

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**UTERİN SERVİKAL KANSER ÖRNEKLERİNDE
PYROSEQUENCİNG YÖNTEMİ İLE HUMAN PAPİLLOMAVİRUS
(HPV) GENOTİPLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Mesut BELHAN

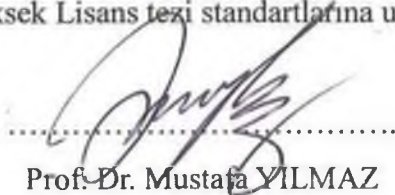
**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Yasemin BULUT**

ELAZIĞ-2014

ONAY SAYFASI

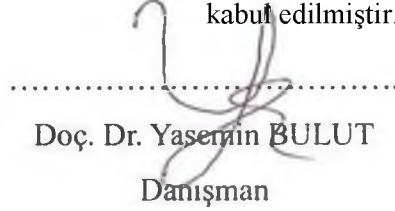
Prof. Dr. Mustafa KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

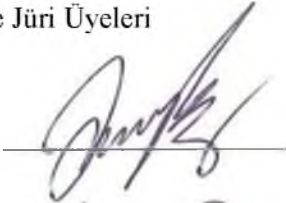
Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden yüksek lisans tezi olarak
kabul edilmiştir.



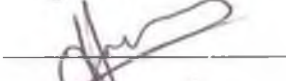
Doç. Dr. Yasemin BULUT
Danışman

Yüksek Lisans Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

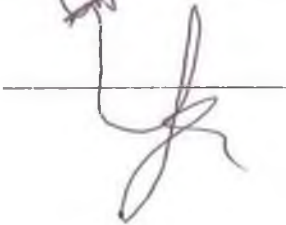
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ



Prof. Dr. Handan AKBULUT



Doç. Dr. Yasemin BULUT



TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca, emeğini, bilgisini, sabrını ve desteğini benden bir an olsun esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım Doç.Dr. Yasemin BULUT'a sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Yüksek Lisans süresince her türlü tecrübelerini benimle paylaşan ve katkılarını eksik etmeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa YILMAZ, Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN, Prof. Dr. Adnan SEYREK ve Prof. Dr. Ahmet KİZİRGİL'e teşekkür ederim.

Başta sevgili Oğuzhan HANCI kardeşim olmak üzere, tüm lisansüstü öğrenim gören öğrenci arkadaşlarıma, örnek toplama aşamasında benimle beraber emek harcayan Patoloji bölümünün çalışanlarına, tezimi hazırlarken faydalandığım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı literatürünün oluşumunda geçmişten günümüze kadar katkıda bulunmuş tüm bilim insanlarına teşekkürlerimi borç bilirim.

TF.11.33 No'lu projemize finansman olarak destek veren Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)'ne teşekkür ederim.

Son olarak başta sevgili eşim Belgin BELHAN'a, anneme, babama ve tüm aileme destekleri, katkıları ve duaları için sonsuz teşekkür ederim.

Mesut BELHAN

Elazığ - 2014

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
TABLO LİSTESİ.....	V
ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	1
3. GİRİŞ	2
3.1. HUMAN PAPİLLOMA VİRUS.....	4
3.1.1. Tarihçe.....	5
3.1.2. Sınıflandırma ve İsimlendirme.....	6
3.1.3. Yapı.....	12
3.1.4. HPV Proteinleri.....	14
3.1.5. HPV Replikasyonu.....	17
3.1.6. Patogenez.....	19
3.1.7. Epidemiyoloji.....	22
3.1.8. HPV İmmunolojisi.....	24
3.1.9. Oluşturdukları Hastalıklar ve Klinik Belirtiler.....	25
3.1.10. HPV İnfeksiyonlarının Tanısı.....	29
3.1.11. HPV İnfeksiyonlarında Tedavi ve Korunma.....	33
3.1.12. HPV Aşıları.....	34
3.2. PYROSEQUENCING YÖNTEMİ.....	36
3.2.1. Pyrosequencing ve Prensipleri.....	37
3.2.2. Pyrosequencing yönteminin kullanım alanları.....	41
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
4.1. Hastaların Seçimi, Örneklerin Toplanması ve Analize Hazırlanması.....	42

4.2. Yöntemin prensibi	42
4.3. Parafin Blok Kesitlerinden HPV DNA İzolasyonu	44
4.4. HPV DNA PCR Aşaması	46
5. BULGULAR.....	50
6. TARTIŞMA	56
7. KAYNAKÇA.....	65
8. ÖZGEÇMİŞ	77

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Servikal Kanser yapma risklerine göre HPV tiplerinin sınıflandırılması.....	3
Tablo 2.	Yaygın HPV tipleri ve sebep oldukları hastalıklar.....	10
Tablo 3.	HPV' de saptanan genler ve fonksiyonları	17
Tablo 4.	HPV tanı yöntemlerinin karşılaştırılması.	33
Tablo 5.	Genotiplendirme için kullanılan kimyasal maddeler, sarf malzemeler ve cihazlar.....	43
Tablo 6.	Kit içeriğinde yer alan primer grupları	45
Tablo 7.	HPV tiplendirme işleminde kullanılan HPV seq primerlerinin hangi HPV tipini tespit ettiğini gösteren tablo	45
Tablo 8.	38 Hastanın patolojik bulgusu, HPV genotipleri ve toplam hasta sayısındaki yüzdeleri	51
Tablo 9.	HPV genotiplerinin yüzde (%) olarak dağılımı	52
Tablo 10.	Bir veya daha fazla HPV tipi ile enfekte hastaların dağılımı	52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	HPV 16 Genomu	5
Şekil 2.	HPV'nin L1 proteinindeki DNA sekans bölgeleri baz alınarak yapılan filogenetik sınıflandırma	9
Şekil 3.	HPV partikülü	12
Şekil 4.	HPV'nin şematize edilmiş hali	12
Şekil 5.	HPV'nin elektron mikroskobu görünümü.....	13
Şekil 6.	HPV genomu (sirküler).....	14
Şekil 7.	HPV genomu (lineer).....	14
Şekil 8.	HPV'nin replikasyonu.....	19
Şekil 9.	Papillomavirus'un farklılaşmaya bağlı yaşam döngüsü.....	21
Şekil 10.	HPV- SIL / HPV- CIN arasındaki ilişki.....	28
Şekil 11.	Pyrosequencing birinci aşaması	38
Şekil 12.	Pyrosequencing ikinci aşaması	38
Şekil 13.	Pyrosequencing üçüncü aşaması	39
Şekil 14.	Pyrosequencing dördüncü aşaması	39
Şekil 15.	Pyrosequencing beşinci aşaması	40
Şekil 16.	Pyrosequencing tekniğinin prensip şeması	40
Şekil 17.	Pyrosequencing aşamalarının ortalama süreleri.....	41
Şekil 18.	HPV (+), β Glob (+) PCR grafiği.....	47
Şekil 19.	HPV (+), β Glob (-) PCR grafiği	47
Şekil 20.	HPV (-), β Glob (+) PCR grafiği	48
Şekil 21.	HPV (+), β Glob (+) PCR grafiği.....	48
Şekil 22.	HPV (-), β Glob (-) PCR grafiği	49

Şekil 23. Negatif ve Pozitif Kontrollerin birlikte gösterildiği PCR grafiği.	49
Şekil 24. HPV genotiplerinin grafik olarak gösterimi	53
Şekil 25. HPV 16 genotipi Pyrosequencing sonucu.....	53
Şekil 26. HPV 18 genotipi Pyrosequencing sonucu.....	54
Şekil 27. HPV 16 + HPV 18 Süper enfeksiyon genotipi Pyrosequencing sonucu	54
Şekil 28. HPV 16 + HPV 16 Africian type1 süper enfeksiyon genotipi Pyrosequencing sonucu.....	55

KISALTMALAR LİSTESİ

APC	: Antigen sunucu hücreler
APS	: Adenozin fosfosülfat
ASC	: Atypical squamous hücre
ATP	: Adenozin trifosfat
CIN	: Cervical intraepitelial neoplasi
dATPaS	: Deoksi adenozin alfa-tio trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
EIA	: Enzyme-linked immunosorbent assays
FDA	: Amerike Gıda ve İlaç Organizasyonu
FFPE	: Formalin-fixed paraffin-embedded
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
HC II	: Hybrid Capture II
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
HLA-A	: Human Leucocyte Antigen-A
HLA-B	: Human Leucocyte Antigen-B
HPV	: Human papillomavirus
HR HPV	: Yüksek riskli human papillomavirus
HSIL	: Highgrade squamous intraepitelial lesion
ICTV	: Uluslar Arası Virus Taksonomi Konseyi

IF	: İntermediate filament
Ig A	: Immunoglobulin A
Ig G	: Immunoglobulin G
Kb	: Kilo baz
LCR	: Uzun kontrol bölge
LEEP	: Loop electrosurgical excision procedure
LR HPV	: Düşük riskli human papillomavirus
LSIL	: Lowgrade squamous intraepitelial lesion
MHC	: Major histocompatibility complex
ORF	: Açık okuma fragmenti
PCR	: Polimerase chain reaction
ppi	: Pirofosfat
Rb	: Retinoblastom
RFLP	: Restriction fragment length polymorfizm
SCC	: Squamous cell carcinoma
SIL	: Squamous intraepithelial lesion
ss DNA	: Tek sarmal DNA
VLP	: Virus benzeri partikülü

1. ÖZET

Servikal kanser kadınlarda göğüs kanserinden sonra görülen ikinci en yaygın kanser türüdür. Human papillomavirus (HPV) servikal kanserin primer etiyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir. HPV tipleri epidemiyolojik ilişkilerine ve HPV genotiplerine göre kategorize edilir. Genom dizi analizine göre şimdiye kadar 100'den fazla HPV genotipi tanımlanmıştır. HPV genotiplerinin tespiti için kullanılan moleküler testler aşılama stratejisinin oluşturulmasında ve epidemiyolojik amaçla oldukça önemlidir. Pyrosequencing yöntemi HPV genotiplerinin belirlenmesinde kullanılan yeni bir yöntemdir. Bu tezde pyrosequencing yöntemi ile uterin servikal kanseri tanısı olan hastaların HPV genotiplerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu çalışmada Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi Patoloji A.D. Laboratuvarından temin edilen 38 parafin bloktaki servikal kanser örneği kullanıldı. Örneklerin HPV pozitifliği real time-PCR yöntemi ile belirlendi. Daha sonra, HPV pozitif olarak tespit edilen örneklerden HPV genotipleri pyrosequencing yöntemi kullanılarak belirlendi. Real time-PCR sonucunda, 38 adet örneğin 35'inde (%92) HPV DNA pozitif saptandı. HPV DNA pozitif örneklerin 26'sında HPV 16 (%68.42), 2'sinde HPV 18 (%5.26) tespit edildi. Bir örnekte HPV 16 ve HPV 18'in süper enfeksiyonu (%2.63), 5 örnekte HPV 16 ve HPV 16 Africian subtip süper enfeksiyonu (%13.15) ve bir örnekte ise HPV 16 ile HPV 33 süper enfeksiyonu (%2.63) bulundu. Bu sonuçlara göre HPV 16 ve HPV 18 enfeksiyonlarının servikal kanserin en önemli etkeni olduğu gösterildi. Pyrosequencing yöntemi ile HPV genotiplerinin belirlenmesi diğer klasik DNA dizi analizi yöntemlerine göre kolay ve ucuzdur. Bu nedenle, rutin laboratuvarlarda HPV genotiplendirme için pyrosequencing yöntemini önermekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Human papilloma virus, HPV, uterin servikal kanser, genotip, pyrosequencing.

2. ABSTRACT

Detection of Human Papillomavirus (HPV) Genotypes by Pyrosequencing Method in Uterine Cervical Cancer Samples

Cervical cancer is the second most common type of cancer in women after breast cancer. Human papillomavirus (HPV) is considered as the primary etiologic agent of cervical cancer. HPV types is categorized according to the epidemiological relationships and genotypes of HPVs. According to analysis of genome sequences of HPVs, HPV genotypes more than 100 have been identified. The molecular tests using for detection of HPV genotypes are very important for the detection of vaccine strategy and epidemiological purpose. The pyrosequencing method is one of the new method using for HPV genotypes. In this thesis, detection of HPV genotypes were aimed by pyrosequencing method in patients with uterine cervical cancer. For this study, 38 paraffin-embedded cervical cancer samples obtained from Department of Pathology, Faculty of Medicine, Firat University were used. The presence HPV DNA in samples were determined by real time-PCR. Then, HPV genotypes were determined from HPV DNA positive samples using pyrosequencing method. According to the results of real time-PCR, 35 (92%) of 38 samples were found as positive for HPV DNA. In the result of pyrosequencing method, of 35 HPV DNA positive samples HPV 16 in 26 (68.42%), HPV 18 in 2 (5.26%) were detected. In one sample, HPV 16 and HPV 18 super-infection (2.63%). In other one sample, HPV 16 and HPV 33 super-infection (2.63%) were detected. HPV 16 ve Africian subtip süper enfeksiyonu (%13.15) were detected fron in 5 samples. According to these results, HPV 16 and HPV 18 were shown to be the most important genotypes. Identification of HPV genotypes with pyrosequencing is cheaper and easier as compared to other methods such as classic nucleotite sequencing method. Thus, we suggest to use pyrosequencing method for genotyping in routine laboratories.

Key words: Human papilloma virus, HPV, uterine cervical cancer, genotype, pyrosequencing.

3. GİRİŞ

Servikal kanser, kadınlarda, göğüs kanserinden sonra, ikinci en yaygın kanser türüdür. Human papillomavirus (HPV) infeksiyonu cinsel yolla bulaşan en yaygın viral infeksiyonlardan biri olup kadın ve erkeklerin en az %50'si yaşamları boyunca HPV infeksiyonu ile karşılaşır (1). Dünya genelinde her yıl 470.000'den fazla yeni servikal kanser vakası tespit edilmekte ve servikal kansere bağlı yaklaşık 250.000 ölüm bildirilmektedir. Servikal kanser vakalarının %75-80'i servikal kanser tarama programlarının etkili olarak yapılmadığı veya uygulanamadığı gelişmekte olan ülkelerde görülür. Servikal kanser, prekanseröz lezyonların tespiti ve tedavisi ile büyük oranda (>%90) önlenilebilir bir hastalık olup, erken tanı etkilidir. Çünkü prekanseröz lezyonlar invaziv kansere genellikle 10 yıldan uzun bir sürede ilerler (2). HPV bütün dünyada servikal kanserin primer etyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir. HPV servikal kanser dışında diğer anogenital kanserler; vulvar, vaginal, anal ve penil kanser ve ayrıca genital siğiller ve respiratuvar papillomatozis lezyonları ile de ilişkilidir (3,4).

HPV, *Papillomaviridae* ailesinin bir üyesi olup, genom dizi analizine göre şimdiye kadar 100'den fazla genotipi tanımlanmış olup 40'dan fazla genotip genital bölgede infeksiyona sebep olur (5,6).

Papillomaviruslar, farklı anatomik bölgelere eğilim göstermeleri ve oluşturdukları lezyon tiplerine göre subtiplere ayrılırlar. Genital HPV tipleri servikal kanser ile epidemiyolojik ilişkilerine göre kategorize edilir. HPV genotipleri prekanseröz lezyon ve servikal kanserle ilişkilerine göre yüksek risk (High risk: HR HPV tipleri) ve düşük risk (Low risk: LR HPV tipleri) HPV tipleri olarak sınıflandırılır. Servikal kanserden en az 15 HPV genotipi sorumlu olup en çok izole edilen yüksek risk tipler HPV 16 ve 18 tipleridir. Düşük risk HPV tiplerinden HPV 6 ve 11 ise genital siğillerin %90'ından fazlasının etkenidir (3).

Tablo 1: Servikal Kanser yapma risklerine göre HPV tiplerinin sınıflandırılması.

<u>Risk gurubu</u>	<u>HPV tipleri</u>
Yüksek risk	16, 18, 31, 33, 35,39, 45, 51, 52, 56,58, 59, 68, 73,82
Muhtemel yüksek risk	26, 53, 66
Düşük risk	6, 11, 40, 42, 43, 44,54, 61, 70, 72, 81, CP6108
<u>Belirsiz risk</u>	<u>34, 57, 83</u>

(7).

Ülkemizde yapılan laboratuvar çalışmaları bu virus enfeksiyonunun yaygın olduğunu göstermektedir (1, 4, 6, 8). Ülkemizde bu virusun genotiplendirilmesine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Günümüzde yüksek riskli belirli HPV tiplerine karşı koruma sağlayabilen aşuların geliştirilmesi ve birçok ülkede kullanım lisansı almış olmaları, bölgesel tip dağılımı verilerinin önemini arttırmıştır. HPV spektrumunun çeşitliliği ve yüksek insidansı, HPV tiplerinin belirlenmesinde güvenilir metotların kullanılmasını gerekli kılmıştır.

HPV tanısı için kullanılan moleküler testler, özellikle de tiplendirmeye yönelik testler, sadece tanı amaçlı değil aşı stratejisinin oluşturulmasında da epidemiyolojik amaçlı kullanım için gereklidir. Yine HPV tiplendirilmesi yalnızca riskli genotipleri belirlemek amacıyla değil aynı zamanda aşı stratejini belirlemek amacıyla da önem arz etmektedir. Genotiplendirme amacıyla da farklı moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

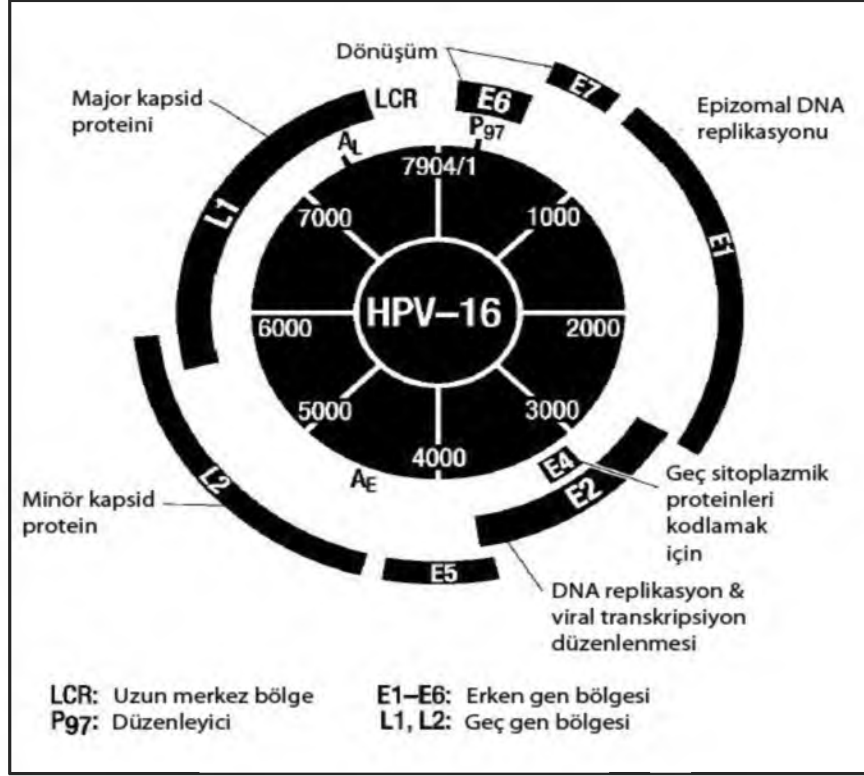
Pyrosequencing yöntemi birçok mikrobiyal etkenin tanısı ve özellikle de çok sayıda genotipi olan etkenlerin doğrudan tiplendirilmesinde kullanılan yeni bir yaklaşımdır. Pyrosequencing kısa sürede sonuç veren ve duyarlılığı yüksek en son geliştirilmiş olan yöntemdir (8, 9).

Mevcut tezde, pyrosequencing yöntemi ile serviks kanserlerinde HPV genotiplerinin tespiti, bu metodun kullanımının laboratuvarımıza yerleştirilmesi ve bu konuda deneyimli elemanın yetiştirilmesi amaçlanmıştır.

3.1. HUMAN PAPİLLOMA VİRUS

Human papillomavirus (HPV), *Papillomaviridae* ailesinde yer alan epitelyotropik bir virus olup, deri ve mukozalarda papillomatöz ve hiperplastik lezyonlara neden olur. HPV'nin yol açtığı lezyonlar genellikle lokalize olup kendiliğinden iyileşir veya latent infeksiyonlar oluşur. Ancak, belli HPV tipleri displazi ve kanser gelişiminde kofaktör olarak rol oynar (10). HPV, özellikle serviks, anogenital bölge, deri, üst solunum ve üst sindirim yolları kanserlerinde etiyolojik ajan olarak saptanmış onkojenik bir DNA virusudur (11,12,13).

HPV DNA'ları küçük, dairesel, çift zincirli ve zarfsız olup yaklaşık 8.000 baz çiftinden meydana gelmiştir. HPV genomu işlevsel özelliklerine göre 3 kısıma ayrılmıştır. 1. bölge olan yukarı bölge (upstream), 400-1.000 bp. uzunluğunda olup transkripsiyon ve replikasyonu düzenler. 2. bölge, transkripsiyon, DNA replikasyonu ve hücre transformasyonu için gerekli proteinleri kodlayan erken genlerin (E1, E2, E4, E5, E6 ve E7) bulunduğu bölgedir. Bu genler viral onkogenez ile ilgilidir. Son bölge olan 3. bölgede ise major ve minör kapsit proteinleri şifreleyen 2 adet geç gen (L1, L2) bulunur (Şekil 1) (14,15).



Şekil 1: HPV 16 Genomu

HPV yüksek oranda konağa özgü bir virus olup hücre kültürlerinde üretilemez ve birkaç tipi dışında hepsi sadece epitelyal hücreleri infekte edebilir. HPV'nin bilinen tek konağı insandır ve türler arası HPV bulaşması bildirilmemiştir. HPV, deri ve mukozadaki mikrotravmalar yoluyla skuamöz epitelyumun bazal hücrelerine ulaşarak bu hücreleri infekte eder (16).

3.1.1. Tarihçe

HPV infeksiyonunun sebep olduğu siğillerin varlığı Antik Yunan ve Roma'dan bu yana bilinmektedir (17).

Papillomavirus araştırmaları birkaç aşamada ilerlemiştir. İnsan ve hayvan siğillerinin deneysel olarak bulaşmasının gösterilmesi ile ilgili çalışmalar 1930'dan önce başlamıştır. İnsanlardaki siğillerin viral etyolojisi ilk kez Ciuffo tarafından ileri sürülmüştür (18).

Bu virüslara karşı en büyük ilgi 1930'larda başlamış ve ilk papillomavirus 1933 yılında tanımlanmıştır. Shope 1933'de papillomavirusların retroviruslardan sonra malignensiye sebep olan ikinci virus olduğunu bildirmiştir. Böylece papillomavirus enfeksiyonu ile kanser arasındaki ilişki ilk kez açıklanmıştır. Papilloma modeli olarak 1930'lu yılların ortalarından 1940'lı yılların ortalarına kadar cottontail tavşan kültürü yapılmıştır (19).

Strauss ve ark. 1949 yılında ilk kez insan sigillerinde viral partikülleri elektron mikroskopunda tespit etmişlerdir. İto ve Evans 1961 yılında karsinomanın enfeksiyöz papillomavirus DNA'sı içerdiğini göstermişlerdir.

Papillomavirus araştırmalarında başka önemli bir gelişme, 1963 yılında Crawford tarafından viral DNA'nın fiziksel özelliklerinin karakterize edilmesi olmuştur.

HPV ve servikal kanser arasındaki ilişki ilk kez 1976 yılında Zur Hausen tarafından ortaya çıkarılmıştır. Gissmann ve zur Hausen 1980-1982 yılları arasında genital lezyonlardan ve laringeal papilloma örneklerinden iki HPV DNA'sını karakterize etmiştir. Karakterize edilen bu DNA'lara servikal kanser biyopsilerinde rastlamasa da aynı problemler kullanılarak servikal kanser biyopsilerinde ve anogenital kanser lezyonlarının prekürsörlerinde hibridizasyon tekniği ile HPV 16 ve 18'in belirlenmesini sağlamışlardır. Devam eden çalışmaların birçoğunda test edilen biyopsilerin %70'inde bu iki tipe ait DNA'ya rastlanmış ve diğer bulunan bazı tiplerin DNA'larının da biyopsi örneklerinde var olduğunu belirlemişlerdir. Daha sonra analiz edilen servikal kanser biyopsilerinin tümünde HPV DNA'sının varlığı bulunmuştur. Temel olarak HPV 16 ve HPV 18, 31, 33 DNA'sı anogenital kanserlerde kesin enfeksiyon ajanı olarak bulunmuş olup bununla birlikte orofaringeal kanserlerin de %25-30'unda bu tiplere ait DNA belirlenmiş ve enfeksiyon ajanı olarak değerlendirilmeleri kesinleşmiştir (18).

3.1.2. Sınıflandırma ve İsimlendirme

Papillomaviruslar deri ve mukoza epitelini infekte eden DNA virüsleri olup Papillomaviridae ailesinde yer alırlar. İnsanlarda ve diğer türlerde çeşitli benign ve malign

tümörlere sebep olurlar. Papillomavirusların sınırlı konak ve doku spesifiteleri vardır. Tür tropizminin, muhtemelen, virusun bağlanma ve penetrasyonundan ziyade konak regülatör proteinlerine bağlı olabileceği düşünülmektedir (20).

Papillomaviruslar insanlara ilaveten hayvanlarda da saptanabilirler. Önceden elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda papillomaviruslar ve polyomaviruslar arasındaki ilişki araştırılmış ve her iki grup da *Papovaviridae* ailesi içinde birleştirilmiştir. Bu ilişki, çift sarmallı sirküler DNA genomuna sahip olmaları ve zarf taşımamaları gibi ortak karakteristik özelliklere dayanılarak yapılmıştır. Polyomavirusların T antijeni ve papillomavirusların E1 gen bölgesinde küçük bir segment dışında nükleotit veya aminoasit homolojisi göstermediği ortaya konmuştur. Genom büyüklükleri, organizasyonları ve replikasyon stratejileri birbirinden farklıdır. Bu sebeple Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (ICVT) tarafından polyomaviruslar ve papillomaviruslar iki ayrı aile olarak sınıflandırılmıştır (21).

Papillomaviridae ailesinde alfa, beta, gama, mu ve nu olmak üzere beş genus bulunur. En büyük grup olan alfa papilloma genusunda mukozayı infekte eden tipler ile deride yaygın siğillere sebep olan HPV 2 gibi kutanoz tipler yer alır. Diğer genuslardaki HPV tipleri deriyi infekte eder. Klinik olarak önemi olan alfa-papillomavirus genusu mukozal ve genital lezyonlarla ilişkili tüm HPV tiplerini içerir. Genital veya mukozal HPV tipleri olarak tanımlamada bazen çelişkiler olabilir ve alfa papillomavirus olarak isimlendirme bu iki terminolojiden üstündür. Örneğin HPV 6 ve 11 tipik olarak servikte genital siğil veya condylomata acuminata'da bulunur, bu yüzden genital HPV olarak isimlendirilir. Ancak larinks papillomaları gibi non-genital bölgelerde de bulunabilir (21).

Papillomavirus dizi veritabanlarının analizi majör kapsid proteinini kodlayan L1 geninin çok iyi korunmuş olduğunu ve böylece özellikle ailenin sınıflandırılması için uygun olduğunu göstermiştir. Bu sebeple papillomavirusların şimdiki kabul görmüş taksonomisi sadece L1'in nükleotid dizi benzerliğine dayanarak yapılmıştır. Yeni bir HPV tipinin tanımlanması için bilinen tüm tiplere göre L1 dizisinde %10'dan fazla nükleotid farkı

gerekir (22). Yeni bulunan HPV tipleri keşif sırasına göre numaralandırılır. Mevcut verilere göre 120'den fazla HPV tiplendirilmiş ve muhtemelen henüz tanınmamış yeni tipler vardır. HPV'ların E6, E7 ve L1 gibi bazı gen bölgelerinin open reading frames (ORF)'lerinde, diğer HPV tipleri ile %90'dan az homoloji varsa yeni bir HPV tipi olarak tanımlanır. Günümüzde papillomaviruslar için yeni bulunan izolatları onaylama, Papillomavirus Referans Merkezi (Heidelberg/Almanya) tarafından yapılmaktadır. Subtip tanımı ise ilk olarak 1980'de restriksiyon paternlerindeki farklılıklara dayanarak kullanılmıştır. HPV genomunun L1 genindeki % 2-10 arası farklılık subtipleri belirler. Aynı tip izolatların L1 gen nükleotid dizilerinde %2'den daha az farklılıklar ise "variant" olarak isimlendirilir. HPV varyantlarının kodlanmayan LCR (long control region)'sinde %5 ve daha fazla intratipik ayrılık vardır. Son zamanlarda açıkça gösterilmiştir ki erken-geç intergenik bölge, E4 ve E5'in çok değişken olmasına rağmen variantlar arasındaki ilişkide LCR dizileri çoğunlukla intratipik farklılıkların tarifinde kullanılır (23).

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 rağmen, temel biyolojik ve genomik organizasyonlarındaki önemli farklılıklarından dolayı ayrı bir aile olarak sınıflandırılmaları gerektiğini göstermiştir. Polyomavirusların genomlarının yaklaşık 5 kb büyüklüğünde olmasına rağmen papillomavirusların genomu yaklaşık 8 kb'dır. Polyomavirusların 2 transkripsiyon üniti varken papillomavirusların sadece bir üniti vardır. Ayrıca polyomaviruslar ve papillomaviruslar nükleik asit ve aminoasit dizilerinde benzer özellikler taşırlar (24).

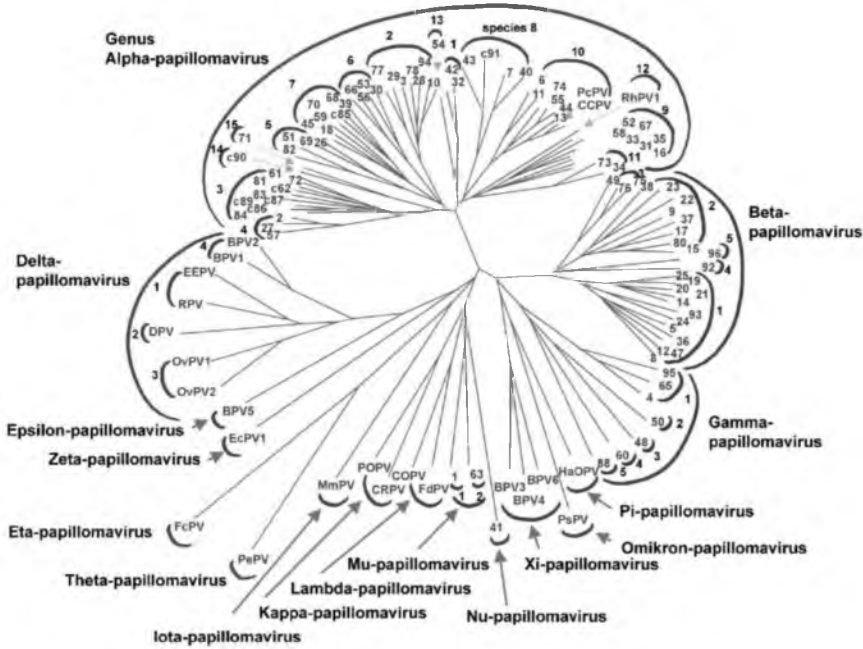
Bu özelliklerinden dolayı bu virusların iki farklı aile oldukları sonucuna ulaşılmıştır. Papillomavirus ailesi (*Papillomaviridae*) Uluslararası Virus Taksonomi Konseyi

(International Council on Taxonomy of Viruses-ICTV) tarafından resmen onaylanmıştır (25).

Papillomaviruslar, doğada yaygın ve esas olarak gelişmiş vertebralı canlılarda bulunurlar. Papillomaviruslar, orijin aldıkları türe, aynı tür içindeki genetik ilişki derecesine, doku tropizmine ve neden oldukları lezyon tiplerine göre sınıflandırılır.

Bu özelliklerine dayanılarak HPV'lar 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.



Şekil 2. HPV'nin L1 proteinindeki DNA sekans bölgeleri baz alınarak yapılan filogenetik sınıflandırma.

Tablo 2: Yaygın HPV tipleri ve sebep oldukları hastalıklar

HPV tipi	Lezyon
<u>Muko kutanöz 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)

(21,25).

Papillomavirusların ikinci sınıflandırılma şekli, en son güncellenmiş sınıflandırma tipi olup, HPV'nin L1 proteinindeki DNA sekans bölgeleri baz alınarak yapılan filogenetik sınıflandırmadır (21).

1- Süpergrup A: Genital yolla bulaşan mukozal HPV tipleri süpergrup A (Alfa papillomaviruslar) içerisinde yer alır. HPV tip 6 ve 11 gibi bu grupta bulunan viruslar, özellikle cinsel yolla bulaşan patojenler olup cinsel yönden aktif popülasyonu etkilemektedir. Bu viruslar, benign papillomlarla ilişkili lezyonlar olup genital bölge dışında oral bölgede de infeksiyona 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.

2- Süpergrup B: Papillomavirusların ikinci ana grubu süpergrup B (Beta papillomaviruslar) içinde yer alır. Subgrup B1 içinde yer alan viruslar genel olarak asemptomatik ve latent infeksiyonlara neden olurken immün suprese kişilerde problemlere neden olabilirler. Bu tür hastalarda HPV infeksiyonu bölgesinde cilt kanserleri gelişebilir. Bu durum, melanom dışı deri kanserlerinin gelişiminde subgrup B1 viruslarının rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Subgrup B2 (Gama papillomaviruslar) içinde yer alan viruslar genel popülasyonda süpergrup A papillomaviruslardakine benzer şekilde kutanöz siğillere neden olmaktadır.

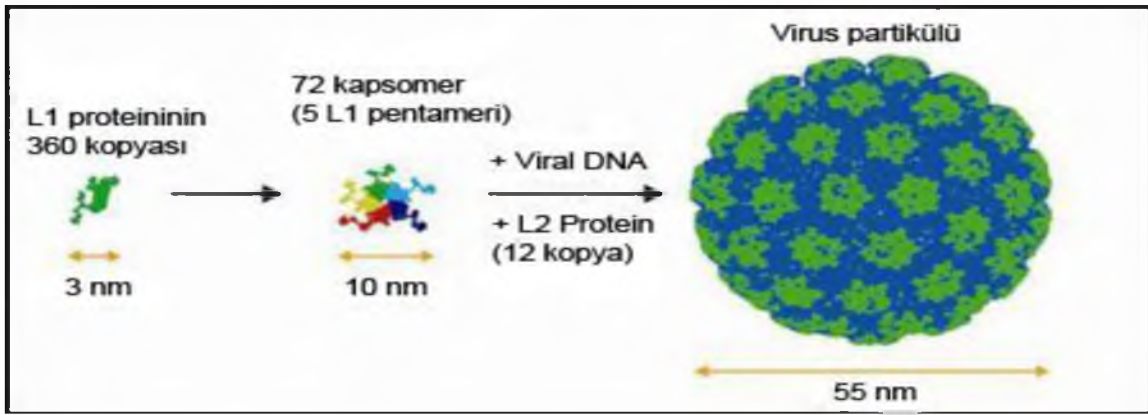
3- Süpergrup E: Diğer HPV'ler süpergrup E (Mü ve Nü papillomaviruslar) içerisinde yer alırlar. Bu grup içinde üzerinde en çok çalışılan tip HPV tip 1'dir ve kutanöz siğillere neden olmaktadır.

Üçüncü sınıflandırmada ise spesifik HPV tiplerinin sıklıkla birliktelik gösterdikleri lezyonlar baz alınarak ve onkojenik potansiyellerine göre HPV tipleri *Düşük riskli grup*,

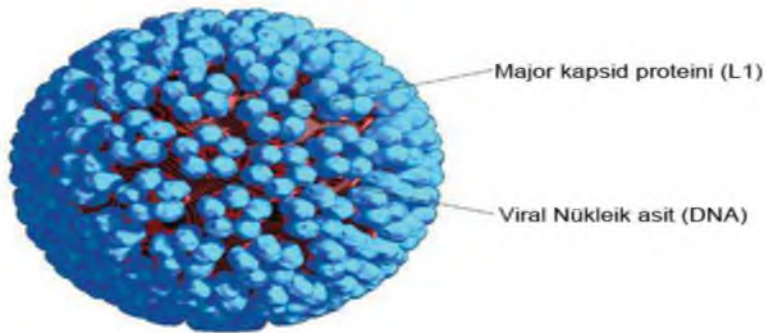
Yüksek riskli grup ve Intermediate riskli grup olarak 3 gruba ayrılmıştır (25).

3.1.3. Yapı

HPV, *Papillomaviridae* familyasında bulunan 50-55 nm büyüklüğünde ikosahedral kapsidi ve çift iplikli sirküler DNA'sı olan zarfsız bir virustur. L1 proteini moleküllerinin birleşmesiyle kapsomerler, kapsomerlerin birleşmesiyle de kapsid oluşur. Oluşan bu kapside viral DNA'nın ve L2 proteinlerinin eklenmesiyle virus meydana gelir (Şekil 3, 4 ve 5) (26).



Şekil 3: HPV partikülü

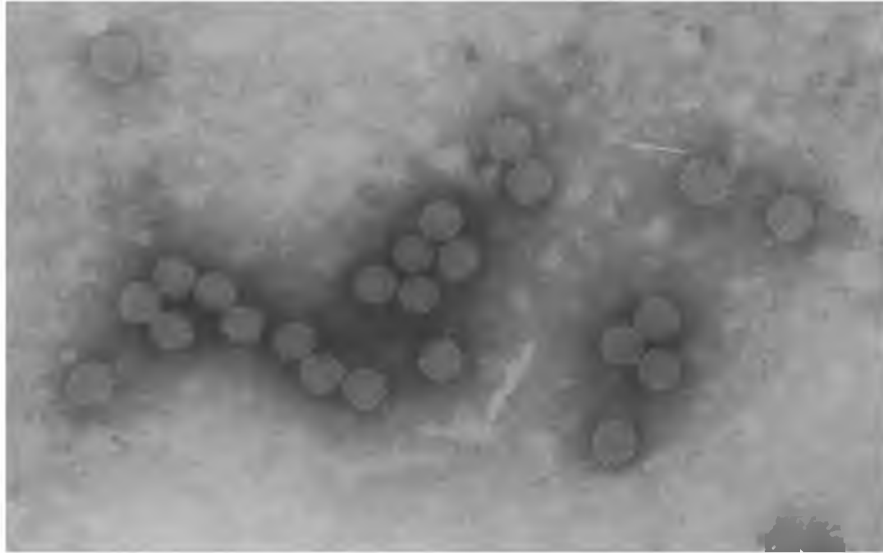


Şekil 4: HPV'nin şematize edilmiş hali

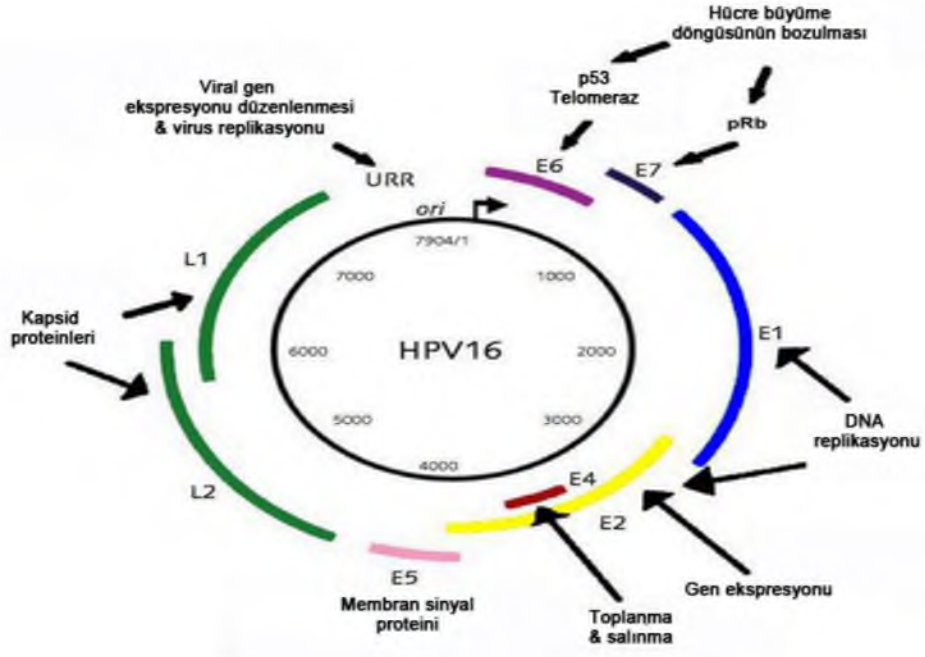
Viral genom yaklaşık 8000 baz çifti uzunluğunda olup erken bölge (early region),

geç bölge (late region) ve uzun kontrol bölgesi (long control region; LCR) olmak üzere 3 bölgeye ayrılır. Erken bölgede 7 adet ORF (open reading frame), geç bölgede 2 adet ORF bulunur. Bütün HPV ORF'ları virusun sadece bir sarmalı üzerinde lokalize olmuştur. E1, E2, E4, E5, E6, E7 ORF'ları 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 (Şekil 6).

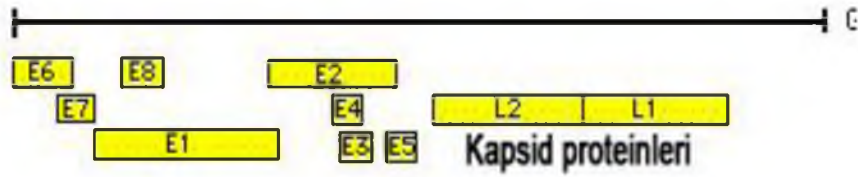
LCR; kodlanmayan bölge olup viral DNA replikasyon orijini bulunduran bölgedir. 400 bç'lik, farklı transkripsiyon aktivatörleri ve inhibitörleri için bağlanma noktaları içeren kompleks bir düzenleyici bölgedir. Bu aktivatör ve inhibitörler, aktivatör protein-1 (AP-1), nuclear factor (NF-1/CTF), Oct-1, Sp-1 YY1 ve keratinocyte –specific factor (KFF-1) 'dür. Bunlar gibi transkripsiyonel faktörlerin LCR'a bağlanması, erken bölgedeki ORF'lerin transkripsiyonunu düzenler ve sürdürülmesine yardımcı olur. Bu bölge, ayrıca, spesifik HPV tiplerinin sınıflandırılmasında da önemli rol oynamaktadır.



Şekil 5: HPV'nin elektron mikroskobu görünümü.



Şekil 6: HPV genomu (sirküler)



Şekil 7: HPV genomu (lineer) (19,23,28,).

3.1.4. HPV Proteinleri

3.1.4.1. E1 ve E2 proteinleri

E1 ve E2 genleri HPV'un önemli regülatör proteinlerini kodlar ve parabazal keratinositlerde bulunur. Bu proteinler viral epizomun stabilize edilmesi, viral replikasyonun başlatılması ve replikasyonda rol oynarlar. E2 tarafından kodlanan protein URR'deki E2 bağlanma yerine bağlanarak transkripsiyonu baskılar. E1 tarafından kodlanan protein promoter bölgesine E2'nin bağlanmasını kolaylaştırır. E2 gen ürünü olan E2

proteini yaklaşık 50 kDa'luk bir nükleer proteindir. LCR bölgesindeki E2 bağlanma bölgelerine (E2BS) bağlanarak viral replikasyon ve transkripsiyonunun regülasyonunda önemli bir rol oynar. E2 proteini prodüktif infeksiyon sırasında çeşitli roller oynar ve bazal hücrelerde viral DNA replikasyonunun başlaması ve genomun açılması (segregasyon) için gereklidir (3,28).

3.1.4.2 E6 ve E7 proteinleri

HPV tiplerinin onkojenik fonksiyonları özellikle iki erken genin; E6 ve E7 ekspresyonuna bağlıdır. E6 ve E7 iki major HPV onkoproteinleridir. E6 onkoproteini yaklaşık 17 kDa büyüklüğündedir. HPV infeksiyonunun tümörojenitesinde önemli bir rol oynar. Yüksek risk (HR) HPV'larda E6 proteinleri, konak hücrenin hem nükleus hem de stoplazmasına dağıtılır. HR E6 proteinlerin iyi bilinen fonksiyonlarından biri p53'ün yıkılması yolu ile insan hücrelerini transforme etme kabiliyetidir. Düşük risk (Low risk; LR) HPV E6 proteinlerinin de p53'e düşük affinite ile bağlandığı gösterilmiştir. E7 onkoproteini yaklaşık 12 kDa molekül ağırlığındadır ve öncelikle nükleusta bulunur. HR E7 proteinlerinin temel aktivitesi, retinoblastom (Rb) ailesi üyeleri ile ilişkisi yoluyla hücrelerin transformasyonuna katılımıdır. Rb proteini hücre siklusunun G₁'den S fazına geçişini inhibe eder ve aktivitesi fosforilasyon ile düzenlenir (3,28,29,30).

3.1.4.3. E4 proteini

Diğer erken proteinlerin çoğunun aksine HPV E4 proteinleri infeksiyonun geç döneminde bol miktarda eksprese edilir. Tam uzunlukta bir E4 proteini uç uca eklenmiş E1-E4 transkriptlerinden oluşur. E1-E4 proteini özellikle stoplazmada lokalizedir. HR HPV'nin E4 proteini infekte hücrelerin stoplazmasında yaygın olarak dağılır ve keratin intermediate filamentleri (IF) ile organize filamentöz bir ağ formu oluşturur, in vitro sitoskeleton kollapsına yol açıp virus salınımında rol aldığı ileri sürülmektedir. E4 proteininin yüksek ekspresyon düzeyinin viral DNA replikasyonu ile korele olduğu ve differensiyel epitel

hücrelerinde L1 ekspresyonundan önce meydana geldiği rapor edilmiştir, bu da E4 proteininin, HPV DNA replikasyonunu uyardığı ve HPV hayat siklusunda geç viral fonksiyonları regüle ettiğini gösterir (28,30).

3.1.4.4. E5 proteini

E5 gen ürünü olan E5 proteini yaklaşık 5 kDa uzunluğunda, 83 aminoasitlik, küçük bir hidrofobik membran proteinidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, E5 proteininin, viral amplifikasyonu ve differensiyasyon hücrelerde viral gen ekspresyonunu modüle etmede E7 ile kooperatif rol oynadığını göstermiştir. E5 aracılı etkinin, endozomal maturasyonda ve konak antijen sunan hücrelerde değişikliğe sebep olduğu gösterilmiştir. E5 varlığı hücrelerde yüzey HLA-A ve HLA-B seviyelerinin azalmasına yol açar. MHC class II tarafından antijen sunumunu, sabit zincirin yıkılmasındaki eksiklikten dolayı interferon gama stimülasyonu yaparak E5 eksprese eden hücrelerde class II yüzey seviyelerini azaltır. HPV 16 E5'in HLA class I hücre yüzeyine transportu azaltarak MHC class I'i engellediği bildirilmiştir (28).

3.1.4.5. Geç bölge L1 ve L2 proteinleri

Geç bölge yaklaşık 3 kb uzunluğundadır ve sırasıyla majör ve minör proteinleri kodlayan L1 ve L2 genlerini içerir. Kapsid proteinleri olan L1 proteini yaklaşık 55 kDa, L2 proteini ise yaklaşık 74 kDa ağırlığındadır. L1 proteinlerinin tek başına kapsidlere montaj olma kapasiteleri vardır. L2 proteininin DNA'ya bağlanmasından ve enkapsidasyon olaylarından sorumlu olduğu ileri sürülür. E3 ve E8 proteinlerinin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (3,28,30)

Tablo 3: HPV’ de saptanan genler ve fonksiyonları.

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

3.1.5. HPV Replikasyonu

Papillomaviruslar, yaralar ve abrazyonlardan geçerek epitel tabakasında aktif bölünme özelliğine sahip tek hücre tipi olan bazal epitel hücrelerini enfekte etmektedir (31). Virus “heparan sülfat proteoglikanlar” ve “alfa 6 integrin” gibi yüzey proteinlerine bağlanarak endositozla hücre içine alınır ve sonrasında HPV genomu ikozahedral protein kılıfından ayrılarak hücre çekirdeğine girer (32,33). HPV genomunun replikasyonu, diğer küçük DNA viruslarında olduğu gibi, kritik olarak konak hücre replikasyon mekanizmalarına bağımlıdır. Viral DNA enfekte bazal epitel hücrelerinin çekirdeğinde hücresel genomdan ayrı düşük kopya sayılı bir plazmid gibi varlığını sürdürebilir veya hücresel genoma entegre olabilir (31). Yara iyileşmesi sırasında bazal hücre proliferasyonu ile beraber virus replikasyonu da gerçekleşir (33). Yassı epitel hücreleri bazal membrandan yüzeye doğru hareket ederken değişim geçirirler ve çoğalma özellikleri olmayan matür epitel hücrelerine dönüşürler; ancak HPV DNA matür hücrelerde replike olmaya devam eder. Çünkü HPV’lerin kodladığı E6 ve E7 proteinleri hücresel hedeflerle etkileşerek hücreye DNA sentezi yapabilme yeteneği kazandırır ve böylece viral DNA replikasyonu

tetiklenir (31,34). Sadece yüksek riskli HPV tiplerinde görülen integrasyon genellikle E1 ve E2 gen bölgelerinde olur, bu sırada E2 gen bölgesi parçalanır ve inaktif hale geçer. Bunun sonucu olarak integre genom içeren hücrelerde E6 ve E7 ekspresyonu ve kontrolsüz hücre çoğalması baskılanamaz ve kansere dönüşüm başlar. Kanser dönüşümünün nadiren de olsa integrasyon olmadan da gerçekleşebildiği gösterilmiştir (31). E6 proteini onkogeneze önemli rol oynar, p53 tümör süpresör proteinine bağlanıp hücresel ubikülin ligaz aracılı bir süreç ile bu proteinin hızlıca yıkılmasını indükler (31,35). E7 proteini ise retinoblastoma tümör süpresör proteinine ve ilişkili proteinlere bağlanır ve onları stabilize eder; sonuçta hücreyi S fazına götüren E2F proteinini serbestleştirir (31,35). Her iki mekanizma da apoptozun inhibisyonu ve immortalizasyon sonucu preinvazif ve invazif lezyonların gelişmesi ile sonuçlanır (32).

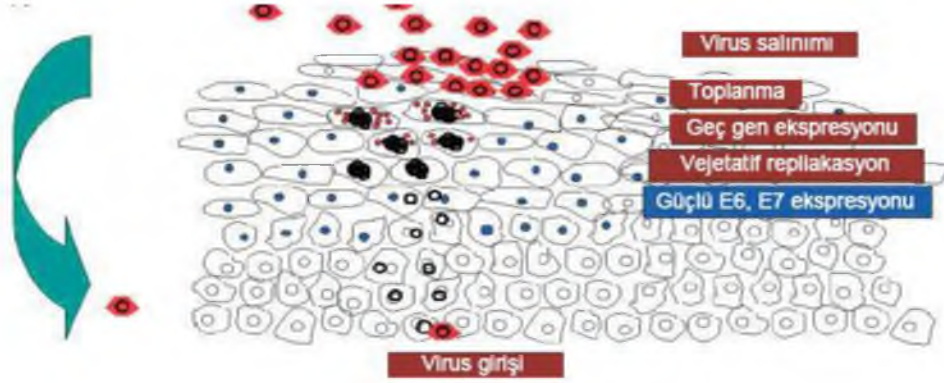
HPV'nin hayat siklusu epitel hücrelerinin farklılaşmasına son derece bağlıdır. HPV replikasyonu enfektif virusun bütünlüğü bozulmuş çok tabakalı epitelde ve epidermin bazal hücrelerini infekte etmesi ile başlar. İnfeksiyonun başlangıç yeri, immatür skuamöz epitelin HPV için reseptörler bulunduran bazal hücreleridir. HPV için epitel hücrelerinde spesifik reseptörler tam bilinmemekle beraber heparan sülfat ve integrin'in virusun hücrelere bağlanmasında rol oynadığı belirlenmiştir.

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

1- Latent infeksiyonda, HPV DNA'nın bazal hücrelerde sessiz kaldığı ve virion üretiminin olmadığı nonproduktif infeksiyon durumudur. Latent infeksiyonlarda tam bir viral partikül (virion) üretilmez, HPV infeksiyonunun karakteristik sitopatik etkileri gözlenmez ve HPV ancak moleküler metodlar kullanılarak belirlenebilir. Latent olarak enfekte olmuş epitel morfolojik anormallik göstermez.

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 (36).



Şekil 8. HPV'nin replikasyonu

3.1.6. Patogenez

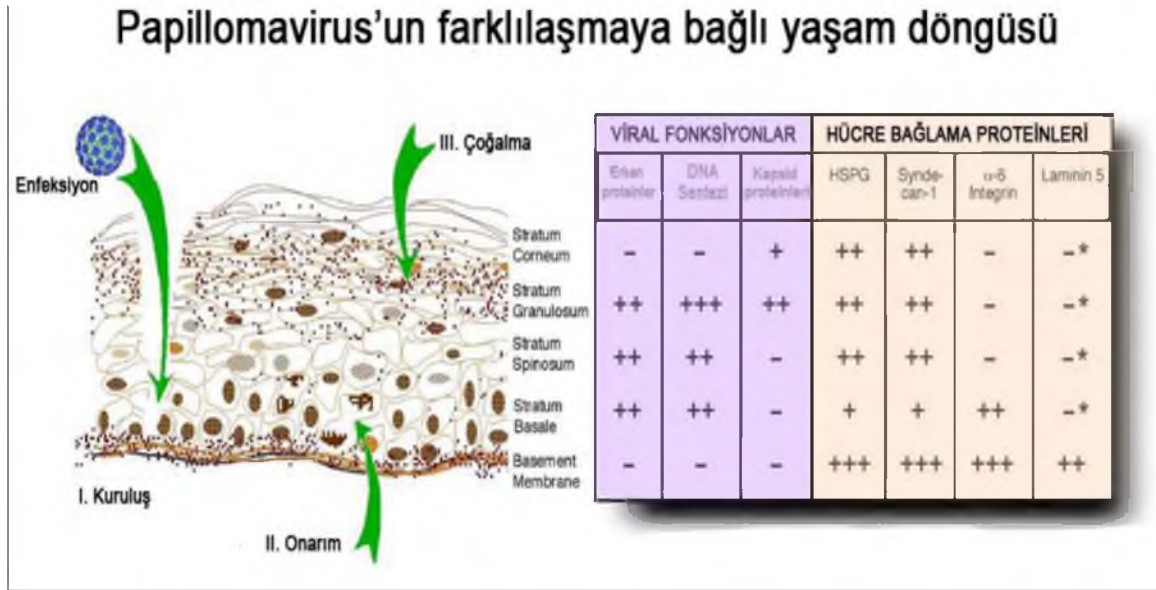
HPV'lar çeşitli epitelyal lezyonlara sebep olur. Her biri spesifik epitellerde infeksiyon ile ilişkidir. Alfa ve beta papillomaviruslar olmak üzere iki ana HPV genusu vardır ve yaklaşık HPV tiplerinin %90'ı halen bu genusların birinde bulunmaktadır. HPV çoğunlukla cinsel ilişki sırasında geçmektedir. Genital siğilleri içeren genital HPV infeksiyonu, bakireler, çocuklar ve yeni doğanlar gibi cinsel deneyimi olmayan bireylerde de oluşabilir. LR HPV'ların genital olmayan geçişlerine ilişkin bazı kanıtlar vardır. HR HPV'lar ağız, orofarinks ve konjunktivada bulunup bu bölgelerdeki kanserler ile ilişkilidir. HPV infeksiyonunda epidemiyolojik risk faktörleri için çalışmalar, hem erkek hemde kadınlar arasında cinsel davranış ilişkilerinin ana gösterge olduğunu açık bir şekilde göstermiştir. En önemli risk faktörleri cinsel eşlerin sayısı, cinselliğe başlama yaşı ve cinsel eşlerinin en az birinde HPV taşıyıcılığı bulunmasıdır (3). HPV infeksiyonlarının çoğu geçici ve asemptomatiktir ve klinik belirtilere sebep olmaz. Yeni HPV infeksiyonlarının %70'i 1 yıl içinde ve %90'ı 2 yıl içinde temizlenir. Yeni infeksiyonların ortalama süresi 12

aydır. HR HPV tipleriyle persistan infeksiyon servikal kanser öncü lezyonları ve invaziv servikal kanser için en önemli risk faktörüdür. İlk HPV infeksiyonu ve servikal kanser gelişimi arasındaki süre genellikle 10-15 yıldır (37).

Birçok HPV tipi infeksiyondan sonra sadece prodüktif (üretken,yaratıcı) lezyonlar oluşturur ve insan kanserleriyle ilişkili değildir. Bu tip lezyonlarda viral gen ürünlerinin ekspresyonu, epitelyum yüzeyine doğru infekte hücreler göç ettikçe belirli zamanlarda üretilen viral proteinler ile dikkatli bir şekilde regüle edilir. Üst epitelyal tabakalarda virus sentezine sebep olan olaylar, hem düşük hem de yüksek risk HPV tiplerinde yaygındır. Prodüktif infeksiyon spesifik roller oynayan farklı viral proteinler ile oluşur. E6 ve E7 gen ürünleri hücrenin büyümeyi düzenleyici mekanizmalarını bozar ve böylece farklılaşmış hücrede viral replikasyonu kolaylaştırır. Epitelyumda viral replikasyon başlıca intermediate ve süperfisyal hücrelerde olur ve en fazla viral yük terminal diferensiyel epitelde bulunur. Prodüktif infeksiyonda skuamöz hücrelerde karakteristik sitolojik değişiklikler meydana gelir, bunlar hücrenin büyümesi, multinükleasyon, nükleer hiperkromazi, nükleer düzensizlik ve perinükleer hale oluşumudur (3).

HPV L1 ve L2 proteinleri virus infektivitesinde önemli rol oynar. Papillomaviruslar tarafından infeksiyon oluşması, virus partiküllerinin epitel bazal tabakaya bağlanmasını ve bölünen bazal hücrelere girişini gerektirir. Papillomavirus partikülleri bağlanmadan sonra hücreye oldukça yavaş alınırlar ve HPV 16 için bu "*clathrincoated*" endositoz ile gerçekleşir. Bu giriş modu tüm HPV tiplerinde korunmayabilir, bununla birlikte HPV 31'in "caveolae" yolu ile giriş yaptığı ileri sürülmektedir. Hücre proliferasyonu, lezyon formasyonu ve viral epizomun devamı için gerekli olmasına rağmen, tüm papillomaviruslar sonuçta amplifiye edilir ve genomlarını paketleyerek infeksiyöz virionlar oluşturur. Geç olayların başlamasının neyin sağladığı henüz tam olarak anlaşılamamıştır, fakat infekte hücre epitelyal yüzeye doğru hareket ettikçe kısmen hücresel çevredeki değişikliklere bağlı

olduğu görülmektedir. Papillomaviruslarda prodüktif siklusun son aşaması, replike olan genomun infekte partiküller içine paketlenmesidir. Genom amplifikasyonu başladıktan sonra L1 ve L2 ekspresyonu ile kapsid proteinleri çoğalır. L2 ekspresyonu L1 ekspresyonundan önce olur. Kapsid proteinlerinin sentezi ile genom amplifikasyonu arasındaki bağlantı henüz tam olarak anlaşılammıştır, fakat mRNA “splicing” [transkripsiyon sonrasında RNA'daki bazı bölümlerin (intron'ların) çıkartılıp kalan kısımlarının (eksonların) birleştirilmesi] değişikliklere ve geç poliadenilasyon bölgesinde (erkenden daha ziyade) sonlanan transkript oluşumlarına bağlıdır. HPV genomu bazal hücrelerin nukleusunda epizomal halde bulunur ve yuvarlanan çember replikasyon modeli ile nukleusta çoğalır (Şekil 9).



Şekil 9. Papillomavirus'un farklılaşmaya bağlı yaşam döngüsü

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 nukleusunda 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. HPV DNA'nın 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 sonucunda hücrelerin transformasyon riski artar (37).

3.1.7. Epidemiyoloji

Genital HPV en yaygın cinsel yolla bulaşan enfeksiyondur ve tahminen cinsel olarak aktif kadınların en azından %50'sinin bir veya daha fazla tipte enfekte olduğu ileri sürülmektedir. HPV genotiplerinin en az 40'ı genital epitelyumu enfekte eder. Her HPV tipi çeşitli klinik belirtilere sebep olur ve genital tipler onkojenik potansiyellerine göre düşük veya yüksek riskli olarak sınıflandırılırlar. Örneğin HPV 6 ve 11 genital siğillerde en sık rastlanan tipler iken HPV 16, 18, 31 ve 45 invaziv anogenital kanserlerin gelişiminde en sık rastlanan tiplerdir. Servikal kanser örneklerinin %99.7'sinde HPV bulunması, HPV enfeksiyonu ve servikal neoplazi gelişmesi arasındaki etyolojik ilişkiyi kuvvetle destekler. HPV enfeksiyonlarının çoğunun subklinik seyretmesi ve enfeksiyonların geçici olmasından dolayı epidemiyoloji ile ilgili veriler sınırlıdır (38,39). Genital HPV enfeksiyonu en sık klinik, moleküler ve serolojik metodlar ile tanınır. Klinik belirtilerin büyük çoğunluğu genital siğillerin varlığı ile karakterizedir, ayrıca mikroskopik olarak görülebilen sitolojik ve histolojik özellikler ve kolposkopik olarak tespit edilen SIL'lerin varlığı ile karakterize edilir. HPV DNA'nın moleküler tespiti ya PCR'a dayalı amplifikasyon metodları veya hibridizasyon metodları ile yapılmaktadır. Serolojik metodlar, spesifik HPV tipleri tarafından üretilen bazı viral proteinlere karşı serum

antikorlarının tespiti için kullanılır (40). HPV prevalansı belli bir nüfusta, belli bir zaman dilimi içerisinde, çalışma kapsamında yer alan, enfeksiyona sahip kişilerin oranıdır. HPV tanı metodlarına göre değişiklik gösterir. Klinik olarak sigillere dayanan çalışmaların tipik olarak prevalansları düşüktür, ancak HPV DNA tespiti için PCR'a dayalı metodları kullanan çalışmalarda en yüksek prevalans bildirilmiştir. En yüksek prevalans cinsel olarak aktif kadınlarda, en düşük prevalans ise cinsel ilişkiye girmemiş olduğunu söyleyen kadınlar arasında bildirilmiştir (40,41). Genital HPV enfeksiyonu, gelişmiş ülkelerde, genç cinsel aktif popülasyonlarda cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar içinde en yaygın olanıdır ve en fazla 15-24 yaş arası kadınlarda görülür. Tahminen dünyada her yıl 30 milyon yeni genital HPV vakası tanınmaktadır. Doğurgan yaştaki popülasyonun tahminen %75'i genital HPV ile enfektedir ve cinsel aktif kadınların çoğu yaşamları sürecinde HPV enfeksiyonuna yakalanırlar (42,43,44). Onkojenik HPV tipleri ile oluşan enfeksiyonlar bütün HPV enfeksiyonlarının %50-75'ini oluşturur (40,45). HPV enfeksiyonunun, cinsel yolla bulaşan hastalıklardan sorumlu olmasına ve servikal neoplazi ile etyolojik bağına rağmen, HPV genital enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve doğal gelişimi hala tam olarak anlaşılmış değildir. HPV enfeksiyonunun prevalansı ve insidansı için doğru tahminler mevcut değildir. Çoğu enfeksiyonun subklinik veya kısa süreli olması, kesin tanının HPV DNA ve serum antikorlarının tespitine dayalı olmasından dolayı veriler kısıtlıdır. HPV enfeksiyonlarının insidans ve prevalansı, HPV DNA ve serum antikorları tespit metodlarını kullanan epidemiyolojik çalışmalara dayanır. Genital HPV enfeksiyonunun insidans ve prevalans tahminleri; çalışılan popülasyonun özellikleri, çalışma dizaynı, örnek toplama ve kullanılan HPV tespit metodlarına göre değişir (46).

HPV, genellikle fiziksel ve kimyasal ajanlarla inaktivasyona dirençlidir. Bu nedenle kontamine olmuş yüzeyler ve eşyalarla geçiş mümkündür. Bazal hücrelerin enfeksiyöz virüsle karşılaşmasının seksüel temas veya epitelin deri abrazyonu gibi minör travmaya

maruz kalması gibi nedenlerle olduğu düşünülmektedir.

Lezyonun lokalizasyonu, infeksiyöz virus partikül miktarı, travmanın şiddeti, HPV tipi ve bireyin bağışıklık durumu HPV geçişini etkileyen faktörlerdir. Hücrel immünesi baskılanmış kişiler, HPV infeksiyonuna daha duyarlıdır. Çocuklarda ve genç erişkinlerde % 10'lara varan oranlarda plantar ve yaygın siğiller görülürken erişkinlerde daha az saptanması kazanılmış immünesiteye bağlı olabilir (47).

HPV'nin 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 (48).

Genital organların HPV infeksiyonları halen en sık cinsel temasla bulaşan hastalıklar arasında yer almaktadır. HPV ile enfekte 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 enfekte oldukları düşünülmektedir (49). 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 kendiliğinden gerilediği 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 (36).

3.1.8. HPV İmmunolojisi

Bütün virus infeksiyonlarında olduğu gibi HPV infeksiyonunda da immün sistemin hücrel ve humoral cevabı virusa karşı savun mada oldukça önemlidir. Genellikle virus ve

virus ile infekte olan hücreler doğal immun sistem tarafından yok edilirler. Doğal bağışıklık, herhangi bir patojene karşı deri ve mukozal hücreler tarafından sağlanan ve interferon- α , sitokinler, nötrofiller ve makrofajları içeren cevap ile karakterize nonspesifik dirençtir. Edinilmiş bağışıklık ise her bir patojen için spesifiktir ve humoral immunité ile hücresele immunitéyi kapsar. Doğal immunité APC'leri (antigen-presenting cell = antijen sunan hücre) aktive ederek adaptif immun sistemi uyarır. Diğer patojenlere nazaran HPV, bazı yapısal ve fizyolojik karakterlerinden dolayı zayıf immunojendir ve başarılı bir şekilde immun sistemden kaçabilir.

Servikal lezyonlar tedavi edildiğinde serum ve servikal mukus antikor seviyelerinin azaldığı izlenir (50,51). HPV'ye karşı immün cevap geç oluşur. HPV 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 yüzelelerinde az miktarda HPV antijeni sunmaları da virusun immün cevaptan kaçmasına sebep olur. HPV'nin 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. HPV tip spesifik antikor pozitifliği yıllarca kalabilir. HPV lezyonlarının kendiliğinden gerilemesinde hücresele immünite rol oynamaktadır. Servikal HPV infeksiyonlarının çoğunda HLA-Klas1 ekspresyonunun down-regülasyonu görülürken HLA-Klas 2 ekspresyonunun up-regülasyonu dikkat çekmektedir. Hücresele immünitenin suprese olduğu HIV hastalarında ve transplantasyon yapılan kişilerde HPV infeksiyonları daha sık gözlenmektedir (52,53).

3.1.9. Oluşturdukları Hastalıklar ve Klinik Belirtiler

HPV infeksiyonu genel olarak lokalize kalmakta ve spontan olarak gerilemektedir.

Bazı kişilerde ise persistan HPV infeksiyonu gelişmekte ve HPV'nin oluşturduğu lezyonlar prekanseröz olabilmekte, kansere yol açabilmektedir. Klinik tablo, virusun tipine, lezyonun lokalizasyonuna, bireyin immünolojik durumuna ve epitelin türüne bağlı değişebilir.

3.1.9.1. Deri İnfeksiyonları

En sık çocuklarda ve gençlerde verrüköz lezyonlar tablosuyla ortaya çıkar.

3.1.9.1.1. Verruca Vulgaris

Genellikle HPV genotip 2 ve 4 tarafından oluşturulan en çok el ve parmaklarda olmak üzere vücudun her yerinde lokalize olabilen ağrısız lezyonlardır.

3.1.9.1.2. Verruca Plantaris

HPV tip 1 tarafından oluşturulan ayak tabanında lokalize olan hiperkeratotik, endofitik ve ağrılı olan papüllerdir.

3.1.9.1.3. Verruca Plana

Özellikle yüz, el sırtı ve bacaklarda görülen, sıklıkla HPV tip 3 ve 10'un etken olduğu, deri renginde veya pembe, fazla kabarık olmayan, 2-4 mm büyüklüğünde küçük papüllerdir. Yirmi kutanöz HPV tipinin hemen hemen hepsi epidermodisplasia verrucoformis hastalarından izole edilmiştir. Bu lezyonların çoğu çocukluk çağında gelişir ve tedaviye dirençlidir.

3.1.9.2. Mukozal İnfeksiyonlar

Genital, respiratuvar, oral mukozalar ve konjonktiva HPV'nin infektif 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.

HPV 16 ve HPV 18 genital bölgenin bazı benign lezyonlarında konakçı iken, bu tiplerin özellikle premalign ve malign lezyonlardan sorumlu oldukları kanıtlanmıştır. HPV 13 fokal epitelyal hiperplazi ile ilişkilidir ve sadece ağız içinde bulunmaktadır (54,55).

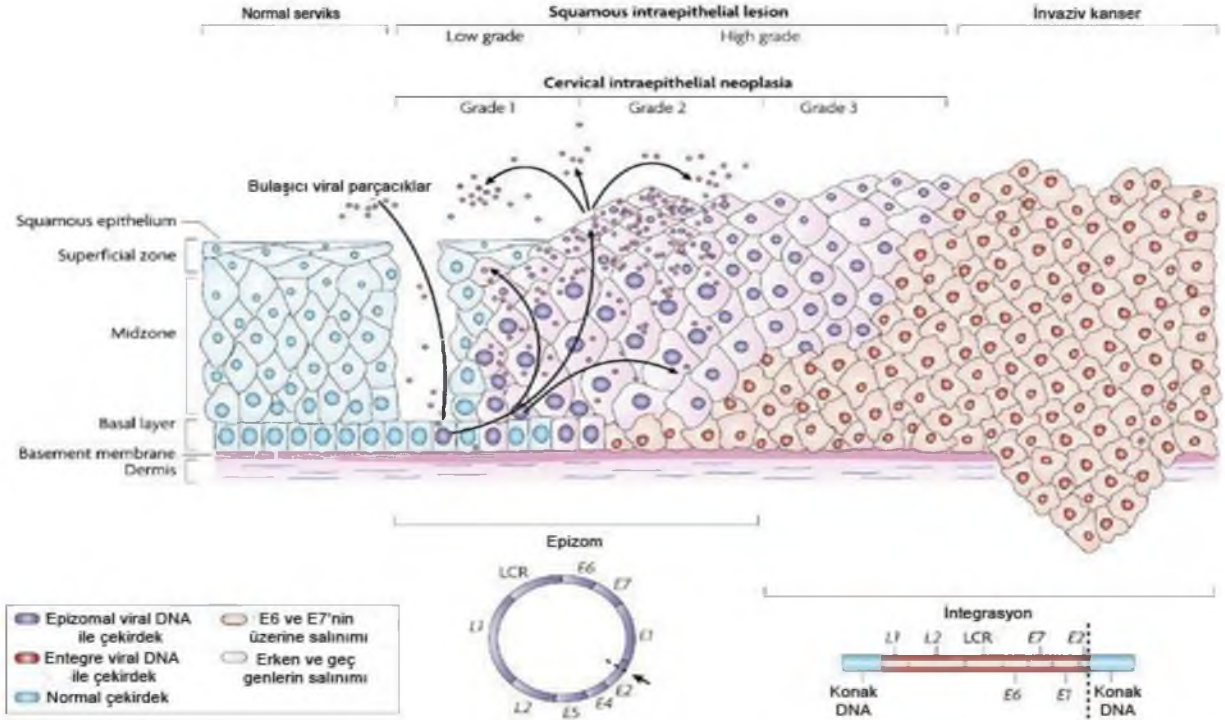
3.1.9.3. Servikal Displazi ve Neoplazi

HPV ile servikal kanser arasındaki ilişki ilk defa 1977 yılında zur Hausen tarafından bildirilmiştir. Servikal kanser, prekanseröz lezyonların erken tespiti ve tedavisi ile büyük ölçüde önlenilebilir bir hastalıktır. Servikal kanser, skuamöz intraepitelyal lezyon (SIL) veya servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) denilen prekanseröz lezyonlardan gelişir. Prekanseröz lezyonlar epiteldeki atipik değişikliklere göre düşük grade (low grade SIL; LSIL) ve yüksek grade (high grade SIL; HSIL) skuamöz intraepitelyal lezyonlar olmak üzere gruplandırılır. CIN 1 LSIL'e, CIN 2 ve CIN 3 HSIL'e dahildir. Servikal prekanseröz lezyonların diğer bir histopatolojik sınıflandırmasında ise CIN 1 hafif displazi, CIN 2 orta displazi, CIN 3 ağır displazi ve karsinoma insitu lezyonlarına karşılık gelir (Şekil 10) (56).

Özellikle HPV tip 16 ve 18'in serviks kanseri etiyolojisinde rol oynadığı, epidemiyolojik ve moleküler biyolojik verilere göre kesinlik kazanmıştır. Servikal displazi ve servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) ve primer kondilloma lezyonlarının çoğunda bu tipler yanında HPV tip 31 ve 45 de saptanmıştır.

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 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 (Şekil 10).



Şekil 10. HPV- SIL / HPV- CIN arasındaki ilişki.

3.1.9.4. Diğer Kanserler

Anogenital kanser, baş ve boyun kanserleri, melanom dışı deri kanserleri, mesane kanserleri, prostat kanserleri (54,55,56,57).

3.1.10. HPV İnfeksiyonlarının Tanısı

Servikal kanser kadın genital sisteminin en sık görülen kanserlerden birisidir. Bazen tüm vakaların %95-100'ünde HPV saptanabilmektedir. HPV infeksiyonunun 25 yaşın altındaki kadınlarda %28-46 arasında olduğu bildirilmiştir. Vakaların büyük bir kısmında HPV infeksiyonu geçicidir ve servikal mukozada klinik önemi olan lezyonlara sebep olmazlar. HPV-DNA çalışmaları servikal kanser taramaları için önemlidir, fakat klinik olarak etkili sonuç alınması çeşitli moleküler, biyolojik ve klinik faktörlere bağlıdır. HPV testi ASCUS'lu hastaların yönetiminde kabul edilmiştir ve servikal kanser taramasında 30 yaş üstü hastalarda servikal sitoloji ile birlikte artarak kullanılmaktadır. Ancak HPV testinin daha genç kadınların servikal kanser taramaları için veya düşük dereceli sitolojik anormalliklerin yönetiminde kullanımını sınırlıdır (58).

3.1.10.1. Sitolojik test

Servikal sitoloji testi kanser taramasında çok etkilidir, fakat klinik olarak önemi olan lezyonlarda sensitivitesi sınırlıdır ve yüksek yanlış negatif sonuç verebilir. Kolposkopik biyopsi önceleri altın standart olmasına rağmen son çalışmalarda servikal biyopsinin tanı veya örnekleme hatalarından dolayı yüksek dereceli lezyonların %33-50'sinin gözden kaçırılabilceği belirtilmiştir. Bundan dolayı yanlış pozitif servikal sitoloji sonuçlarına karşı, yanlış negatif biyopsi sonuçları arasında ayırım yapmak zor olabilir (59).

Bu sebeple yüksek dereceli lezyonlar ve karsinomanın tespit edilmesi için servikal sitolojinin sensitivitesini arttıran ve yanlış negatif sonuçları azaltan moleküler tanı yöntemlerinde uygulanmasına ihtiyaç vardır. Bu çalışmada kullanılan Pyrosequencing yöntemi bir çok mikrobiyal etkenin tanısı ve özellikle de genotipleri çok olan etkenlerin doğrudan tiplendirilmesinde kullanılan yeni bir yaklaşımdır. Pyrosequencing kısa sürede sonuç veren ve duyarlılığı yüksek en son geliştirilmiş olan yöntemdir.

3.1.10.2. HPV Testi

American Society for Colposcopy and Cervical Pathology Konseyine göre ASCUS'lu hastaların yönetiminde ek olarak HPV testinin kullanımını desteklemektedir, fakat diğer anormal servikal sitoloji sonucu olanlarda HPV testinin kullanımını önerilmemektedir (60). HPV infeksiyonlarının tanısı, hücresel örneklerde HPV'un tespiti ile mümkündür. Tüm HPV taramaları için klinik geçerlilik gereklidir. FDA iki HPV tarama metodunu onaylamıştır. Birçok HPV taraması kolposkopik biyopsi veya FDA onaylı ilk test olan HCII (Hybrid capture 2) test ile yapılır. İkinci onay alan test 2009 yılında HPV Invader testtir. HPV tanısı için 3 ana metod vardır. Bunlar direk hibridizasyon yöntemleri (Southern blot, dot blot, in situ hybridization), sinyal amplifikasyon testi (HCII) ve nükleik asit amplifikasyon (PCR) testleridir (60,61,62).

3.1.10.3. Direkt Hibridizasyon

In situ hibridizasyon hem parafine gömülü doku örnekleri hem de servikal yaymalarda HPV antijenlerinin veya nükleik asitin (DNA veya mRNA) spesifik proplar ile birleşmesi temeline dayanmaktadır. Biotinlenmiş proplar, rutin olarak kromojenik substratlar ile saptanabilir ve yöntem klinik kullanımlar için otomatize edilmiştir. Bununla birlikte örnek toplama, saklama veya işlem sırasında hedef nükleik asit kaybı teknik için önemli bir sınırlayıcı etkidir. Çoğu ticari olarak kullanılan DNA proplarında HPV tiplendirilmesi için gruplandırılmış proplar bulunmaktadır (61). In situ hibridizasyonun avantajı, spesifik hücrelerde HPV infeksiyonunu tanımlayabilmesi ve aynı zamanda fiziksel durumunun belirlenebiliyor olmasıdır. Fiyat en önemli dezavantajdır (63).

3.1.10.4. Sinyal amplifikasyon testi

HPV tanısı için FDA onayı almış ilk test Hybrid Capture II (HCII) testidir (Digene, Gaithersburg, Md). Bu günümüzde en çok kullanılan klinik onay almış yöntemdir. Bu

yöntem solüsyon bazlı hibridizasyona dayanan sinyal amplifikasyon metodudur. Bu yöntemde 13 yüksek riskli (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, ve 68) ve 5 düşük riskli (6, 11, 42- 44) HPV-DNA hedefleriyle reaksiyona giren RNA problemleri kullanılır. Bu DNA-RNA hibridleri monoklonal antikorlar ile yakalanır ve antihibrid antikorları ile saptanır. HC II yöntemi sadece yüksek riskli ve düşük riskli HPV tiplerinin tanınması için dizayn edilmiştir ve spesifik tipleri belirleyemez, ancak yüksek riskli veya düşük riskli tiplerden en az birinin var olduğunu gösterebilir, bu durum yöntem için önemli bir sınırlayıcıdır çünkü genotiplendirme dirençli yüksek riskli tiplerin varlığını belirleyebilmektedir ve bu da servikal kanser oluşumu için risk faktörüdür. Spesifik HPV tiplerine karşı tedavi şimdilik yoktur, aşı ise sadece bazı tiplere karşı koruyucudur. Bu metodun avantajları; kullanım kolaylığı olması ve laboratuvarlar arası çoğaltılabilirliğin sağlanabilmesidir. HC II yöntemi, enzyme-linked immunosorbent assays (EIA) kullanımına benzer 96 kuyucuklu mikropak formatında kullanılmaktadır ve klinik laboratuvarlarında oldukça sık uygulanmaktadır (61,64).

3.1.10.5. Nükleik asit amplifikasyon testi

PCR HPV tanısı için en çok kullanılan ve en sensitif testtir. HPV-DNA'nın küçük parçalarını amplifiye eder, böylece daha az doku ve hücre örnekleri veya daha az viral kopya ile test yapılmasını sağlar. Hedef DNA dizisi yaklaşık 1 saat içerisinde 1 milyon kez çoğaltılabilir. Tüm PCR yöntemleri örnek hazırlama ve PCR reaksiyonları için farklı laboratuvarlara ihtiyaç duymasına rağmen geniş çaplı klinik çalışmalar için uygundur. PCR yönteminin, tip spesifik ve konsensus testler olmak üzere 2 ana tipi vardır. Tip spesifik test tek bir HPV genotipinin amplifikasyonu için dizayn edilmiştir. Multiple PCR reaksiyonları böylelikle ayrı ayrı uygulanabilir, ancak her örnek için zaman ve fiyat artar (65,66). Konsensus testler ise HPV tiplerinin büyük bir kısmının tanınmasına olanak sağlar. Primerler farklı tiplerdeki belirli bölgeleri hedeflemek için dizayn edilmiştir. L1 iyi korunan

bir bölgedir ve HPV tiplerinin klasifikasyonu için kullanılır (67). HPV DNA'nın PCR ile amplifikasyonundan sonra HPV'un tipi, nükleik asit hibridizasyon, restriksiyon endonükleaz veya dizi analizi ile tanımlanabilir. Nükleik asit hibridizasyonu HPV tiplendirilmesinde en çok kullanılan yöntemdir. Çeşitli çalışmalar reverse hibridizasyon yöntemlerini değerlendirmiş ve bu yöntemler arasında tek infeksiyon için yüksek korelasyonu göstermiştir. INNO-LiPA testi (Innogenetics, Temse, Belgium), kullanılan SPF10 primerlerinin kısa PCR ürünleri oluşturmasından dolayı multiple infeksiyonlar için yüksek sensitiviteye sahiptir. Roche Diagnostics AmpliCor HPV testi biyotin ile işaretli L1 primerlerini kullanan Line blot hibridizasyon yöntemidir. Bu AmpliCor HPV testi yüksek riskli HPV tiplerinin 13'ünü, daha ileri versiyonları yüksek ve düşük riskli tiplerin 37'sini tanıyabilir. Aynı zamanda insan β globin genini belirleyebilir. Digene HCII yöntemi ile Roche AmpliCor HPV testi karşılaştırılmış, her iki testinde güvenilir sonuçlar verdiği, ancak HPV ampliCor testinin sensitivitesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. HPV ampliCor testi pahalıdır ve sadece gelişmiş laboratuvarlarda kullanılmaktadır (61,62,68).

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) çeşitli endonükleazlar kullanarak, DNA'yı spesifik baz çiftlerinden keser ve agaroz jel elektroforezi ile tespit edilebilen her biri farklı boyutlarda bantlar oluşturur. RFLP pahalı olmamasına rağmen uğraştırıcı bir yöntemdir, aynı zamanda manuel teknik olmasından dolayı her deneyde farklı sonuçlar alınabilir (69).

Dizi analizi pahalı olmasına rağmen, örneklerin rutin analizi için hızlı bir yöntemdir. Dezavantajı ise multiple HPV tiplerinde sensitivitesinin düşük olmasıdır. Klinikte HPV genotiplendirmesi için rutin olarak uygulanan bir yöntem değildir.

HPV tanısında kullanılan testlerin avantaj ve dezavantajları Tablo 4'de kıyaslanmıştır.

Tablo 4. HPV tanı yöntemlerinin karşılaştırılması.

YÖNTEM	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
Southern Blot		Sınırlı klinik uygulama
		Karmaşıklık
		Standardizasyonu zor
FISH		Yeterince duyarlı değil
		Tip tayini yanlışlıkları
		Hatalı sonuçlar
Vira-Pap/ Vira-Type		Çok pahalı ve zahmetli
HPV Profile	14-16 tip için probu var	Çok pahalı ve zahmetli
	Kullanılabilirliği yüksek	Analitik duyarlılığı az
Hybrid capture	Duyarlılığı yüksek	Özgüllüğü düşük
	Kısa sürede uygulanabilir	
	Kantitatif	
	Ucuz	
PCR	Tüm HPV tiplerini saptama	Kontaminasyon riski yüksek
DNA Dizi analizi	Altın standart	Kullanılabilirliği düşük Pahalı, hassas

3.1.11. HPV İnfeksiyonlarında Tedavi ve Korunma

Human papillomavirus vücuda girdikten sonra infeksiyon çoğunlukla subklinik olarak seyreder. Olguların % 60'ında seropozitif, %10'unda DNA pozitifliği, %1'inde belli kondillomlar oluşmaktayken %25'inde infeksiyon tanınmamaktadır. Düşük riskli HPV tiplerinde ortalama taşıyıcılık süresi 4 ay iken yüksek riskli HPV tiplerinde 8 aydır. HPV infeksiyonları % 80 oranında tek tip HPV ile oluşturulur. İnfeksiyon lokal immün yanıt oluşturarak iyileşir. HPV testlerinin negatifleşmesi iyileşme kabul edilir. Ancak virusun tamamıyla eradikasyonu pek mümkün değildir, çünkü bazal epitelyumda latent olarak virus saptanabilmektedir.

Aynı HPV tipiyle infeksiyonun devam etmesi persistan hastalığı gösterir. Persistans için gerekli süre 12 ay olarak kabul edilmektedir (76).

3.1.12. HPV Aşıları

HPV infeksiyonuna karşı immunizasyonun esas amacı genital kanser insidansını düşürmektir. Bu aşılama ile HR HPV genotiplerine karşı immunitiyi uyarmak ile gerçekleştirilebilir, dolayısıyla bu HPV tipleri ile infeksiyonun önlenmesi sağlanmış olur (18). HPV aşıları profilaktik ve terapötik aşılardan olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Aşı çalışmaları 1993 yılından günümüze kadar yapılmaktadır. Bu zamana kadar yapılan çalışmaların çoğu profilaktik aşılardan ilgilidir (77,78). HPV gibi hastalık etkeni viral ajanların tanımlanması hastalığın önlenmesi için koruyucu ve tedavi edici yöntemlere yönelik yeni olanaklar sağlamıştır. HIV ve İnfluenza gibi bazı viral etkenlerin tedavisi için başarılı antiviraller geliştirilmiştir fakat HPV gibi virüslere karşı antiviral yoktur. HPV infeksiyonuna karşı tedavi edici aşı, kanserle ilişkili HPV komplikasyonlarının önlenmesi için son derece iyi olacaktır. Ancak devam eden çalışmalara rağmen HPV ve diğer virüslere karşı etkili yeterli immun cevap oluşturan bir tedavi edici aşı geliştirilememiştir (79). Persistan infeksiyon oluşturan yüksek riskli HPV infeksiyonlarında immünolojik çalışmaların çokluğu servikal kanserden aşı ile korunmaya yönelik umutları arttırmıştır. İlaç endüstrisinde HPV aşılarının üretimine yönelik ilk adım epidemiyolojik çalışmaların ortaya koyduğu deneysel kanıtlar ile atılmıştır. Günümüzde klinik olarak kullanılan aşılardan genelde virus benzeri partiküller formatındadır (80). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda aşılardan HPV 16'ya yakın suş olan HPV 31 ve HPV 18'e yakın suş olan HPV 45'in meydana getirdiği infeksiyonlarda da koruyuculuğu gösterilmiştir. Bu suşların oluşturduğu infeksiyonlarda aşılardan koruyuculuğu %80'dir (18). Geliştirilen aşılardan uygulanması ve servikal kanser taramaları birlikte yapılmalıdır, çünkü aşılardan kanser sebebi olan diğer

yüksek risk HPV tiplerine karşı (%25-30) koruma sağlamamaktadır. Dolayısıyla erken dönem servikal lezyonların belirlenmesi ve prognozu hala ciddi bir problemdir.

HPV aşuları profilaktik (koruyucu) ve terapötik (tedavi edici) aşular olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Günümüze kadar yapılmış olan aşı çalışmaları daha çok profilaktik aşular üzerine yoğunlaşmıştır. Profilaktik aşıda hedef, HPV infeksiyonunun oluştuğu bölgede etkin bir bağışık yanıt oluşturarak oluşacak infeksiyonu ve reinfeksiyonu önlemektir. Bu tür aşular özellikle HPV infeksiyonu riski taşıyan kişilerde oldukça faydalı gibi gözükmektedir. Bu özellikler göz önüne alındığında profilaktik aşı için HPV L1-L2, terapötik aşı için ise E6-E7 gen ürünleri ideal olarak görülmektedir (81).

3.1.12.1. Profilaktik aşular

HPV kapsid proteinleri yapısındaki VLP'lerden geliştirilmiştir. 3 tipi vardır.

Tip 1: Sadece L1'den oluşan VLP

Tip 2: L1ve 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 enfekte hücrelere etkin olacak ve hastalığın eliminasyonunu sağlayacaktır.

HPV'nin 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 epitoplari da içermektedirler (82,83). 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 oluşturmalarının 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 Th1 cevabı geliştiği gösterilmiştir (84).

3.1.12.2. Terapötik Aşılar

High risk HPV'lerin E6 ve E7 onkoproteinlerinden geliştirilmiştir. 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 kişilerdede aşılanmanın etkin olduğunun gösterilmesi aşılamada yeni bir ufuk açacaktır (85).

3.2. PYROSEQUENCING YÖNTEMİ

Pyrosequencing yöntemi bir çok mikrobiyal etkenin tanısı ve özellikle de genotipleri çok olan etkenlerin doğrudan tiplendirilmesinde kullanılan yeni bir yaklaşımdır (70,71). 1996'da Ronaghi ve arkadaşları tarafından "Sentez Yoluyla Dizileme" (sequencing by synthesis) prensibine dayalı "Pyrosequencing" metodunu geliştirilmiştir. Pyrosequencing metodu, en basit anlatımla DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesan bir enzim aracılığıyla tespitidir. Temel olarak dizileme reaksiyonu, dizilenecek DNA'nın tek sarmalı (ssDNA) üzerinde tamamlayıcı sarmalının (complementary DNA) sentezlenmesi şeklinde kendini gösterir (72). Bu yöntem kullanılarak, klonlama yapmaksızın, 7.5 saatte 100-500 milyon bazlık dizileme yapmak mümkündür. Bu sistemle daha önce yıllar alan dizileme projelerini haftalar içinde sonuçlandırmak mümkün kılınmıştır (73). DNA'nın çift sarmallı yapısını bulan Nobel ödüllü araştırmacı Dr. James Watson'ın genomu bu yöntemle dizilenmiştir. Yine Neandertal genomu ve nesli tükenen mamut türünün genomu bu yöntemlerle kısa sürelerde bütünüyle dizilenebilmiştir. Yöntemin avantajı bu tip kompleks

genomların haricinde, bakteri ve virüs gibi daha basit genomlarda bir gün içinde tüm genomun dizilenebilmesi ile ortaya çıkar (74).

3.2.1. Pyrosequencing ve Prensipleri

Sanger metodunda tek bir örneğin dizi analizini yapmak için dört paralel dizi analizi reaksiyonu kullanılmakta, elektroforez aşamasını içermekte ve oldukça uzun bir sürede tamamlanabilmektedir. İşte tüm bu bahsedilen dezavantajları ortadan kaldıracak yeni teknikler araştırılmaya başlanmış ve “Pyrosequencing” yöntemi geliştirilmiştir.

Günümüzde birçok araştırmacı Pyrosequencing adı verilen “single-nucleotide addition” (SNA) yani tek nükleotid eklenmesi yöntemi ile DNA analizi yapmaktadırlar. Pyrosequencing yöntemi ticari olarak bulunan ve Sanger metoduna alternatif olan tek sekanslama tekniğidir. Bu yöntem ile tek bazlık bir dizi analizinden, bütün genomun dizi analizinin yapılmasına kadar geniş spektrumda dizi analizi yapılabilmektedir.

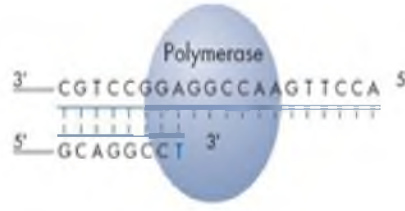
Pyrosequencing sentez yaparak dizi analizi yapma prensibine dayanır. DNA sentezi sırasında açığa çıkan pirofosfatların saptanması esasına dayanan bir real-time (gerçek zamanlı) kantitatif dizi analizi tekniğidir (75).

3.2.1.1. Pyrosequencing Aşamaları

İşlem PCR ürünlerinin tek sarmal DNA'ya (ssDNA) dönüşmesiyle başlar. Bir tek sarmal Pyrosequencing işleminde kalıp olarak kullanılmak üzere izole edilir. Herbir primer çifti genellikle biotin ile 5' ucundan işaretlenir.

1.Aşama:

Sekans primeri PCR ile çoğaltılmış olan bir ssDNA kalıbı ile hibridize edilir. Enzim olarak DNA polimeraz, ATP Sülfürilaz, lusiferaz ve apiraz kullanılır. Substrat olarak ise adenozin 5' fosfosülfat (APS) ve lusiferin ile inkübe edilir.



Şekil 11: Pyrosequencing birinci aşaması

2.Aşama:

4-deoksiribonükleotid trifosfat'lerden (dNTP) ilki reaksiyona ilave edilir. Eğer dNTP kalıp DNA'daki baz'a komplementer ise ortamda bulunan DNA polimeraz, bu dNTP'nin DNA sarmalına eklenmesini katalize eder. Yani karışımda bulunan dNTP'lerden biri ki bu DNA sarmalındaki ilk nükleotidin komplementeridir, bağlayıcı enzim olan DNA polimeraz yardımı ile DNA sarmalına 3' ucundan bağlanır.

Polimeraz aracılığı ile dNTP DNA kalıbına bağlanırken dNTP üzerindeki 2 adet fosfat açığa çıkar ve ortama 2 fosfatlı bir yapı olan pirofosfat Ppi ortama geçmiş olur. Herbir nükleotid eklenmesi ile pirofosfat (PPi) serbest kalır. Böylece eklenen nükleotid miktarı ile serbest pirofosfat'ın (PPi) miktarı orantılıdır.

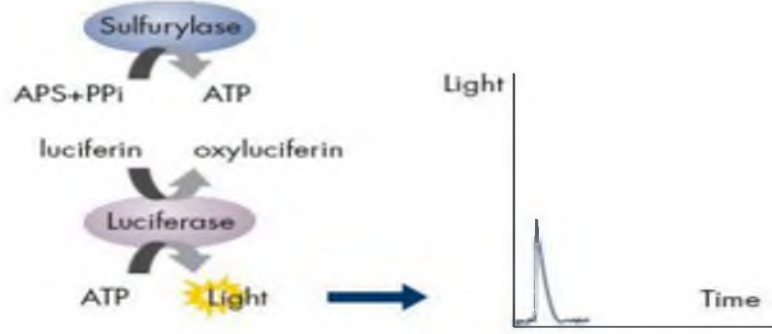


Şekil 12: Pyrosequencing ikinci aşaması

3.Aşama:

Adenosine 5' fosfosulfat (APS) varlığında ATP sulfurylase PPi'yi ATP'ye çevirir. ATP'nin ortamda bulunması lusiferin, lusiferaz enzimi aracılığı ile oksilusiferin'e dönüşür. Oksilusiferin ise görünür bir ışın yayar. Oluşan bu ışın miktarı ATP miktarı ile orantılıdır. Lusiferaz ile katalize edilmiş reaksiyon sonucu oluşan ışın CCD kamera ile tespit edilir ve

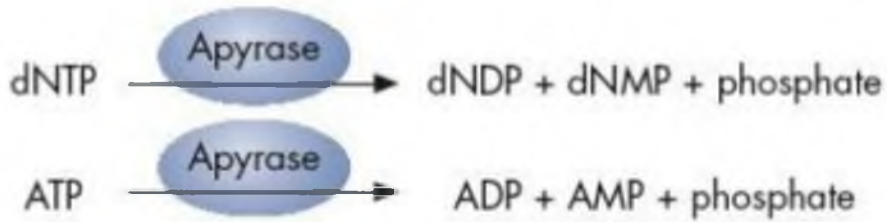
bir seri tepecik şeklinde görülür. Her bir tepeciğin yüksekliği (ışık sinyali) eklenmiş olan nükleotid sayısı ile orantılıdır.



Şekil 13: Pyrosequencing üçüncü aşaması

4.aşama:

Nükleotid parçalayan bir enzim olan apiraz (apyrase) devamlı olarak ATP'yi ve bağlanmamış olan dNTP'leri parçalar. Dolayısıyla ışık oluşumu kesilir ve reaksiyon çözümü yenilenmiş olur. Başka bir deyişle ortamda yeni reaksiyon oluşturacak dNTP ve ATP kalmamış olur ve ortam ikinci nükleotidin ilave edilmesine hazırlanmış olur. Bu teknoloji ile bir DNA parçacığının 100 nükleotidi kantitatif şekilde okunmuş olur.

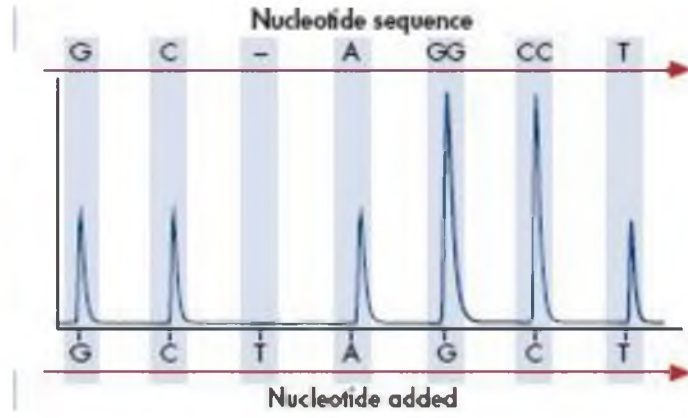


Şekil 14: Pyrosequencing dördüncü aşaması

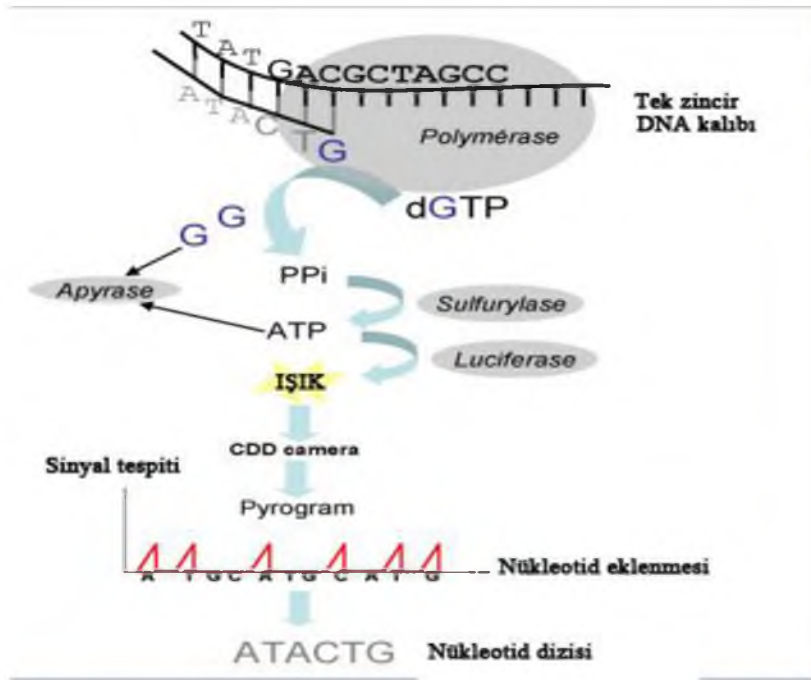
5.aşama:

Doğal dATP yerine deoksiadenozin alfa-tio trifosfat (dATPaS) kullanılmaktadır. İşlem devam ettikçe komplementer DNA sarmalı yapılı ve nükleotid dizisi *Pyrogram*'daki

sinyal tepciklerinden saptanır. *Pyrogram*'da iki kat yükseklik gösteren tepcikler iki nükleotidin bağlanması sonucu oluşur (75).



Şekil 15. Pyrosequencing beşinci aşaması



Şekil 16. Pyrosequencing tekniğinin prensip şeması

PCR aşamasından sonra Pyrosequencing, sekanslanacak baz sayısına bağlı olarak 10 dk. kadar kısa bir sürede sonuç verebilmekte ve kolaylık, eleman, zaman ve maliyet açısından da avantajlara sahiptir (75).



Şekil 17. Pyrosequencing aşamalarının ortalama süreleri

Halen bir PCR ürününün dizi analizi en hızlı yapan yöntem Pyrosequencing yöntemidir. Bu yöntemin tercih nedenleri uygulamasının basit, sonuçlarının değerlendirilmesinin kolay, hızlı ve real-time (gerçek-zamanlı) bir test olması, fazla sayıda örnekle yapılacak çalışmalarda fiyat ve zaman açısından da Sanger tekniğine göre daha avantajlı olmasıdır. Ayrıca Sanger tekniğindeki işaretli primerler, işaretli nükleotidler ve jel elektroforezine ihtiyaç olmaması bu teknolojinin diğer çok önemli avantajlarındandır.

3.2.2. Pyrosequencing yönteminin kullanım alanları

Pyrosequencing yöntemi son yıllarda havuz yapılmış örneklerde allel frekans analizi, metilasyon analizleri, moleküler haplotiplendirme, heteroplazmik DNA sekanslaması, adli tıp analizleri, bakteriyel tiplendirme, viral tiplendirme, fungal tiplendirme, insersiyon ve delesyon saptanmaları gibi çalışmalarında kullanılmaktadır.

Klinik araştırmaları da kolaylaştırmakta ve hızlandırmaktadır. Ayrıca, bu metot bitki ve hayvan çalışmalarında da kullanılmaktadır (75).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca onaylanan bu çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nın ortak katkılarıyla gerçekleştirildi.

4.1. Hastaların Seçimi, Örneklerin Toplanması ve Analize Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan materyaller Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D. Laboratuvarından arşiv taraması sonucu elde edilmiştir. Örnek gurubu, skuamöz intraepitelyal neoplazi, lowgrade, skuamöz intraepitelyal neoplazi, high grade, skuamöz karsinom insitü ve invaziv skuamöz karsinom olarak tanımlanan 38 (otuz sekiz) parafin blok seçilerek oluşturulmuştur. Patolojik olarak uterin servikal kanseri tanısı için rutin histopatolojik uygulamalardan, tespit (fiksasyon), takip (doku işleme), bloklama, kesme ve boyama işlemleri sırasıyla gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol gurubu olarak ise yaklaşık 10 adet tümör yapısı göstermeyen (non-neoplastik) uterin servikal doku örneği kullanılmıştır. Parafine gömülü dokulardan mikrotom ile 5- 10 µm kalınlığında 5- 6 adet kesit alınmış ve elde edilen kesitler 1,5 ml'lik steril ependorf tüplerine alınarak HPV tiplendirilmesi çalışmasında kullanılmak üzere Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında genotiplendirme işlemi yapılmaya kadar 4°C'de saklanmıştır.

4.2. Yöntemin prensibi

“**HPV sign**” ticari kiti kullanılarak genotiplendirme işlemi gerçekleştirildi. Bu kit ile klinik örneklerden HPV genotiplerinin yaklaşık 40 tanesi belirlenebilir. Swap, biyopsi veya dokulardan izole edilen HPV DNA'ları **Rotor-Gene™ 6000**” (Corbett Research) PCR cihazı ile çoğaltılır. Amplifikasyonun ardından **Melting Curve Analysis** yardımıyla tarama yapılarak Pyrosequencing ile genotiplendirme gerçekleştirilir. PyroMark Q96™ ID sistemi sentez yoluyla dizileme” (sequencing by synthesis) prensibine dayalı “Pyrosequencing”

metoduna göre çalışmaktadır. Pyrosequencing metodu, en basit anlatımla DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesan bir enzim aracılığıyla tespitidir. Temel olarak dizileme reaksiyonu, dizilenecek DNA'nın tek sarmalı (ss DNA) üzerinde tamamlayıcı sarmalının (complementary DNA) sentezlenmesi şeklinde kendini gösterir. Kitin içeriğinde genotiplere spesifik 30 baz çifti (bp) uzunluğunda **HPV 1 seq primer**, **HPV 2 seq primer**, **HPV 3 seq primer** ve **HPV 4 seq primer** olarak ifade edilen sekans primerleri yer alır. IdentiFire™ yazılımı, HPV kütüphanesini yani HPV genotiplerinin baz dizilişlerini içerir. Sekans sonucunda elde edilen baz dizileriyle kütüphanedeki dizileri karşılaştırır. “HPV sign” ticari kitiyle “PyroMark Q96 ID sistemiyle 30 baz çifti uzunluğundaki HPV'nin aşırı değişken genom bölgesinin sekansı sağlanır. Böylece HPV genotipleri belirlenir.

Tablo 5. Genotiplendirme için kullanılan kimyasal maddeler, sarf malzemeler ve cihazlar.

Kimyasal maddeler	Sarf malzemeler (60 reaksiyon için)	Cihazlar
<p>Parafin bloktan HPV DNA izolasyonu için; Qiagen REPLI-g FFPE DNA izolasyon kiti, Xylenes, Absolut etanol</p> <p>Amplifikasyon için; Taq polimeraz ve ilgili reaktifler; TaKaRaEx Taq™ R-PCR Custom, EvaGreen TMDye</p> <p>Sekanslama için; Streptavidin Sepharose™ High Performance, PyroMark Gold Q96 SQA Reagents (1x96), Absolut etanol</p>	<p>PyroMark Q96 Plate, PyroMark Q96 Kartuş, PyroMark Q96 Vakum hazırlık havuzu, PyroMark Vakum hazırlık filtre probu, Steril DNase ve RNasefree 1,5 ml polypropylene (PP) kilitli tüpler, Steril DNase ve RNase free 7 ml polypropylene (PP) tüpler, ayarlanabilir pipetler (1 µl-1000 µl arasında), ince duvarlı-düz kapaklı DNase ve RNasefree 0,2 ml PCR tüpleri, steril DNase ve RNasefree pipet uçları (1 µl-1000 µl arasında), Steril mezür (250 ml), pudrasız eldiven.</p>	<p>Amplifikasyon için; Rotor-Gene™ (Qiagen)</p> <p>Sekanslama için; PyroMark Q96 ID sistem (220-240V) (Qiagen), PyroMark Q96 vakum hazırlık iş istasyonu ve gerekli tüm aksesuarları, Mikroplate için santrifüj (hız: 1400 rpm), 2 adet ısı bloğu (çalışma dereceleri 90±2°C ve 60±2°C)</p>

4.3. Parafin Blok Kesitlerinden HPV DNA İzolasyonu

Örneklere DNA izolasyonu Qiagen REPLI-g FFPE DNA izolasyon kiti ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. İzolasyon protokolü aşağıdaki sıraya göre uygulandı.

1-Parafine gömülü doku bloğundan 5 ile 10 μ m kalınlığında bir doku parçası mikrotom üzerinde kesilerek mikrosantrifüj tüpü içine aktarılır.

2- FFPE Lysis solüsyonu (1x) hazırlanır. Karıştırılır ve kısaca santrifüj edilir.

3-İlk olarak elde ettiğimiz doku bölümüne 100 ul FFPE Lysis solüsyonu (1x) eklenir. Karıştırılıp ve kısaca santrifüj edilir.

4- Parafin eritmek için 10 dakika boyunca 95 ° C'de örnek inkübe edilir.

5-Örnekler oda sıcaklığına kadar soğumaya bırakılır. Bu aşamada, örneklerin sıvı kısmının yüzeyi üzerinde ince bir parafin ve doku tabakası oluşur.

6- 2 ul Proteinaz K. Miks eklenir ve kısaca santrifüj edilir.

7-Örnekler önce 60 °C'de 60 dakika boyunca ve daha sonra 95 ° C'de 10 dakika boyunca inkübe edilir.

8- Yeni bir mikrosantrifüj tüpü içine parçalanmış doku kesitinden 10 ul aktarılır.

9-FFPE master miks hazırlanır. Kısa bir vorteks ve santrifüj yapılır.

10- 8. maddede parçalanmış dokudan elde edilen 10 ul DNA üzerine 10 ul FFPE master miks karışımı eklenir. Kısa bir vorteks ve santrifüj yapılır.

11-Örnekler 24 ° C'de 30 dakika boyunca inkübe edilir. Bu aşamada, doku kesitlerinden hazırlanan DNA fragmentleri yüksek molekül ağırlıklı DNA oluşturmak için rastgele bağlanır.

12- 95 ° C'de 5 dakika boyunca inkübe edilerek reaksiyon durdurulur ve sıcaklık thermal cycle veya buz kullanarak 4 ° C'ye düşürülür.

13-REPLI-g master miks hazırlanır.

14- 12. maddede hazırlanan denatüre DNA üzerine 30 ul REPLI-g master miks eklenir. Kısa bir vorteks ve santrifüj yapılır.

15- 30 ° C 'de 2 saat boyunca (standart bir reaksiyon) veya 8 saat boyunca (yüksek verimli reaksiyonu) inkübe edilir.

16- 95 ° C'de 10 dakika boyunca inkübe edilerek reaksiyon durdurulur.

17-Amplifiye edilmiş DNA daha sonra ki uygulamalar için kullanılabileceği kadar -20 ° C'de saklanır.

Tablo 6. Kit içeriğinde yer alan primer gurupları.

HPV 1 seq primer	2 x 60 µl (HPV'nin değişken genomik bölgeleri için)
HPV 2 seq primer	2 x 60 µl (HPV 18, HPV 31 ve HPV 58'e spesifik)
HPV 3 seq primer	2 x 60 µl (HPV 16'ya spesifik)
HPV 4 seq primer	2 x 60 µl (HPV 31, HPV 33, HPV 39, HPV 42, HPV 52 HPV 73'e spesifik)

Tablo 7. HPV tiplendirme işleminde kullanılan HPV seq primerleri

HPV tipi	HPV seq primer	Doğru genotip için gerekli bitişik en az baz çifti (bç) uzunluğu.
HPV 16	HPV 1 seq primer	17
	HPV 3 seq primer	12
HPV 18	HPV 1 seq primer	17
	HPV 2 seq primer	12
HPV 33	HPV 1 seq primer	15
	HPV 4 seq primer	19

4.4. HPV DNA PCR Aşaması

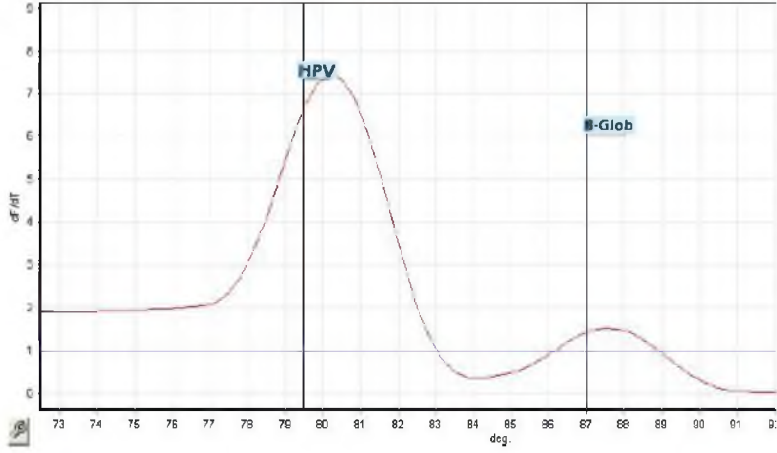
Elde edilen HPV DNA'ları ve yukarıda belirtilen primerler kullanılarak PCR kurulmuştur. PCR ile çoğaltılan her DNA'nın içinde, insan β -globin geni ile birlikte HPV'nin korunmuş bir genomik bölgesinin bulunması gereklidir. Bu nedenle kitte bulunan HPV / β -globin primerleri internal (iç) kontrol olarak kullanılmıştır.

PCR için master miks hazırlanırken her bir örnek başına 20 μ l 5x R-PCR buffer (Mg^{2+}), 2 μ l dNTP Miks (Her bir dNTP'den 10 mM), 3 μ l 50 mM Mg^{2+} Solüsyon, 1 μ l ExTaq HS (5U/ μ l), 5 μ l Eva GreenDye (20x in water), 3 μ l HPV/ β -globin primeri ve 56 μ l su kullanılmıştır. Örnek başına 90 μ l miks elde edildi. Elde edilen bu miks pipet yardımıyla karıştırılırdı. Reaksiyon tüplerinin her birine 90 μ l miks eklendi. Negatif kontrol olarak 10 μ l su kullanıldı. Örnek olarak elde edilen HPV DNA'sından 10 μ l kullanıldı. PCR işlemi için toplam 3 grup pozitif kontrol kullanıldı. HPV 1/2 pozitif kontrolden 10 μ l, HPV 3 pozitif kontrolden 10 μ l ve HPV 4 pozitif kontrolden 10 μ l kullanılmıştır. Toplam reaksiyon hacmi 100 μ l olmuştur. Tüpler Rotor-GeneTM 600 cihazının içine transfer edildi.

Rotor-GeneTM 600 cihazı içerisindeki örnekler için PCR protokolü şu şekilde uygulanmıştır (86).

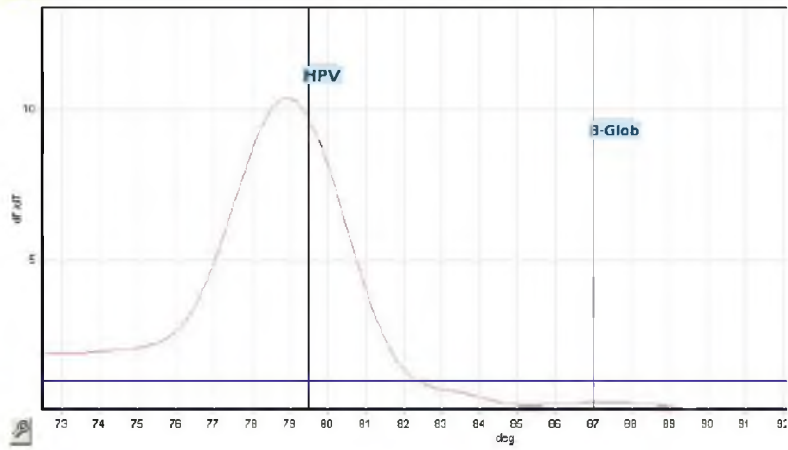
Denatürasyon	94°C'de 1 dakika	
Bağlanma ve uzama	94°C'de 1 dakika 40°C'de 2 dakika 72°C'de 1,5 dakika	40 Döngü
Final uzaması	72°C'de 5 dakika	

PCR sonrasında elde edilen HPV DNA açısından pozitif (+) olan örnekler için sekans işlemine geçilir. Aşağıdaki grafiklerden faydalanarak HPV DNA açısından pozitif (+) veya negatif (-) olarak değerlendirme yapıldı.



Örnek uygunluğu: UYGUN, Doğru sonuç: HPV Pozitif
HPV : + β Glob : + , Genotip: HPV Pozitif

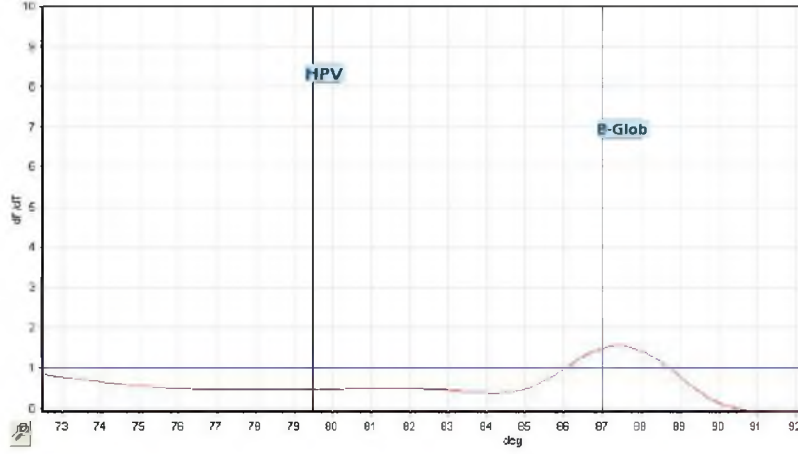
Şekil 18. HPV (+), β Glob (+) PCR grafiği.



Örnek uygunluğu: UYGUN, Doğru sonuç: HPV Pozitif ,Orta/Yüksek HPV
Konsantrasyonu

HPV : + β Glob : - , Genotip: HPV Pozitif

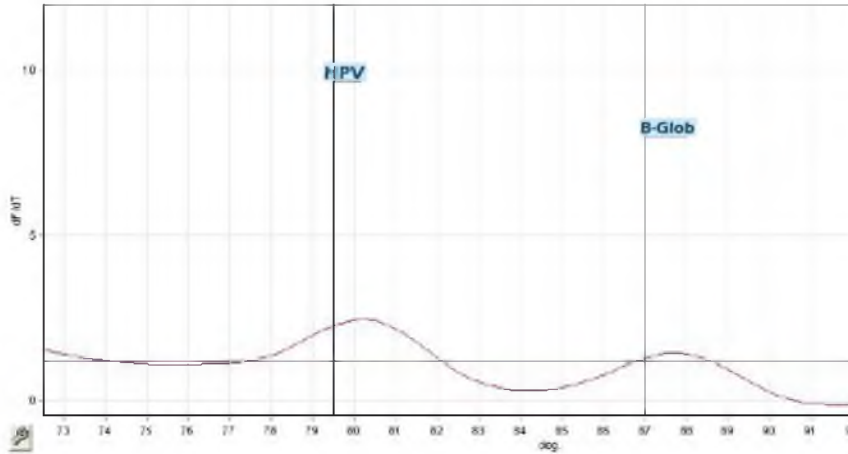
Şekil 19. HPV (+) , β Glob (-) PCR grafiği.



Örnek uygunluğu: UYGUN, Doğru sonuç: HPV Negatif veya HPV Konsantrasyonu sistem değerlerinin altında

HPV : - β Glob: + , Genotip: HPV Negatif

Şekil 20. HPV (-) , β Glob (+) PCR grafiği.

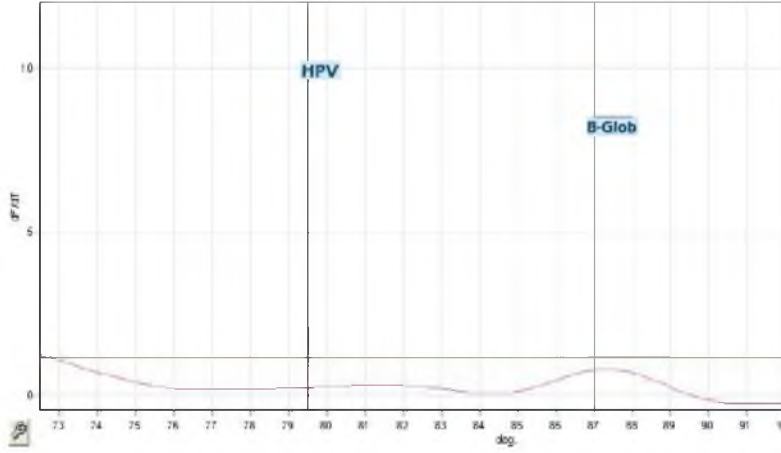


Örnek uygunluğu: UYGUN, Doğru sonuç: HPV DNA'sı ve insan DNA'sı tespit edildi.

Düşük konsantrasyonunda HPV pozitif

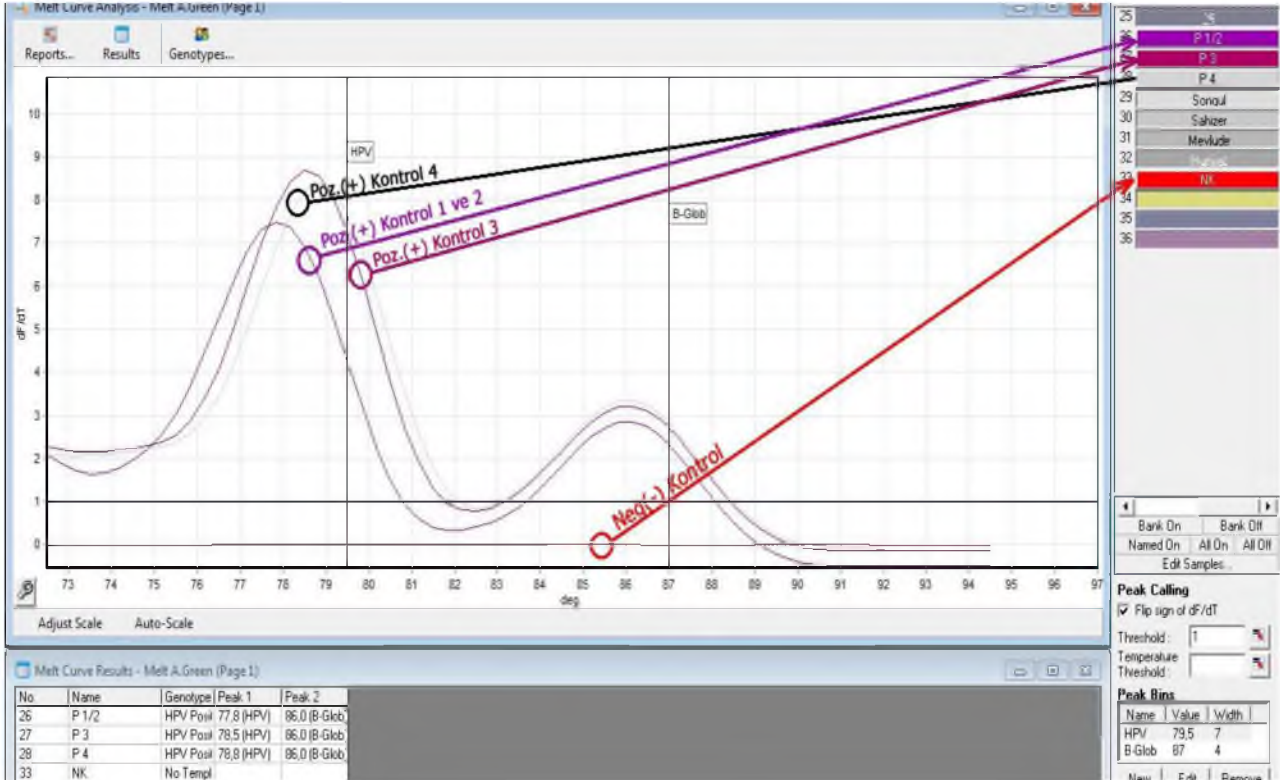
HPV: + β Glob: + , Genotip: HPV Pozitif

Şekil 21. HPV (+), β Glob (+) PCR grafiği.



Örnek uygunluğu: UYGUN DEĞİL, Sonuç yanlış: DNA tespit edilemedi
 HPV : - β Glob : -, Genotip: No template (HPV DNA'sı açısından negatif)

Şekil 22. HPV (-), β Glob (-) PCR grafiği.



Şekil 23. Negatif ve Pozitif Kontrollerin birlikte gösterildiği PCR grafiği.

5. BULGULAR

Çalışmada kullanılan örnek gurubunda 38 (otuz sekiz) adet uterinservikal kanser tanısı konulmuş hasta yer almıştır (n=38). Bu hastaların yaş aralığı 25-65'dir.

Patolojik olarak skuamöz intraepitelyal neoplazi, low grade, skuamöz intraepitelyal neoplazi, high grade, skuamöz karsinoma insitü ve invaziv skuamöz karsinoma tanımlanan hastalar örnek gurubunu oluşturmuştur. İki hastaya ait patoloji bilgisine ulaşılammıştır.

PCR işlemi sonrasında 38 adet örnekten 35 tanesinin HPV DNA'sı içerdiği belirlenerek Şekil 18, Şekil 19 ve Şekil 21 ile bu PCR sonuçları gösterilmiştir. Bu 35 örneğin HPV genotipleri Pyrosequencing işlemi sonucunda belirlenmiştir. Kalan 3 örnek ile negatif kontrol grubundaki tümör yapısı göstermeyen (non-neoplastik) servikal doku örneklerinin ise HPV DNA'sı içermediği görülmüş ve sekans işlemi dışında bırakılmıştır. Negatif olarak değerlendirilen bu örneklere ait PCR sonuçları Şekil 20, Şekil 22 ve Şekil 23'de ifade edilmiştir.

28 hasta tek bir HPV tipi ile enfekte iken 7 hasta birden fazla HPV ile enfekte olarak tespit edilmiştir.

Hastanın patolojik bulgusu, HPV genotipleri ve toplam hasta sayısındaki yüzdeleri Tablo 8, 9 ve 10'da özetlenmiştir. Bu sonuçlar Şekil 24'de ise grafik olarak da sunulmuştur.

Tablo 8. Hastanın patolojik bulgusu, HPV genotipleri ve toplam hasta sayısındaki yüzdeleri.

PATOLOJİ	SAYI	YÜZDE (%)	HPV GENOTİPİ	SAYI	YÜZDE (%)
CIN II	7	18,42	HPV 16	7	100
			HPV 16	5	71,4
CIN III	7	18,42	HPV 16 + HPV 16 African type 1	2	28,6
			HPV 16	3	60
Serviks epidermoid karsinom	5	13,15	HPV 18	1	20
			HPV 16 + HPV 16 African type 1	1	20
CIN I	4	10,52	HPV 16	4	100
			HPV 16	3	75
Skuamoz hücreli karsinom	4	10,52	-	1	25
CIN II, kronik servisit	2	5,26	HPV 16	2	100
CIN I, CIN II	1	2,63	HPV 16	1	100
CIN I, CIN II, karsinoma insitu, kronik servisit	1	2,63	HPV 16 African type 1 + HPV 16 African type 2	1	100
CIN III, karsinoma insitu	1	2,63	HPV 16 + HPV 16 African type 1	1	100
CIN III, karsinoma insitu, kronik servisit	1	2,63	HPV 16 + HPV 33 IS 827 izolatu	1	100
Karsinoma insitu, kronik servisit	1	2,63	-	1	100
CIN I, kronik servisit	1	2,63	-	1	100
Mol hidatiform	1	2,63	HPV 16 + HPV 16 African type 1	1	100
			HPV 16	1	50
Patoloji bilgisi olmayan	2	5,26	HPV 16 + HPV 18	1	50
TOPLAM	38	100		38	

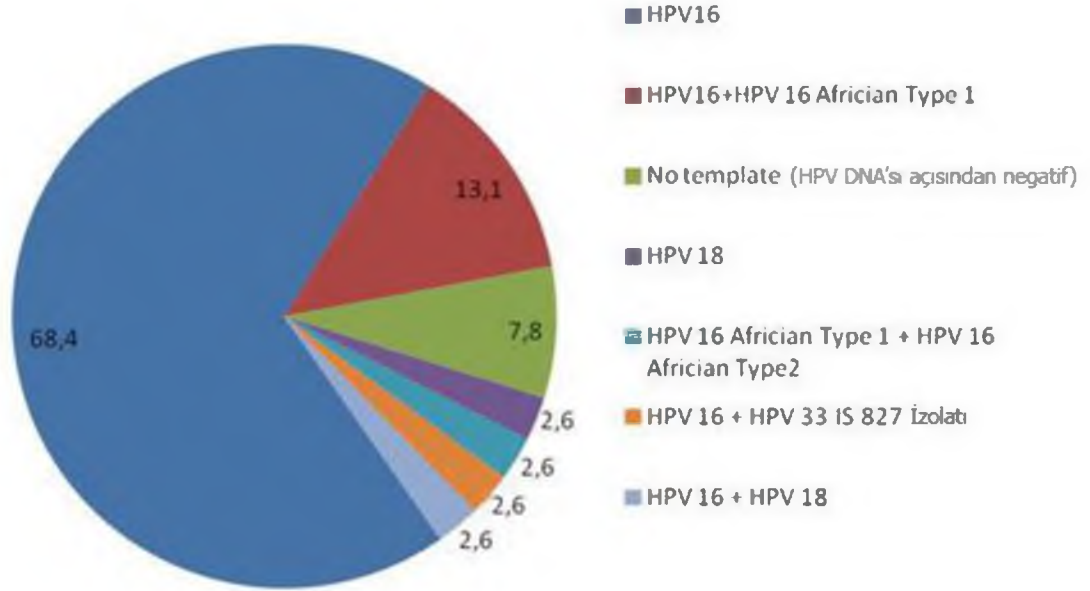
Tablo 9. HPV genotiplerinin yüzde (%) olarak dağılımı.

HPV GENOTİPİ	SAYISI	YÜZDESİ (%)
HPV 16	26	68,4
HPV 16 + HPV 16 African type 1	5	13,1
No Template (HPV DNA'sı içermeyen Neg (-) örnek)	3	7,8
HPV 18	1	2,6
HPV 16 Africian Type 1 + HPV 16 Africian Type2	1	2,6
HPV 16 + HPV 33 IS 827 izolatu	1	2,6
HPV 16 + HPV 18	1	2,6
TOPLAM	38	100

Tablo 10. Bir veya daha fazla HPV tipi ile enfekte hastaların dağılımı.

HPV GENOTİPİ	SAYI	YÜZDE (%)
Tek HPV tipi ile enfekte hasta sayısı	28	80
Birden fazla HPV tipi ile enfekte hasta	7	20
TOPLAM	35	100

GENEL HPV GENOTİP DAĞILIMI (%)



Şekil 24. HPV Genotiplerinin grafik olarak gösterimi.

Dört örneğin Pyrosequencing değerlendirilmesi ve elde edilen sonuçlar Şekil 25-28'de gösterilmiştir.

Hit 1:	Human papillomavirus type 16
Score:	100
Identities:	30/30 (100%)
Gaps:	0/30 (0%)
Query	1 ACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGC 30
Library	1 ACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGC 30

Şekil 25. HPV 16 Genotipi Pyrosequencing sonucu.

HPV 18	Hit 1:	Human papillomavirus type 18
	Score:	100
	Identities:	30/30 (100%)
	Gaps:	0/30 (0%)
	Query	1 TCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTC 30
	Library	1 TCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTC 30

Şekil 26. HPV 18 Genotipi Pyrosequencing sonucu.

HPV 16 + HPV 18 Süper Enfeksiyon	Hit 1:	Human papillomavirus type 16
	Score:	100
	Identities:	30/30 (100%)
	Gaps:	0/30 (0%)
	Query	1 AACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGA 30
	Library	1 AACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGA 30
	Hit 1:	Human papillomavirus type 18
	Score:	100
	Identities:	30/30 (100%)
	Gaps:	0/30 (0%)
	Query	1 CAATATGATGCTACCAAATTTAAGCAGTAT 30
	Library	1 CAATATGATGCTACCAAATTTAAGCAGTAT 30

Şekil 27. HPV 16 + HPV 18 Süper enfeksiyon Genotipi Pyrosequencing sonucu.

6. TARTIŞMA

Servikal kanserin primer sebebi olan HPV, cinsel yolla bulaşan en yaygın enfeksiyonlardan birisidir. Kadınların yaşamları boyunca HPV'ye yakalanma riski %50'den fazladır. Genç kadınlardaki HPV enfeksiyonlarının %70-90'ı geçici olup genellikle klinik belirti görülmeden 1-2 yıl içerisinde iyileşirken %10'undan azında ise persisten enfeksiyon gelişir. High risk (HR) HPV DNA'sının bir yıl'dan uzun bir süre tespit edilmesi persisten enfeksiyonun göstergesidir ve bu enfeksiyon prekanseröz lezyon ve servikal kanser gelişiminin en büyük risk faktörüdür. Buna rağmen displaziye ilerleyen enfeksiyonların bile büyük bir kısmı iyileşir. Low-grade lezyon CIN I'in %50-60'ı, high-grade lezyon CIN 2'nin %30-40'ı geriler. Buna göre HPV enfeksiyonunun kontrolünde immun cevap oldukça etkilidir. HPV ile enfekte olan kişilerin %1'inden daha azında servikal kanser gelişir. Genital mukozayı 40'tan fazla HPV tipi enfekte eder. Bu tipler servikal kanserle ilişkilerine göre düşük risk (low risk-LR) ve yüksek riskli (high risk-HR) HPV tipleri olarak iki guruba ayrılır. HPV 6 ve HPV 11 tipleri LR gurubunda yer alıp genital siğillerin %90'dan fazlasının sorumlusudur. HR grubunda servikal mukozayı enfekte eden en az 15 onkojenik tip vardır. Servikal kanser örneklerinden en çok izole edilen HPV tipi %53.5 oranla HPV tip 16'dır. Daha sonra %17'lik oranla HPV tip 18 gelir. HPV 16 ve HPV 18 bütün servikal kanserlerin %70'inden sorumludur. HPV 45 sıralamada üçüncü sırada yer alırken HPV tip 31 ise dördüncü sıradadır. Bütün servikal kanserlerin %80'inde bu dört HPV tipi tespit edilmiştir (87). HPV enfeksiyonu için en riskli grup cinsel olarak aktif genç erişkinlerdir. Epidemiyolojik çalışmalara göre HPV prevalansının 18-25 yaş arası genç kadınlarda en yüksek olduğu görülmektedir (56).

HPV genotiplerinin saptanması epidemiyolojik olarak önemli olup klinik seyrin

ve tedavinin planlanması açısından oldukça faydalıdır. Bu çalışmada kadınlarda dünyada göğüs kanserinden sonra ikinci sırada yer alan servikal kanser ile mücadele etmek için hızlı bir şekilde HPV genotiplerinin belirlenmesini ve buna göre bir sonraki tedavi aşamasının planlanmasını kolaylaştıracak olan pyrosequencing yönteminin avantajlarını göstermek amaçlanmıştır.

HPV ile ilgili Türkiye'deki ilk çalışmalardan birisi Vardar ve ark. 1994 yılında 176 hastada yaptıkları çalışma olup benign servikal lezyonlarda yapılan LEEP materyalinde immünperoksidaz boyaması yapılmış %16.4'ünde HPV pozitifliği bulunmuş olup Pap smear lerde ki HPV pozitiflik oranları ise %5.6 olarak tespit edilmiştir (88).

1997 yılında Güney ve ark. çalışmasında 21 gebe kadında servikal brush ile örnek alınmış, 20 kondilom veya displazik lezyonu olan kadının parafin örneklerinde DNA insitu hibridizasyon (DISH) ve PCR ile çalışılmıştır. Gebe kadınların 2'sinde (%9.5) PCR ile HPV tespit edilmiş olup biopsi örneklerinde ise DISH ile %30 ve PCR ile %45 HPV tespit edilmiştir (89).

2002 yılında Altuğlu ve ark. çalışmasında mukopürülan endoservisit tanısı almış 148 vakada servikal swab materyalinde Hybrid Capture yöntemi ile HPV DNA bakılmış ve 8 hastada (%5.4) HPV DNA tespit edilmiştir (90).

2003 yılında Özşaran ve ark. çalışmasında 1100 hastanın 34'ünde skuamoz hücre anomalisi saptanmış. Bunların 15 tanesinde ASCUS, 16 tanesinde LGSIL, 3 tanesinde de HGSIL tespit edilmiştir. 5 hastada Hybrid Capture yöntemi ile HPV DNA saptanmıştır (91).

2003 yılında Özçelik ve ark. çalışmalarında 230 kadının 14'ünde (%6.1) Hybrid Capture-I yöntemi ile HPV DNA'sı tespit etmişlerdir (92).

2004 yılında Öztürk ve ark. çalışmasında 206 hastanın servikal materyalinde sitolojik muayene ve Hybrid Capture yöntemi ile HPV DNA bakılmış %4.9 oranında HPV DNA saptamışlardır. Normal sitolojisi olan grupta HPV DNA %2.1 tespit edilirken, epitelial hücre anomalisi tespit edilen hastalarda %42.9 olarak bulunmuştur (93).

2005 yılında Onan ve ark. çalışmasında 94 servikal intraepitelial neoplazi (CIN) hastasının parafin bloklarında PCR ile HPV subtiplerine bakmışlardır. Hastaların 47'si (% 50) CIN I, 27'si (% 28.8) CIN II, 20'si (% 21.2) CIN III tanısı almıştır. Bu gruplarda HPV pozitifliği sırasıyla % 4.2, % 14.8 ve % 45 olarak bulunmuştur (94).

Türkiye'deki değişik kliniklerden toplanmış 180.000 smear sonucunu sunduğu bildiride ASCUS oranı %1, LSIL oranı, %0.4, HSIL oranı ise %0.19 olarak bildirmiştir (95).

İnal ve ark. çalışmasında 1353 kadın taranmış, 1344 (%99.3) kadının smear sonucu normal olarak bildirilmiş. Anormal smear sonucu olan 9 kadının 5'i CIN I, 3'ü CIN II ve bir tanesi CIN III'tür. Bu hastaların hepsinde Hybrid Capture II testi ile HPV DNA saptanırken sitolojik olarak normal grupta HPV DNA saptanan hasta sayısı 20 (%1.5) bulunmuştur (96).

Ergünay ve ark.n çalışmasında sıvı bazlı sitoloji ile 14'ünde ASCUS, 3'ünde ASC-H, 7'sinde LSIL, 5'inde HSIL, 4'ünde LSIL + şüpheli HSIL, 1'inde AGUS, 1'inde de atipik hücrelere tam tanı koyulamamış 35 kadını çalışmaya almıştır. Bu hastaların 28'inde (%80) PCR ile HPV DNA tespit edilmiş. Bunlarında 22'sinde (%78.6) yüksek riskli HPV tipleri (16, 18, 31, 33, 45, 56,59) bulunmuştur (97).

Yıldız ve ark. çalışmasında servikal loop eksizyon materyallerinde LSIL ve HSIL tespit edilen hastalarda p16 ekspresyonuna bakılmıştır. HSIL vakalarının tamamı,

LSIL vakalarının ise %80'inde p16 pozitif bulunmuştur. Total HPV pozitiflik oranı %48.6 olup HSIL vakalarının %50'si, LSIL vakalarında %46.6'sında HPV pozitif tespit edilmiştir (98).

Işıklı ve ark. tarafından 513 kadına Pap smear uygulanmış. Hastaların %24.4'ü kolposkopi için çağrılmış, 77'sine kolposkopi uygulanmış, alınan biopsilerin 8 tanesinde LSIL ve 1 tanesinde HSIL saptanmıştır (99).

Özgül ve ark. çalışmasında 13 LSIL, 22 HSIL, 23 skuamoz hücreli servikal kanser ve 25 normal dokuda p16INK4a' ya ve HR-HPV ile korelasyonuna bakılmıştır. Tüm HSIL ve skuamoz hücreli kanserlerde p16INK4a pozitif iken LSIL hastalarının %46.2'sinde pozitif bulunmuştur (100).

İtalya'da yapılan bir çalışmada Verteramo ve ark. 2000-2004 yılları arası jinekoloji polikliniğine başvuran 17-57 yaş arası 753 kadın hastada L1 bölgesini hedefleyen MY09/11 primerleri ve E6/E7 genlerine yönelik primerlerin kullanıldığı PCR testini kullanmışlardır. HPV DNA prevalansını %18.3 (138/753) bulunmuştur. Sırasıyla HPV 16 %14.18, HPV 53 (%9.21), HPV 58 (%7.80), HPV 66 ile HPV 6 (her ikisi %5.67) olarak tespit edilmiştir. Diğer tiplerin oranı %5'in altında bulunmuştur. 138 tane pozitif HPV DNA'sının 83 tanesi HR (%58.56), 41 tanesi LR (%29.08) ve 18'i ise (%12.06) bilinmeyen HPV tipidir. 3 örnekte (%2.17) multiple enfeksiyon bulunmuştur (101).

İspanya'da Sanjose ve ark. yaptığı çalışmada 1998-2000 yılları arasında 20-65 yaş arası 973 kadında GP5+/6+ PCR testi ile HPV tipleri tespit edilmiştir. 24 kadında (%2.98) HPV enfeksiyonu bulunmuş olup en yaygın tip %20.7 (6/24) ile HPV 16'dır. Bunu HPV 31 ve HPV 45 multiple enfeksiyon %13.6 (4/24) ve HPV 51 %10.3 (3/24) izlemektedir (102).

Kjaer ve ark. Danimarka'da 2004-2005 yılları arasında 15-93 yaş arası normal servikal sitolojili 10.918 (%94), ASCUS veya LSIL sitolojili 494 (%4.3), HSIL sitolojili 188 (%1.6) olmak üzere toplam 11.617 (17 örnek analiz için yeterli değildi) kadında HC II testini kullanarak bir çalışma yapmışlar. Servikal sitolojisi normal olan kadınlarda HPV prevalansı %22.9, HR HPV prevalansı %19.2 ve LR HPV prevalansı %7.2 bulunmuştur. HPV 16 %4.8 ile en yaygın tip olarak bulunmuş ve bunu sırasıyla HPV 31 (%3.8), HPV 52 (%3.7), HPV 51 (%3.6), HPV 68 (%2.4), HPV 18 (%2.2), HPV 39 (%2.2), HPV 66 (%1.9), HPV 53 (%1.9) ve HPV 45 (%1.8) olarak belirlenmiştir (103).

Usubütün ve ark. 2009 yılında yayınlanan çalışmasında Hacettepe Üniversitesinde histopatolojik arşiv taraması sonucu 1993-2004 yılları arasına ait parafine gömülü 248 adet invaziv serviks kanseri örneği toplanmıştır. PCR aşamasını takiben ve LİPA 25 DNA enzim immünoassay ve genotiplendirme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara göre HPV prevalansı %93.5 (232/248) bulunmuş. HPV tiplerine göre dağılım ise HPV 16 (%64.7), HPV 18 (%9.9), HPV 45 (%9.9), HPV 31 (%3.0) ve HPV 33 (%2.2) şeklindedir. Bu çalışmaya göre Türkiyede HPV pozitif invaziv serviks kanserlerinin %75.4'ünü HPV 16 ve HPV 18 oluşturmaktadır (104).

Avcı ve ark. 2013 yılında yayınlanan araştırma çalışmasında, çeşitli servikal patolojiye sahip hastalarda real-time PCR ve DNA dizi analizi ile HPV tiplerinin sıklığı belirlenerek filogenetik analizleri yapılmıştır. Ocak-Ekim 2010 tarihleri arasında kolposkopi önerilen 77 hastaya ait servikal sürüntü örneği çalışmaya dahil edilmiştir. HPV DNA ve HPV 16 DNA'sı, L1 bölgesi hedef alınarak RT-PCR ile belirlenmiştir. MY09/11 ürünlerinin amplifikasyonları için GP5+/GP6+ primerleri kullanılmış, siyonin-5 işaretli HPV DNA ve HPV 16 DNA'ya spesifik probalar kullanılarak RT PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi için GP5+/GP6+ primerleri kullanılmıştır. 77

servikal örneğin 47 (prevalans %61)'sinde HPV DNA pozitif tespit edilmiş olup %52'sini HPV 16, %4'ünü HPV 16 ve HPV 11, %1'ini HPV 16 ve HPV 6, %4'ünü ise tiplendirilemeyen HPV DNA oluşturmuştur. Patolojilerine göre yapılan gruplandırmada ise 20 tane ASC-H'nin %60'ında, 36 tane ASC-US'un %63.8'inde, 9 tane HSIL'in %100'ünde ve 12 tane LSIL'in %25'inde HPV DNA pozitif olarak belirlenmiştir (105).

Gharizadeh ve ark. 2001 yılında yayınladıkları çalışmada servikal kanser, displastik bireyler ve sağlıklı bireylerden oluşan farklı hastalara ait toplam 67 klinik örnek kullanılarak pyrosequencing yöntemi ile HPV genotipleri belirlenmiştir. 12 örnek hücre lizatlarından direkt olarak çoğaltılırken diğer 55 örnek ise ekstrakte edilen DNA'dan çoğaltılmıştır. Pyrosequencing sonuçlarına servikal kanser hastalarının % 57'sinde (20/35) HPV 16, % 17'sinde (6/35) HPV 18 ve % 9'unda (3/35) HPV 31 belirlenmiştir. Geriye kalan 6 örnekte bulunan HPV tipleri sırasıyla 6, 33, 35, 45, 52 ve 59'dur. Displastik bireylerin % 27'sinde (3/11) HPV 16 , yine % 27'sinde (3/11) HPV 31, %18'inde (2/11) HPV 18 ve % 9'unda (1/11) HPV 66 tespiti edilmiştir (106).

Travasso ve ark. 2008 yılında Hindistanda yaptıkları çalışmada servikal kanser örneklerinden pyrosequencing yöntemi kullanılarak HPV genotiplerini belirlemişlerdir. 65 adet servikal kanser biyopsi örneği ve 21 adet kanser olmayan servikal doku örneği olmak üzere toplam 86 adet klinik örnek çalışmada kullanılmıştır. Çalışma sonucunda servikal kanser örneklerinde 7 farklı genotip tespit edilmiştir. Bunlar HPV 16, HPV 18, HPV 33, HPV 31, HPV 45, HPV 11 ve HPV 6'dır. Servikal kanser örneklerinin %96.9'unda (63/65) yüksek riskli HPV tipine rastlanmıştır. Dağılım şu şekilde olmuştur. HPV 16 % 73.8 (48/65), HPV 18 % 10.77 (7/65), HPV 33 % 3.07 (2/65), HPV 31 % 1.53 (1/65) ve HPV 45 %1.53 (1/65). Bununla beraber HPV 16-HPV 18

koenfeksiyonu % 4.61 (3/65) ve HPV 16-HPV 33 ko-enfeksiyonu % 1.53 (1/65)'tür. İlginç bir şekilde kanser olmayan örneklerin % 76.19 (16/21)'unda HPV testi pozitif bulunmuş ve bunların büyük kısmı (% 52.38; 11/21) HPV 16 ve 18 ile koenfekte bulunmuştur (107).

Bu çalışmada kullanılan 38 (otuz sekiz) adet uterin servikal kanser tanısı konulmuş hastalara ait örneklerin 35'inde (%92) HPV DNA pozitif saptanmıştır. 26 hastada HPV 16 (%68.42), 2 hastada HPV 18 (%5.26) tespit edildi. 1 hastada HPV 16 ve HPV 18'in süper enfeksiyonu (%2.63), 5 hastada HPV 16 ve HPV 16 Africian subtip süper enfeksiyonu (%13.15) ve 1 hastada ise HPV 16 ile HPV 33 süper enfeksiyonu (%2.63) bulundu. Bu sonuçlar ülkemizin diğer bölgeleriyle ve dünyada yapılan çalışmalarla uyumlu olup HPV 16 ve HPV 18 enfeksiyonlarının servikal kanserin en önemli etkeni olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda, HPV 16 ve 18'in en yaygın tipler olarak belirlenmesi, hem ülkemiz hem de dünya literatürüyle uyumlu bir bulgudur. HPV genotiplerinin saptanması klinik pratikte oldukça önemlidir. Serviks kanserinin maliyeti, uzun dönem takip ve bakımla beraber uygulanan cerrahi veya radyoterapi tedavileri nedeniyle yüksektir. Serviks kanseriyle direkt ilişkili maliyete ek olarak, uygulanmakta olan tarama stratejileri ve HPV aşı programları büyük oranda medikal maliyete yol açmaktadır. Serviks kanseri ve HPV arasındaki açık ilişki, HPV'yi profilaktik aşılardan için ideal bir hedef haline getirmiştir. HPV 16 ve 18'e karşı geliştirilen bivalent aşı ve HPV 16, 18, 6 ve 11 tiplerine karşı geliştirilen kuadrivalent aşının ikisi de HPV ilişkili servikal lezyonlara karşı yüksek oranda koruyucu etki gösterir. HPV aşılarının ve taramanın maliyet-etkinliği, HPV tip-spesifik epidemiyolojik faktörlere, aşılanmış popülasyondaki tarama davranışına ve aşı ile sağlanan korumanın süresine bağlıdır.

Uygulanmakta olan tarama programlarına aşılamanın dahil edilmesi serviks kanseri engelleme programlarında maliyet etkinliğini arttıracak bir strateji olabilir (108).

Serviks kanserlerinin %99.9'unda HPV saptanabilmekte ve invazif serviks kanseri gelişimi için persistan HPV enfeksiyonu gereklidir. Servikal kanser taramasında klasik yöntem servikal sitoloji olmasına karşın bu yöntemin duyarlılığı düşüktür. Tarama aralıklarının güvenle uzatılabilmesine olanak sağladığından HPV testinin maliyet-etkinlik oranları zamanla daha uygun hale geleceği öngörülebilmektedir. HPV testleri ASCUS tanısından sonra SIL tanısı alıp CIN 2/3 tanısı konmayan olguların izlenmesinde, CIN 2/3 tedavi edildikten sonra izlenmesinde, tarama programlarında sitolojiyle birlikte kullanılabilir, sitolojik taramanın yerini alabilir. HPV DNA testleri sitolojiyle birlikte kullanıldığında duyarlılık artar. Ancak maliyette artar. HPV DNA testi tek olarak tarama için kullanılabilir ancak bugün için elde ki kanıtlar yetersizdir ve daha geniş saha çalışmalarına gereksinim vardır. Sitolojik tarama yöntemleri pek çok endüstrileşmiş ülkede serviks kanseri insidansını düşürmüştür. Servikal sitolojinin sensitivitesinin sınırlı olması, bu tarama programlarının sürdürülmesini pahalı kılmakta ve zorlaştırmaktadır. Servikal sitolojiye dayalı tarama programlarının yerini, yüksek riskli HPV tiplerinin tespit edilmesine yönelik programlar alacak gibi görülmektedir. Çok sayıda geniş çaplı iyi kontrol edilmiş çalışmalar HPV testinin sitolojik testlerden (Konvansiyonel ve likid bazlı) önemli ölçüde daha sensitif olduğunu, 30 yaş üzerindeki kadınlarda ise spesifitesinin biraz düşük olduğunu göstermiştir. Başlangıçta servikal sitoloji ve HPV testi kombine olarak kullanılacak olsa bile, çalışmaların sonuçları görüldükten sonra, sitolojinin HPV testine sağladığı yararın çok az olduğu ve HPV testinin ileride taramada tek başına uygulanacağını söylemek mümkündür (109).

Günümüzde HPV tespitinde non-amplifiye tekniklerle beraber Target ve Sinyal Amplifikasyon teknikleri kullanılmaktadır. HPV tiplerinin onkojenik potansiyelleri farklı olduğundan, test yalnız örnekteki HPV DNA'sını değil, HPV tipini de tespit edebilmelidir. HPV tespitinde sinyal amplifikasyon testi Hybrid Capture ve Branched DNA yollarını içine almaktadır. En fazla kullanılan teknik Hybrid Capture'dır. Hybrid Capture (HC) testinin ise birinci jenerasyon Hybrid Capture Tube (HCT) test ve daha yeni Hybrid Capture II (HCII) testi olmak üzere iki çeşidi bulunmaktadır. DNA sekans analizi tüm viral subtipleri ayırt eden ve altın standart olarak kabul edilen yöntemdir.

Bu çalışmada HPV genomunun sekans analizi için pyrosequencing yöntemi kullanıldı. Pyrosequencing yöntemi ile HPV genotiplerinin belirlenmesi diğer yöntemlere göre oldukça kısa sürmektedir. Ayrıca pyrosequencing yönteminin test birim fiyatı DNA dizi analizi yöntemlerinin test birim fiyatına yakın olup, ters hibridizasyon ve Hybrid Capture 2 (HC II) testlerine kıyasla ucuzdur.

Mevcut tezde pyrosequencing yöntemiyle uterin servikal kanser örneklerinde HPV genotiplerinin belirlenmesi başarı ile gerçekleştirilmiştir. Fiyat ve süre açısından bakıldığında HPV genotipleme için pyrosequencing yönteminin rutin laboratuvarlarda uygulanabileceği kanaatine varıldı.

7. KAYNAKÇA

1. Eren H, Özgün N, Güzin K, Yazıcı S. Serviksin prekanseröz lezyonlardaki Human Papillomavirus prevalansı. 3.Ulusal Viroloji Kongresi, 2007, Bursa.
2. Nyári TA, Kamlár L, Deák J, Szöllösi J, Farkas I, Kovács L. Prevalence and risk factors of human papillomavirus infection in asymptomatic women in southeastern Hungary. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2004; 115: 99–100.
3. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*, 2006; 110(5):525-41.
4. Bulut Y, Korkmaz E, Seyrek A, Özercan İH, Toraman ZA. Üst solunum yolları malign lezyonlarında HPV Tip 16, 18, 31 ve 33 sıklığının araştırılması. 3.Ulusal Viroloji Kongresi, 2007, Bursa.
5. Division of STD Prevention (1999). Prevention of genital HPV infection and sequelae: report of an external consultants' meeting, Atlanta, 2012.
6. Ergünay K, Mısırlıoğlu M, Fırat P, Tuncer S, Alp A, Ustaçelebi Ş. HPV'nin saptanmasında tek oturumlu ve Nested PCR yöntemlerinin karşılaştırılması. 3.Ulusal Viroloji Kongresi, 2007, Bursa.
7. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348(6): 518–27.
8. Bulut Y. HPV tanı ve tiplendirmesinde moleküler yöntemler. 6.Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi, 2010, Ankara.
9. Roger A. Hubbard, Phd. Human Papillomavirus Testing Methods. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127:940-945.

10. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Papovaviruslar. Asya Mikrobiyoloji. 4. Baskı, Asya Tıp Kitabevi, İzmir, 2005; 327- 332.
11. 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.
12. 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 Obstetrica et Gynecologica Scandinavica 1997; 76: 271- 276.
13. Erol D, Bulut Y, Yüce H, Özercan İH. Gastrointestinal sistem adenokarsinom özelliklerinde HPV tespiti. 3.Ulusal Viroloji Kongresi, 2007, Bursa.
14. zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta, 1996; 1288, 55-78.
15. DeVilliers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology, 2004; 324, 17-27.
16. Ağaçfıdan A, Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S. Cinsel Yolla Bulaşan Virüsler. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. 1.Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 2004: 285- 292.
17. Löning M, Gissmann L, Diedrich K, et al. Human papillomavirus and cervical cancer. Dtsch Arztebl, 2007; 104:2806–10.
18. zur Hausen H. Papillomaviruses to vaccination and beyond. Biochemistry, 2008;73(5):498-503.
19. Garcea RL, Di Maio D. The Papillomaviruses. 2007; Springer Science Business Media, LLC.9.

20. Clifford GM, Smith JS, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a metaanalysis. *Br J Cancer*, 2003; 89:101–105.
21. Villiers EM, Claude F, Thomas R. Broker, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004; 324:17– 27.69.
22. Kubar A. Papillomaviruslar. 3.Ulusal Viroloji Kongresi, 2007, Bursa.
23. Hans-Ulrich B, Itzel E, Calleja-Macias S, Terence D. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*, 2006; 118:1071–76.
24. 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.
25. Kubar A. Papillomavirusların genel özellikleri. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 2006, Antalya.
26. Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *JEADV*, 2002; 16:231–240.
27. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV, and International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796- 802.
28. Christy M, Laimonis A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virology*, 2006; 16:83–97.

29. John T, Laurie K, Thomas BS, Kenneth R. Shroyer MD. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Human Pathology*, 2008; 39:154–166.
30. Burd EM. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003;16:1-17.
31. Psyrri A, Di Maio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5: 24-31.
32. Lambert PF, Collins A (ed). Papillomaviruses. In: *Molecular Biology of Human Viruses, Encyclopedia of Virology*. 2008, Academic Press Elsevier, USA, pp: 18-26.
33. Münger K. The role of human papillomaviruses in human cancers. *Front Biosci* 2002; 7: 641-9.
34. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 78: 11451-60.
35. Jo H, Kim JW. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Therapy* 2005; 3: 419- 34.
36. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV, and International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796- 802.
37. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*, 2005; 32:7–15.
38. Kevin A. Ault. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Inf Dis Obst Gynecol*, 2006; 40470:1-5.

39. Aaçfıdan A. HPV infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve lkemizdeki durumu. 3. Ulusual Viroloji Kongresi, 2007, Antalya.
40. Scheurer ME, Tortolero G, Adler K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*, 2005; 15:727-746.
41. zur Hausen H. *Infections causing human cancer*, Wiley-VCH, Weinheim-New York, 2006; S1-517.
42. Weinstock H, Berman S, Cates W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health*, 2004; 36:6-10.
43. Gerberding JL. Report to Congress: prevention of genital human papillomavirus infection. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 2004.
44. Chesson HW, Blandford JM, Gift TL, Tao G, Irwin KL. The estimated direct medical cost of sexually transmitted diseases among American youth. *Perspect Sex Reprod Health*, 2004; 36:11-9.
45. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*, 2005; 366:991-8.
46. Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL et al. Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: the Young Women's Health Study. *J Infect Dis* 2002; 186:462-9.
47. Janet G. Baseman, Laura A. Koutsky1 J.G. Baseman, L.A. Koutsky. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32: 16–24.

48. Human papillomavirus vaccine-recent results and future developments *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7:470-7.
49. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection *Am J Med*, 1997;102:3-8.
50. Yarkın F. Human Papillomavirus immünolojisi. 3.Ulusal Viroloji Kongresi, 2007, Bursa.
51. Bulut Y, Etem EÖ, Dilek AR, Kumru S, Seyrek A, Toraman ZA, Yüce H. Serviksin sitolojik anomalilerinde HPV pozitifliği ve IL-10 promotor 1082-gen polimorfizmi. 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 2008, Ankara.
52. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 2006; 24 Suppl 1: 16- 22.
53. Goncalves MA, Donadi EA. Immune cellular response to HPV: current concepts. *Braz J Infect Dis* 2004; 8: 1- 9.
54. Ustaçelebi Ş. Genel Viroloji. Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara.1992.
55. Mc Kane L, Kandel J. *Microbiology Essentials and Applications*. McGraw-Hill Inc.1996.
56. Yarkın F. Human papillomavirus infeksiyonlarının virolojisi ve epidemiyolojisi. *Klinik Aktüel Tıp*, 2007; 12(8):1-6.
57. Notkins AL, Oldstone MBV(eds).*Concepts in Viral Pathogenesis*. New York Springer-Verlag.1984.
58. ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. A randomized trial on the management of lowgrade squamous intraepithelial lesion cytology interpretations. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:1381–1382.

59. Stoler MH. Testing for human papillomavirus: data driven implications for cervical neoplasia management. *Clin Lab Med*, 2003; 23:569-583.
60. Hopman AH, Kamps MA, Smedts F, Speel EJ, Herrington CS, Ramaekers FC. HPV in situ hybridization: impact of different protocols on the detection of integrated HPV. *Int J Cancer*, 2005; 115:419-428.
61. Thomas CJ. Human papillomavirus testing in primary cervical screening and abnormal papanicolaou management. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 2006; 61:15-25.
62. Van Hamont D, Bekkers RLM, Massuger LFAG, Melchers WJG. Detection, management, and follow-up of pre-malignant cervical lesions and the role for human papillomavirus. *Rev Med Virol*, 2008; 18:117-132.
63. Ronco G, Segnan N, Giorgi-Rossi P, et al. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst*, 2006; 98:765-774.
64. Malloy C, Sherris J, Herdman C. HPV DNA testing: technical and programmatic issues for cervical cancer prevention in low-resource settings. Seattle: PATH; 2000.
65. van Doorn LJ, Kleter B, Quint WG. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. *Expert Rev Mol Diagn*, 2001; 94-402.
66. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*, 2000; 38:357-361.
67. Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Verheijen RH. HPV testing in cervical screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol*, 2006; 20:253-266.

68. Lungu O, Wright TC Jr, Silverstein S. Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. *Mol Cell Probes*, 1992;6:145-152.
69. Jiang HL, Zhu HH, Zhou LF, Chen F, Chen Z. Genotyping of human papillomavirus in cervical lesions by L1 consensus PCR and the Luminex xMAP system. *J Med Microbiol*, 2006; 55:715-720.
70. Rajeevan MS, Swan DC, Duncan K, Lee DR, Limor JR, Unger ER. Quantitation of site-specific HPV 16 DNA methylation by pyrosequencing. *J Virol Methods*, 2006;138:170-6.
71. Solomon D, Papillo JL, Davey DD. Statement on human papillomavirus DNA test utilization. Cytopathology Education and Technology Consortium. *Arch Pathol Lab Med*, 2009; 133:1276-7.
72. Çavuşoğlu C. Baz dizi analizi teknolojisi: Tekniğin prensipleri ve bakteriyolojide kullanımı. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu Kitabı, 2007, Malatya, 94-98.
73. Gharizadeh B, Oggionni M, Zheng M, Akom B, Pourmand N, Ahmadian A, Keng-Ling W, Nyren P. A Novel Strategy for Reliable and Rapid Genotyping of Human Papillomaviruses by Pyrosequencing Technology. *J Mol Diagnos*, 2005: 198-205.
74. Gharizadeh B, Ghaderi M, Donnelly D, Amini B, Wallin KL, Nyren P: Multiple primer DNA sequencing method. *Electrophoresis* 2003, 24:1145–1151.
75. Fakruddini MD, Chowdhury A, Hossaini N, Mannan KS, Mazumdar RM. Pyrosequencing-Principles and applications. *Review Article* 2012: 65-76.

76. Vardar MA, HPV: Klinik önemi, korunma ve tedavi. 2. Ulusal Viroloji Kongresi, 2005, Antalya.
77. Schiller JT, Davies P. Science and society: Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer. *Nat Rev Microbiol*, 2004; 2:343-7.
78. Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, et al. Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res*, 1991;51,1014-9.
79. Douglas R. Lowy and John T. Schiller. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest*, 2006; 116:1167-73.
80. Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ and Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant HPV-16 L1 and L2ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*, 1991; 185, 251-57.
81. Pagliusi SR, Aguado MT. Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. *Vaccine*, 2004;23:569–578.
82. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. Proof of Principle Study Investigators. *N Engl J Med*. 2002;347:1645-51.
83. Harper DM. Why am I scared of HPV? *Cancer J Clin*. 2004;54(5):245-7.
84. 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. *Microbiol Path*, 1997; 22: 219- 25.
85. Ustaçelebi Ş, Human Papillomavirus aşılması. 3.Ulusal Viroloji Kongresi, 2007, Bursa.

86. Travasso CM, Anand M, Samarth M, Deshpande A and Kumar-Sinha C. Human papillomavirus genotyping by multiplex pyrosequencing in cervical cancer patients from India; *J Biosci*, 2008, 33 73–80.
87. Yarkın F, Vardar MA. HPV immunolojisi ve natürel enfeksiyonlar. *Türkiye Klinikleri*, 2009; 2.43-7.
88. Vardar MA, Altıntaş A, Doran F, Arıdoğan N, Demir C, Burgut R, et al. Human papillomavirus detection in cervical smears and cervical tissue excised by the Loop Electrosurgical Excision Procedure (LEEP). Diagnostic value of cytology, colposcopy and histology. *Eur J Gynecol Oncol*, 1995;16.494-9.
89. Güney AI, Ince U, Küllü S, Pekin S, Çırakoğlu B. Detection and typing of human papillomavirus in cervical specimens of Turkish women. *Eur J Gynecol Oncol*, 1997;18.546-50.
90. Altuglu I, Terek MC, Ozacar T, Ozsaran AA, Bilgiç A. The prevalence of human papillomavirus DNA in women with mucopurulent endocervicitis. *Eur J Gynecol Oncol*, 2002;23.166-8.
91. Ozsaran AA, Dikmen Y, Akercan F, Zekioglu O, Terek MC, Mgoyi L, et al. The triage of squamous cell abnormalities of cervical cytology by human papillomavirus screening. *Eur J Gynecol Oncol*, 2003;24.535-8.
92. Özçelik B, Serin IS, Gökahmetoğlu S, Başbuğ M, Erez R. Human papillomavirus frequency of women at low risk of developing cervical cancer: a preliminary study from a Turkish university hospital. *Eur J Gynecol Oncol*, 2003; 24.157-9.
93. Oztürk S, Kaleli I, Kaleli B, Bir F. Investigation of human papillomavirus DNA in cervical specimens by hybrid capture assay. *Mikrobiyol Bul*, 2004;38.223-32.

94. Onan MA, Taskiran C, Bozdayi G, Biri A, Erdem O, Acar A, et al. Assessment of human papilloma viral load of archival cervical intraepithelial neoplasia by real-time polymerase chain reaction in a Turkish population. *Eur J Gynecol Oncol* 2005;26:632-5.
95. Umudum H. I. Ulusal Sitopatoloji Kongresi Abstract Kitabı.
96. Inal MM, Köse S, Yildirim Y, Ozdemir Y, Töz E, Ertopçu K, et al. The relationship between human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in Turkish women. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17:1266-70.
97. Ergünay K, Misirlioğlu M, Pinar F, Tuncer ZS, Tuncer S, Ustaçelebi S. Human papillomavirus DNA in cervical samples with cytological abnormalities and typing of the virus. *Mikrobiyol Bul* 2007;41:219-26.
98. Yıldız IZ, Usubütün A, Firat P, Ayhan A, Küçükali T. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the 16 literature. *Pathol Res Pract* 2007;203(6):445-9.
99. Isikli B, Ozalp S, Oner U, Kalyoncu C, Yalçın OT, Küçük N, et al. PAP smear screening among married women living in Osmangazi University ALPU training area. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007;8:60-2.
100. Ozgul N, Cil AP, Bozdayi G, Usubütün A, Bulbul D, Rota S, et al. Staining characteristics of p16INK4a: is there a correlation with lesion grade or high-risk human papillomavirus positivity. *J Obstet Gynecol Res* 2008;34: 865-71.
101. Verteramo R, Pierangeli A, Calzolari E, et al. Direct sequencing of HPV DNA detected in Gynecologic outpatients in Rome, Italy. *Microbes and Infection*, 2006; 8,2517-2521.

102. Sanjose SD, Almirall R, Lloveras B, et al. Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *ASTDA*, 2003; 30:788-793.
103. Kjaer SK, Breugelmans G, Munk C, et al. Population-based prevalence, type- and age-specific distribution of HPV in women before introduction of an HPV-vaccination program in Denmark. *Int J Cancer*, 2008; 123:1864-70.
104. Usubütün A, Alemany L, Küçükali T, Ayhan A, Yüce K, de Sanjosé S, Font R, Lloveras B, Klaustermeier J, Quint W, Muñoz N, Bosch FX. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer specimens from Turkey. *Int J Gynecol Pathol*, 2009;28:541-8.
105. Avcı GA, Bozdayı G, Taskıran C, Ozkan S, Onan MA, Çeşitli servikal patolojiye sahip kadınlarda HPV prevalansı ve filogenetik analizi. *J Turk Soc Obstet Gynecol*, 2013; 10: 151- 9.
106. Gharizadeh B, Kalantari M, Garcia CA, Johansson B, Nyrén P. Typing of Human Papillomavirus by Pyrosequencing. *Laboratory Investigation*. 2001; 81.
107. Travasso CM, Anand M, Samarth M, Deshpande, Kumar-Sinha C. Human papillomavirus genotyping by multiplex pyrosequencing in cervical cancer patients from India. *J Biosci*, 2008; 33: 73–80.
108. Weinstein MC. Theoretically correct cost-effective nessanalysis. *Med Decis* 1999;19(4):381-2.
109. Wright TC. Is it time to retire the PAP Smear? *Clin Obstet Gynecol* 2007;50:313-23.

8. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Elazığ'da dünyaya geldim. İlk, orta ve lise eğitimimi Elazığ'da tamamladım. 1998 yılında Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde üniversite öğrenimime başladım ve 2002 yılında mezun oldum. Lisansüstü eğitimime 2009 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda başladım. Halen Erciyes Üniversitesinde Biyolog olarak görev yapmaktayım. Evliyim.