışılmış ve HPV'nin anogenital kanserlerin yanı sıra baş ve boyun kanserlerinde de rol oynadığı gösterilmiştir (4). Human papillomavirus baş ve boyun kanserleri içinde, orofarinks ve oral kavite kanserlerinde daha sık saptanmış, saptanan subtipler arasında da HPV 16 predominant tip olarak belirlenmiştir (4).

Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 45.000 yeni baş ve boyun kanseri olgusu ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (73). Tüm dünyada baş ve boyun kanseri insidansı yüksek olup özellikle Hindistan, Hong Kong ve Avrupa ülkelerinde en yüksek düzeydedir (74). Son yıllarda tedavideki ilerlemelere rağmen, ABD'nde 5



yıllık yaşam süresi % 55 civarında bildirilmektedir (75). Etiyolojik faktörler arasında sigara ve alkol kullanımı başta gelmektedir. Ancak baş ve boyun kanserli hastaların % 15-20'sinde tütün ve alkol kullanımı öyküsünün olmaması ve bu grubun özellikle genç erkek ve bayanlardan oluşması dikkat çekici bulunmuş ve son yıllarda çalışmalar olası bir etiyolojik faktör olan HPV üzerinde odaklanmıştır (76, 77).

Human papillomavirusun baş ve boyun kanserlerinde etiyolojik bir faktör olarak rol oynayabileceği ilk olarak rekürren juvenil respiratuar papillomatozis hastalığının invaziv epidermoid karsinoma dönüşebilmesinin anlaşılmasıyla ortaya konulmuştur (78). Çeşitli çalışmalarda tonsil, larinks, hipofarinks, dil ve nazofarinksin primer tümörlerinde ve epidermoid karsinoma dönüşen papillomlarda HPV DNA'sı gösterilmiştir (79- 82).

Baş ve boyun kanserleri ile HPV arasındaki ilişki, 1985 yılında Löning ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüş ve bu birliktelik kanıtlanmıştır (83). Human papillomavirusun laringial karsinomlar ile birliktelik gösterebileceği ihtimalinin farkına, ilk olarak larinks karsinomlarında HPV'nin tipik sitopatik bulgularının görülmesiyle varılmıştır (84). Farklı hibridizasyon teknikleri ve PZR kullanılarak kanserli dokularda HPV DNA'sının gösterilmesi, HPV'nin laringial kansere yol açabileceği görüşünün en güçlü kanıtıdır (70, 85). Sigaranın neden olmadığı laringial kanser vakalarında papillomavirus enfeksiyonu sıklığının yüksek bulunması, bu grup hastalarda gelişen kanserin etiyojisinde HPV enfeksiyonunun rol oynadığını düşündürmektedir (86).

Kreimer ve arkadaşları, 2005 yılında, PZR bazlı, baş ve boyun kanseri tanısı almış 5046 hastayı kapsayan yaklaşık 60 çalışmadan oluşan bir rapor sunmuşlar ve bu hasta grubunda HPV prevalansını % 25.9 olarak göstermişlerdir. Bu çalışmada HPV prevalansı oral (% 23.5) ve laringial (% 24) SCC'lere (squamous cell carcinoma) oranla

orofaringial SCC'lerde (% 35.6) daha yüksek bulunmuştur. En yaygın olarak saptanan HPV tipi, vakaların % 16.6'sında saptanmış olan HPV tip 16'dır. Ayrıca bu çalışmada, Kuzey Amerika'da yapılmış çalışmalarda HPV prevalansının Avrupa ve Asya ile kıyaslandığında daha yüksek bulunduğu da görülmüştür (87). Fakat bu evrensel araştırmanın içinde, Türkiye'yi temsil eden bir çalışma bulunmamaktadır.

Türk populasyonunda larinks karsinomlu hastalarda HPV sıklığını tespit etmek için PZR tekniği kullanılarak yapılmış ilk çalışma, 2006 yılında Güngör ve arkadaşlarının 99 hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmadır. Bu çalışmada HPV DNA prevalansı % 7.36 olarak saptanırken, tespit edilen HPV genotipleri tip 6, 11 ve 16'dır (88). Edirne'de 1998 yılında yapılan bir çalışmada in situ hibridizasyon tekniği ile larinksin papillomları, prekanseröz lezyonları ve kanserlerinde HPV DNA araştırılmış ve skuamöz hücreli karsinom olgularında HPV DNA pozitifliği % 69.2 olarak tespit edilmiştir (89). İstanbul'da 2001 yılında yapılmış olan diğer bir çalışmada ise 21 larinks ve 26 akciğer karsinomunda HPV DNA varlığı in situ hibridizasyon tekniği ile araştırılmış ve HPV DNA pozitiflik oranı sırasıyla % 47.6 ve % 11.5 olarak bulunmuştur (90).

Elazığ ilinde yapılan bu çalışmada 75 karsinom olgusunun 25'inde (%33) HPV DNA pozitifliği saptanmıştır. Pozitif bulunan örneklerin % 44'ünde HPV 16 DNA, % 32'sinde HPV 18 DNA saptanırken, örneklerin hiçbirinde HPV 31 ve HPV 33 DNA tespit edilememiştir.

Baş ve boyun kanseri tanısı almış 66 kişilik bir hasta grubunda PZR yöntemiyle yapılmış bir çalışmada, parafinize dokularla çalışılmış ve olguların % 36.4'ünde HPV DNA tespit edilmiştir. Human papillomavirus DNA % 50 tonsil karsinomunda (2/4), % 50 farinks karsinomunda (1/2) ve larinks karsinomunda (11/22) saptanmıştır (91).

Baş ve boyun kanserlerinde en yaygın tespit edilen HPV tipi, olguların % 90-95'inde gösterilmiş olan HPV 16'dır. Bu oran, birçok çalışmada yüksek onkojenik riskli olduğu bilinen HPV tip 16 üzerinde odaklanılmasına yol açmıştır. Human papillomavirus tip 16'yı, yine yüksek riskli HPV tipleri olan HPV 18, HPV 31 ve HPV 33 takip etmektedir (4, 92- 94). Baş ve boyun kanserli 61 hasta üzerinde yapılmış olan bir çalışmada HPV DNA bulunma sıklığı % 61 olarak tespit edilmiş, HPV DNA pozitif bu olguların % 84'ü HPV tip 16 olarak rapor edilmiştir (95). Oral kavite kanserli 1670 hastanın incelenmeye alındığı geniş kapsamlı bir çalışmada HPV DNA bulunma oranı % 18.3 olarak saptanırken, HPV DNA pozitif olguların % 94.7'sinin HPV 16 olduğu gösterilmiştir (4). Yine 2006 yılında Hobbs ve arkadaşlarının yaptıkları geniş kapsamlı bir çalışmada HPV 16 pozitiflik oranının baş ve boyun kanserlerinde % 0-86, kontrol grubunda ise % 0-38 arasında değiştiği gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca HPV tip 16 pozitifliğinin anatomik bölge olarak en sık tonsil karsinomunda, orta düzeyde orofarinkste, en az olarak da larinkste saptandığı rapor edilmiştir (96). Çalışmamızda HPV DNA pozitif bulunan 25 örneğin 11'i (% 44) HPV 16, 8'i (% 32) HPV 18, 1'i (% 4) HPV 16 ve 18 yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, literatürdeki bilgilerle uyumlu bulunmuştur.

Human papillomavirusun baş ve boyun kanserleri içinde özellikle oral kavite ve orofarinks kanserleri üzerindeki prognostik etkisini araştırmak için çok çeşitli çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalardan farklı sonuçlar alınmıştır. Bazı araştırmacılar HPV'nin eşlik ettiği baş ve boyun kanserlerinde prognozun HPV tespit edilemeyen olgulara kıyasla daha iyi olduğu sonucuna varmışlardır ( 76, 93, 97- 99). Bazı araştırmacılar HPV ile orofarinks kanserleri prognozu arasında az bir ilişki bulmuş (81), bazıları ise HPV'nin prognoza etkisinin bulunmadığı görüşüne varmıştır (100, 101).

Human papillomavirusun oral lezyonlarla bağlantısının araştırıldığı geniş bir çalışmada, normal mukoza örneklerinin % 13.5'inde ve skuamöz karsinom olgularının % 26.2'sinde HPV DNA tespit edilmiş ve bu çalışmada görev alan araştırmacılar, taze dokularda parafinize dokulara oranla daha fazla HPV DNA tespit edildiğini belirtmişlerdir (102). Çalışmamız parafinli dokular yerine taze dokular kullanılarak yapılmış olsaydı, daha yüksek HPV DNA pozitiflik oranları bulunabilirdi. Çünkü parafinize dokularda doku kalitesinin taze dokulara kıyasla daha düşük olduğu kabul edilmektedir (95).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile yapılmış çeşitli çalışmalarda üst solunum yolları karsinomlarında HPV DNA saptanma oranları % 0- 100 arasında değişmektedir (103-106). Örnek toplama yöntemleri, analiz edilecek olan tümöral dokunun kökeni ve anatomik lokalizasyonu (oral, orofaringial, tonsiller, laringial ), viral DNA'yı ortaya çıkarmak için kullanılan teknikler, primer farklılıkları, PZR çoğaltma ürünlerinin uzunlukları ve genomik lokalizasyonları ve PZR şartları bu heterojenitenin başlıca sebepleridir (107, 108). Ayrıca bazı baş ve boyun kanseri tiplerinde, HPV tespitinde coğrafik dağılım farklılıkları gözlenmektedir. Örneğin özefagus karsinomunda HPV sıklığı Çin'de (109, 110) Amerika ve Avrupa'dakine (111, 112) kıyasla daha fazla bulunmuştur.

Baş ve boyun kanserlerinde HPV DNA prevalansının araştırılması için yapılmış olan çalışmalarda elde edilmiş olan farklı sonuçlar, birçok nedene bağlanabilmektedir. Kullanılan yöntemlerin duyarlılıklarındaki farklılıklar da bu sebeplerden biri olabilmektedir. Dokuda HPV DNA tespiti için; hibridizasyon teknikleri ve çoğaltma deneyleri gibi yöntemler bulunmaktadır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu, epidemiyolojik ve moleküler çalışmalarda, duyarlı, hızlı ve ucuz bir metod olması sebebiyle, tüm

dünyada kabul gören bir tanı metodu olmuştur (113, 114). Verrüköz larinks karsinomlu hastalarda yapılmış olan bir çalışmada in situ hibridizasyon ile HPV DNA tespit edilememişken, olguların % 85'i PZR ile pozitif bulunmuştur (115). Baş ve boyun kanserli hastalarda HPV DNA tespiti için yapılan bir başka çalışmada, PZR ile olguların % 34.5'i, in situ hibridizasyon ile % 15.8'i, Southern Blot ile % 24.5'i HPV DNA pozitif bulunmuştur (116). Aynı şekilde Southern Blot ile PZR yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, oral kavite kanseri olan 39 hastada Southern Blot ile sadece 2 hastada HPV 16 ve 18 DNA pozitifliği saptanırken PZR ile 18 hastada HPV 16 ve 18 DNA pozitifliği saptanmıştır (117). Bu çalışma, iki yöntem arasındaki duyarlılık farkını açık bir şekilde ortaya koymaktadır. İmmünohistokimyasal yöntemler ise produktif viral enfeksiyonları gösterebilirken latent enfeksiyonları göstermede yetersiz kalmaktadır. Bu tezde yöntem olarak PZR'nin kullanılmasının sebebi, duyarlılığının yüksek olması ve örneklerdeki HPV pozitifliğini daha yüksek oranda saptayabilmesidir.

Bildirilen sonuçlar arasındaki bu farklılıklar yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçlardan da kaynaklanabilmektedir. Yalancı pozitiflikler, parafinize dokulardan kesit alınması aşamasında, DNA izolasyonu sırasında veya çoğaltma esnasında meydana gelen kontaminasyondan kaynaklanabilirken, yalancı negatifliklerin en büyük sebebi uzun süre saklanmış olan parafin bloklardaki doku kalitesinin bozulması ve DNA'nın kaybıdır (118, 119). Çalışmamızda HPV 31 ve 33 bulamama sebebimiz, arşivlenmiş parafinize bloklardaki doku kalitesinin bozulmuş olmasından kaynaklanan yalancı negatiflik veya coğrafik dağılım farklılıkları olabilir. Ayrıca hit- and- run (vur- kaç) teorisine göre viral DNA hücresel transformasyonun sadece ilk aşamalarında saptanabilir (120). Virus, hücreye entegre olup transformasyon yaptıktan ve malign fenotip ortaya çıktıktan sonra virus DNA'sı kaybolur. Karsinogenez hücresel

onkogenlerle devam eder. Bu durumda özellikle ileri evre karsinomlarda, incelenecek olan dokuda çok az miktarda HPV DNA saptanması sözkonusu olabilir (121).

Human papillomavirusun yol açtığı benign lezyonlarda viral DNA hücrelerde genellikle sirküler form olan epizomal halde bulunur. Buna karşın yüksek dereceli servikal intraepitelyal neoplazilerde ve ileri evre kanserlerde konak DNA'sına entegre haldedir. HPV DNA, aynı hücrede hem epizomal, hem entegre halde bulunabilir. Viral genomda entegrasyon genellikle E1 geninin 3' ucu ile E2 geninin 5' ucu arasında olmaktadır. Bu entegrasyon sırasında özellikle E2 ORF' de bozulma ve inaktivasyon meydana gelebilmektedir (2).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun, herhangi bir örnekte HPV DNA tespitinin yapılabilmesi için kullanılmakta olan en hassas yöntem olduğu bilinmektedir (122). Human papillomavirus DNA'sı sekanslarını çoğaltmak için geliştirilmiş olan universal primerler; genomun L1 bölgesi (MYO9/MY11, GP5/GP6), E1 bölgesi, E6 bölgesi ve E7 bölgesine göre düzenlenmiştir (123- 127). Ayrıca HPV tiplerine özgül konsensus primerlerin kullanımıyla da birçok HPV tipi yüksek oranda tanımlanabilmektedir. Human papillomavirus tiplerine özgül E6 ve E7 konsensus primerleri ile L1 konsensus primerlerinin karşılaştırılması amacıyla 1990 yılında bir çalışma yapılmış ve tanısal anlamda aralarında herhangi bir fark bulunmamıştır (128).

Human papillomavirus DNA'sının PZR yöntemiyle araştırıldığı birçok çalışma, genomun 450 baz çiftlik L1 bölgesini çoğaltan MYO9/MY11 primerleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Cruz ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, genomun L1 ve L2 bölgelerini kodlayan primerlerin yalancı negatif sonuçlara yol açabileceği öne sürülmüştür. Çünkü L1 ve L2 bölgeleri, HPV genomunun konak hücreye entegrasyonu sırasında en fazla bozulmaya uğrayan bölgelerdir (129). Aynı şekilde entegrasyon E1 ve

E2 arasında olduğu için bu bölgelere yönelik primerler ile yapılan çalışmalarda da yalancı negatiflik oranları yüksek olabilmekte ve gerçek HPV prevalansı saptanamayabilmektedir (129). Çalışmamızda kullanılan primerlerden MYO9/MY11 ve GP5+/GP6+ primerleri de genomun L1 bölgesini çoğalttıkları için sonuçlarımızın bölgemizdeki gerçek HPV prevalansını yansıtamaması sözkonusu olabilir.

Human papillomavirusun üst solunum yolları malign lezyonlarıyla ilişkisi, anogenital kanserler ile olduğu kadar kuvvetli olmasa da, bulgularımız HPV'nin üst solunum yolları kanserlerinde bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Human papillomavirus enfeksiyonlarının azaltılmasını sağlayacak koruyucu stratejilerle üst solunum yolları karsinomlarının sıklığında düşüş meydana gelecektir. Ayrıca karsinomların erken teşhisi için geliştirilecek tarama yöntemleri sayesinde onkojenik HPV tipleri erkenden saptanarak gerekli antiviral tedavinin başlatılması ve kanser progresyonunun durdurulması gibi önlemler alınabilecektir. Son zamanlarda servikal kanser tarama çalışmalarında HPV'nin araştırıldığı, HPV'nin tedaviye yön verici ve prognostik bir faktör olduğu düşünülürse, oral kavite kanserlerinde oral pap smear yapılmasının erken teşhise ve tedaviye katkı sağlayacağı açıktır.

Hasta sayısı daha yüksek tutularak yapılacak olan araştırmalar, ülkemizde üst solunum yolları kanserlerinde HPV sıklığını ortaya koyma fırsatı sunacak ve epidemiyolojik anlamda katkı sağlayacaktır. Human papillomavirus enfeksiyonları ile üst solunum yolları kanserleri arasındaki ilişkiyi saptamaya yönelik olarak yapılacak moleküler çalışmalar, virusun malign dokulardaki fiziksel durumunun ve karsinogenezdeki potansiyel rolünün daha iyi anlaşılmasını sağlayacak ve güncel tedavi stratejileri geliştirilmesine önayak olacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Chan SY, Delius H, Halpem AI, Bernard HU. Analysis of genome sequences of 95 human papillomavirus types: uniting typing filogeny and taxonomy. *J Virol* 1995; 69: 3074- 3083.
2. zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288: 55- 78.
3. Ferris RL, Martinez I, Sirianni N, Wang J, Albaitero AL, Gollin SM, et al. Human papillomavirus -16 associated squamous cell carcinoma of the head and neck: A natural disease model provides insights into viral carcinogenesis. *Eur J Cancer* 2005; 41: 807- 815.
4. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1772- 1783.
5. Lazzari CM, Krug LP, Quadros OF, Baldi CB, Bozzetti MC. Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 260- 265.
6. Hoffman M. HPV in head and neck cancer. *Cancer Lett* 2005; 218: 199- 206.
7. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M (editörler). Papovaviruslar. *Asya Mikrobiyoloji*. 4. Baskı, İzmir: Asya Tıp Kitabevi, 2005; 327- 332.
8. Turazza E, Lapena A, Sprovieri O, Torres CP, Gurucharri C, Maciel A, et al. Low risk human papillomavirus types 6 and 11 associated with carcinomas of the genital and upper aero- digestive tract. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76: 271- 276.



9. International Agency Cancer Research. Human papillomaviruses. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 64. Lyon: IARC; 1995. p:407.
10. Aaçfidan A. Cinsel Yolla Bulaşan Viruslar. Ustaçelebi Ő, Abacıoğlu H, Badur S (editörler). Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji.1. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2004: 285- 292.
11. Yarkın F. Human papillomavirus: patogenez ve immunité. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı, 2006:234- 236.
12. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol 2005; 32S:1- 6.
13. DeVilliers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology 2004; 324: 17- 27.
14. Kubar A. Papillomavirusların genel özellikleri. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı, 2006: 231- 233.
15. Tuncer S. İnsan Papillomavirusları. Ustaçelebi Ő (editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.1. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 797- 802.
16. Wright TC, Kurman RJ, Ferenczy A. Precancerous lesions of the cervix. Kurman RJ, TeLinde RW (editors). Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. Fifth edition, USA, New York: Springer- Verlag, 2002.
17. Anonim. (2006). HPV particle. Erişim: <http://www.merckmedicus.com/pp/us/hcp/diseasemodules/hpvd/html>. Erişim tarihi: 19.08.2007.
18. Anonim. (2005). Electron micrograph of HPV particle. Erişim: <http://www.virology-online.com/viruses/papillomaviruses.html>. Erişim tarihi: 19.08.2007.

19. Bekkers RL, Massuger LF, Bulten J, Melchers WJ. Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev Med Virol* 2004; 14: 95- 105.
20. Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002; 16: 231- 240.
21. Tyring SK. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis and host immun response. *J Am Acad Dermatol* 2000, 43: 18- 26.
22. Anonim. (2007). Three-dimensional model of human papillomavirus. Erişim: <http://www.biosci.ohio.edu/papilloma/virology>. Erişim tarihi: 19.08.2007.
23. Anonim. (2007). HPV genome. Erişim: [http://www.microbiologybytes.com/virology/3035\\_pics/papova5.jpg](http://www.microbiologybytes.com/virology/3035_pics/papova5.jpg) Erişim Tarihi: 19.08.2007.
24. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 2006; 24: 16- 22.
25. Goncalves MA, Donadi EA. Immune cellular response to HPV: current concepts. *Braz J Infect Dis* 2004; 8: 1- 9.
26. Yarkın F. Human papillomavirus: patogenezi, epidemiyoloji ve tanı. II. Ulusal Viroloji Kongresi Kitabı, 2005: 20- 31.
27. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 32: 7- 15.
28. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68: 362- 372.
29. Anonim (2005). Replication of HPV. Erişim: [http://www.ginekolog.pl/mod/archiwum/6525/infekcja\\_hpv.html](http://www.ginekolog.pl/mod/archiwum/6525/infekcja_hpv.html). Erişim Tarihi: 19.08.2007
30. Koufmann J, Burke AJ. The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am* 1997; 30: 1- 19.

31. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977; 78: 1- 30.
32. Anonim. (2006). Cervical cancer and HPV. Erişim: <http://www.nature.com/mc/journal/v7/n1/images/nrc2050-F1.html>. Erişim Tarihi: 19.08.2007
33. Li J, Hanna BA. Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. Tekeli A, Ustaçelebi ř (çevirenler). 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2006.
34. Iftner T, Villa LL. Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 80- 88.
35. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 940- 945.
36. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32: 16- 24.
37. Bonnez W, Reichman RC. Papillomaviruses in Mandell D, and Bennet's eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone Volume II, Chapter 133. 2000; 1630- 1645.
38. Praetius F. HPV associated diseases of oral mucosa. *Clin Dermatol* 1997; 15: 399- 413.
39. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 102: 3- 8.
40. May J. HPV vaccination: A paradigm shift in public health. *Australian Family Physician* 2007; 36: 106- 111.
41. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796- 802.

42. Vardar MA. Human papillomavirus infeksiyonlarında klinik tedavi ve korunma. II. Ulusal Viroloji Kongresi Kitabı, 2005: 32.
43. Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant of HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly HPV virion-like particles. *Virology* 1991; 185: 251- 257.
44. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1280-1284.
45. Brown DR, Bryan JT, Schroeder JM, Robinson TS, Fife KH, Wheeler CM, et al. Neutralization of human papillomavirus type 11 by sera from women vaccinated with yeast-derived HPV- 11 L1 virus-like particles: correlation with competitive radioimmunoassay titer. *J Infect Dis* 2001; 184:1183- 1186.
46. Evans TG, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Demeter L, Suzich JA, et al. A phase I study of a recombinant virus like particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J Infect Dis* 2001; 183: 1485- 1493.
47. Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 284- 292.
48. Emeny RT, Wheeler CM, Jansen KU, Hunt WC, Fu TM, Smith JF, et al. Priming of human papillomavirus type 11-specific humoral and cellular responses in college-age women with a virus-like particle vaccine. *J Virol* 2002; 76: 7832- 7842.

49. Pagliusi SR, Aguado MT. Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. *Vaccine* 2004; 23: 569- 578.
50. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, et al. A controlled trial of human papillomavirus type 16 vaccine. *New Engl J Med* 2002; 347: 1645- 1651.
51. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. Efficacy of a bivalent L1 like particle in prevention of infection with human papillomavirus type 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 1757- 1765.
52. Dupuy C, Buzoni DG, Touze A, LeCann P, Bout D, Coursaget P. Cell mediated immunity induced in mice by HPV 16 L1 virus-like particles. *Microb Pathog* 1997; 22: 219- 225.
53. Goldie SJ, Grima D, Kohli M, Wright TC, Weinstein M, Franco E, et al. A comprehensive natural history model of HPV infection and cervical cancer to estimate the clinic impact of a prophylactic HPV 16/18 vaccine. *Int J Cancer* 2003; 106: 896- 904.
54. Barr E. Gardasil- Quadrivalent HPV (Types 6, 11, 16 18) L1 VLP Vaccine. Presented at: the Advisory Committee on Immunization Practices, U.S. Centers for Disease Control and Prevention, October 27, 2005; Atlanta, GA.
55. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 2005; 6: 271- 278.

56. Ustaçelebi Ş. İnsan papillomavirus aşısı. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı, 2006: 237- 242.
57. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, et al. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. J Clin Microbiol 2004; 42: 3176- 3184.
58. Ahn WS, Bae SM, Chung JE, Lee HK, Kim BK, Lee JM, et al. Evaluation of adenoassociated virus 2 and human papillomavirus 16 and 18 infection in cervical cancer biopsies. Gynecologic Oncology 2003; 89: 105- 111.
59. Soultzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. Cancer Lett 2002; 179: 175- 183.
60. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiologic evidence. J Clin Virol 2000; 19: 1- 5.
61. Orth G, Jablonska S, Jarzabek CM, Obalek S, Rzesza G, Favre M, et al. Characteristics of the lesions and risk of malignant conversion associated with the type of human papillomavirus involved in epidermodysplasia verruciformis. Cancer Res 1979; 39: 1074- 1082.
62. Majewski S, Jablanska S. Epidermodysplasia verruciformis as a model of human papillomavirus induced genetic cancer of the skin. Arch Dermatol 1995; 131: 1312- 1318.
63. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated With Cervical Cancer. N Engl J Med 2003; 348: 518- 522.

64. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta analysis. *Br J Cancer* 2003; 89: 101- 105.
65. Anon. Human Papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1995; 94: 1- 37.
66. De Villiers EM. Human papillomavirus infections in skin cancers. *Biomed Pharmacother* 1998; 52: 26- 33.
67. Franco EL. Epidemiology of anogenital warts and cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996; 23: 597- 623.
68. Lavergne D, de Villiers EM. Papillomavirus in esophageal papillomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1999; 80: 681- 684.
69. Melby M, Frisch M. The role of human papillomaviruses in anogenital cancers. *Semin Cancer Biol* 1998; 8: 313- 317.
70. Syrjanen S. Human papillomavirus in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005; 32: 59- 66.
71. Gillison ML, Lowy DR. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *The Lancet* 2004; 363: 1488- 1489.
72. Molina PE, McClain C, Valla D, Guidot D, Diehl AM, Lang CH, et al. Molecular pathology and clinical aspects of alcohol- induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 120- 128.
73. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *Globocan 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalance Worldwide*. IARC Cancerbase No.5, 2001 edition, Vol 2001. Lyon, France: IARC Pres, 2000.

74. Sankarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S. Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res* 1998; 18: 4779- 4786.
75. Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF, Robinson RA, Menck HR. The national cancer database report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124: 951- 962.
76. Koch WM, Lango M, Sewell D, Zahurak M, Sidransky D. Head and neck cancer in non smokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope* 1999; 109: 1544- 1551.
77. Mendez P, Maves MD, Panje WR. Squamous cell carcinoma of the head and neck in patients under 40 years of age. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1985; 111: 762- 764.
78. Mounts P, Shah KV, Kashima H. Respiratory papillomatosis: etiological relation to genital tract papillomaviruses. *Prog Med Virol* 1984; 29: 90- 114.
79. Paz B, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus in head and neck cancer. *Cancer* 1997; 79: 595- 604.
80. Snijders PJF, Cromme FV, Van den Brule AJC, Schrijnemakers HJF, Snow GB, Wallboomers JMM. Prevalance and expression of human papillomavirus in tonsillar carcinomas: indicating a possible viral etiology. *Int J Cancer* 1992; 51: 845- 850.
81. Clayman GL, Stewart MG, Weber RS, El-Naggar AK, Grimm EA. Human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas: relationship to survival. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120: 743- 748.



82. Kashima HK, Kutcher M, Kesis T, Levin LS, de Villiers EM, Shah K. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus and clinically normal epithelium of the oral cavity. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990; 99: 55- 61.
83. Löning T, Ikenberg H, Becker J, Gissman L, Hoepfer I, zur Hausen H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J Investig Dermatol* 1985; 84: 417- 420.
84. Syrjanen K, Syrjanen S, Pyrhonen S. HPV antigens in lesions of laryngeal squamous cell carcinomas. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1982; 44: 323- 334.
85. Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001; 344: 1125- 1131.
86. Fouret P, Monceaux G, Temam S, Lacourreye L, StGuily JL. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in non-smokers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123: 513- 516.
87. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Bio-markers Prev* 2005; 14: 467- 475.
88. Gungor A, Cincik H, Baloglu H, Cekin E, Dogru S, Dursun E. Human papillomavirus prevalence in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol* 2007; 8: 1- 3.

89. Yalçın Ö, Bilgi S, Candan L, Kutlu K. Larinksin papillomları, prekanseröz lezyonları ve kanserlerinde in situ hibridizasyon tekniğiyle HPV DNA pozitifliğinin saptanması. *Patoloji Bülteni* 1998; 15: 5- 9.
90. Kaya H, Kotiloğlu E, Inanlı S, Ekicioğlu G, Bozkurt SU, Tutkun A, Küllü S. Prevalence of human papillomavirus DNA in larynx and lung carcinomas. *Pathologica* 2001; 93: 531- 534.
91. Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante ML. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/ pathological parameters. *Anticancer Res* 2000; 20: 1301- 1305.
92. Ringstrom E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3187- 3192.
93. Schwartz SR, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell carcinoma: a population based study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 125: 1- 9.
94. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004; 108: 766- 772.
95. Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I, Makitie A, Back L, Kontio R, et al. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 2003; 107: 401- 406.

96. Hobbs CGL, Sterne JAC, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006; 31: 259- 266.
97. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709- 720.
98. Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D, et al. Human papillomavirus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 755- 762.
99. Ritchie MJ, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 2003; 104: 336- 344.
100. Pintos J, Franco EL, Black MJ, Bergeron J, Arella M. Human papillomavirus and prognoses of patients with cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer* 1999; 85: 1903- 1909.
101. Riethdorf S, Friedrich RE, Ostwald C, Barten M, Gogacz P, Gundlach KKH, et al. p53 gene mutations and HPV infection in primary head and neck squamous cell carcinomas do not correlate with overall survival: a long term follow-up study. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 315- 321.
102. Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa premalignant conditions and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 82: 57- 68.

103. Zeuss MS, Miller CS, White DK. In situ hybridisation analysis of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 714- 720.
104. Miguel RE, Villa LL, Cordeiro AC, Sobrinho JS, Kowalski LP. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. *Am J Surg* 1998; 176: 428- 429.
105. Hobbs CGL, Birchall MA. Human papillomavirus infection in the aetiology of laryngeal carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 12: 88- 92.
106. Uobe K, Masuno K, Fang YR, Li LJ, Wen YM, Ueda Y, et al. Detection of HPV in Japanese and Chinese oral carcinomas by in situ PCR. *Oral Oncol* 2001; 37: 146- 152.
107. Lindeberg H, Krogdahl A. Laryngeal cancer and human papillomavirus: HPV is absent in the majority of laryngeal carcinomas. *Cancer Lett* 1999; 146: 9- 13.
108. Snijders PJF, Van den Brule AJC, Meijer CJLM, Walboomers JMM. Papillomaviruses and cancer of the upper digestive and respiratory tracts. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186: 177- 198.
109. Chen B, Yin H, Dhurandhar N. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal squamous cell carcinomas by the polymerase chain reaction using general konsensusprimers. *Hum Pathol* 1994; 25: 920- 923.
110. Chang F, Syrjanen S, Shen Q, Ji H, Syrjanen K. HPV DNA in esophageal precancer lesions and squamous cell carcinomas from China. *Int J Cancer* 1990; 45: 21- 25.

111. Smits HL, Tjong-A-Hung SP, ter Schegget J, Nooter K, Kok T. Absence of human papillomavirus DNA from esophageal carcinoma as determined by multiple broad spectrum polymerase chain reactions. *J Med Virol* 1995; 46: 213- 215.
112. Brandsma JL, Abramson AL. Association of papillomavirus with cancers of head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989; 115: 621- 625.
113. Jimenez C, Correnti M, Salma N, Cavazza ME, Perrone M. Detection of human papillomavirus DNA in benign oral squamous epithelial lesions in Venezuela. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 385-388.
114. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32: 43- 51.
115. Kasberbauer JL, O'Halloran GL, Espy MJ, Smith TF, Lewis JE. Polymerase chain reaction (PCR) identification of human papillomavirus (HPV) DNA in verrucous carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 1993; 103: 416- 420.
116. McKaig RG, Baris RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck* 1998; 20: 250- 265.
117. Yeudall WA, Campo MS. Human papillomavirus DNA in biopsies of oral tissues. *J Gen Virol* 1991; 72: 173- 176.
118. Brandwein MS, Nuovo GJ, Biller H. Analysis of prevalence of human papillomavirus in laryngeal carcinomas. Study of 40 cases using polymerase chain reaction and consensus primers. *Ann Oto Rhinol Laryngol* 1993; 102:309- 313.

119. Karlsen F, Kalantari M, Chitemerere M, Johansson B, Hagmar B. Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab Invest* 1994; 71: 604- 611.
120. Galloway DA, McDougall JK. The oncogenic potential of herpes simplex viruses: Evidence for a hit-and-run mechanism. *Nature* 1983; 302: 21- 24.
121. Atula S, Grenman R, Kujari H, Syrjanen S. Detection of human papillomavirus in laryngeal carcinoma cell lines provides evidence for a heterogenic cell population. *Eur J Cancer* 1999; 35: 825- 832.
122. Schibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papillomavirus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1988; 167: 225- 230.
123. Snijders PJF, Meijer CJ, Wallboomers JM. Degenerate primers based on highly conserved regions of amino acid sequence in papillomaviruses can be used in a generalized polymerase chain reaction to detect productive human papillomavirus infection. *J Gen Virol* 1991; 72: 2781- 2786.
124. Gregoire L, Arella M, Campione PJ, Lancaster WD. Amplification of human papillomavirus DNA sequences by using conserved primers. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2660- 2665.
125. Tieben LM, ter Schegget J, Minnaar RP, Bouwes JN, Berkhout RJ, Vermeer BJ, et al. Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *J Virol Methods* 1993; 42: 265- 279.
126. Maitland NJ, Bromidge T, Cox MF, Crane IJ, Prime SS, Scully C. Detection of human papillomavirus genes in human oral tissue biopsies and cultures by polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1989; 59: 698- 703.

127. Evander M, Wadell G. A general primer pair for amplification and detection of genital human papillomavirus types. *J Virol Methods* 1991; 31: 239- 250.
128. Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK, Eichinger GH, Fox HS, ter Schegget J, et al. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1477- 1484.
129. Cruz IB, Snijders PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Wallboomers JM, et al. Age- dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996; 32: 55- 62.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Elazığ ilinin Karakoçan ilçesinde doğdum. İlköğretimimi Elazığ Namık Kemal İlkokulu, ortaokul eğitimimi Elazığ Anadolu Lisesi, lise eğitimimi Diyarbakır Fen Lisesi ve Elazığ Atatürk Lisesi'nde aldım. 1993- 1999 yılları arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde öğrenim gördüm. 1999- 2003 yılları arasında Tunceli Sağlık Eğitim Merkezi'nde pratisyen hekim olarak görev yaptım. 2003 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım.