



**T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME KANSERLERİ VE HPV ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Mervat SAEED

DOKTORA TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof.Dr. Yasemin ZER

**Gaziantep
2019**



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERLERİ VE HPV ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Mervat SAEED

DOKTORA TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof.Dr. Yasemin ZER

**Gaziantep
2019**

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

**MEME KANSERLERİ VE HPV ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI
MERVAT SAEED**

Tez Savunma Tarihi: 16.07.2019

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr.Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof.Dr. Tekin KARSLIGİL
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yasemin ZER
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof.Dr. Tekin KARSLIGİL

Prof.Dr. Yasemin ZER

Prof.Dr. Ayşen BAYRAM

Dr.Öğr.Üyesi Zehra BOZDAĞ

Dr.Öğr.Üyesi Hadiye DEMİRBAKAN

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Mervat Saeed
16.07.2019

TEŞEKKÜR

Öncelikli olarak, neyi bilmediğini insana öğreten Allah'ıma teşekkürler. Tez çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm çalışmalarımın yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında büyük emeği geçen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Yasemin ZER'e çok teşekkür ederim.

Eğitim sürecim boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL ve sayın Prof. Dr. Fahriye EKŞİ'e sonsuz teşekkürler. Ayrıca Patoloji Anabilim Dalı'nda Öğr. Üyesi. Dr. Zehra BOZDAĞ'a çok teşekkür ederim.

Yardımlarından dolayı Gaziantep Üniversitesi mikrobiyoloji laboratuvarı Moleküler bölümü çalışanlarına teşekkür ederim.

Son olarak beni hiç sorgulamadan her zaman destekleyen, ömrümü güzelleştiren hayatımın en önemli iki parçası annem ve babama (Allah ona rahmet etsin) sonsuz teşekkür ederim.

Mervat Saeed

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ii
KISALTMALAR	iii
ŞEKİLLER ve Resimler DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	v
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. İnsan Papilloma Virüs (HPV)	5
2.1.1. İnsan Papilloma Virüs Enfeksiyonu	5
2.1.2 Tarihçe.....	6
2.1.3. İnsan Papilloma Virüsünün Özellikleri	6
2.1.4. HPV Genomu, Proteinleri ve Replikasyonu	7
2.1.5. HPV Enfeksiyonunda Bulaşma yolları	12
2.1.6. HPV Enfeksiyonunun Klinik Belirtileri.....	13
2.1.7. HPV Enfeksiyonunda İmmun Yanıt	14
2.1.8. HPV Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Yöntemler	14
2.1.9. HPV Enfeksiyonunda Tedavi	17
2.1.10. HPV Enfeksiyonunda Takip.....	18
2.1.11. HPV Enfeksiyonunda Korunma ve Aşılar.....	18
2.1.12. HPV Kanseri İlişkisinde Beklentiler	20
2.1.13. Tümör Tipi	22
2.1.14. İmmünsüpresyon Bağı	23
2.2. Meme kanseri	23
2.2.1. Meme kanseri epidemiyolojisi	24
2.2.2. Meme Kanseri Etyolojisi ve Risk Faktörleri.....	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Yöntem.....	26
3.1.1. Adımlar	26
3.1.2. HPV Saptanması ve Tip Spesifikasyonu.....	27
3.1.3. Protokol.....	28
3.1.4. HPV Genotypes 14 Real-TM Quant Kit içeriği	29
3.1.5. HPV Genotypes 14 Real-TM Quant Kitin Protokolü	30
3.1.6. Amplifikasyon.....	31
3.1.7. Veri Analizi ve Sonuçların Yorumlanması	32
3.2. Verilerin Analizi.....	32
4. BULGULAR	33
4.1. Hastaların Demografik Bulguları	33
5. TARTIŞMA	41
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	61

KISALTMALAR

HPV:	İnsan papillomavirüs
YR-HPV:	Yüksek riskli insan papillomavirüsleri
HN:	(Head and neck)Baş ve boyun
PCR:	Polymerase Chain Reaction
DNA:	Deoxyribonucleic acid
LCR:	(Long control region)- uzun kontrol bölgesi
ORF:	(Open reading frame) -açık okuma bölgesi
E:	Erken bölge (early)
L:	Geç bölge (late)
CIN:	Servikal intraepitelyal neoplazi
MHC I:	Major histocompatibility complex I
LEEP:	Loop elektrocerrahi eksizyon prosedürü
LETZ:	Large Excision of the Transformation Zone
mRNA:	Messenger Ribonucleic acid
HC:	Hibrid yakalama (Hybrid Capture)
VBP :	Virüs benzeri partikül
FDA :	Amerikan Gıda ve İlaç Teşkilatı
ABD:	Amerika Birlesik Devletleri
IARC:	Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (International Agency for Research Cancer)
EBV:	Ebstein-Barr Virüs
MMTV:	Fare meme tümörü virüsü

ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

Resim 2. 1. HPV'lerin elektron mikrografisi	6
Resim 2. 2. Kriyoelektron mikroskopide HPV'nin yüzey yapısı	7
Resim 2. 3. HPV'nin çift sarmallı DNA'sı (300 x 250 Px)	8
Şekil 2. 1. İnsan papilloma virüsünün genetik yapısı	9
Şekil 2. 2. Karsinogenezde E2 gen bölgesinde kırılm.	10
Şekil 2.3. Tümör supressörlerin normal fonksiyonuna engel olan Rb ile p53'e bağlanan HPV E6 ve E7 proteinleri.....	10
Resim 2.4. CIN1 in situ hibridizasyon (ISH) ile HPV 16 / 18 tespitiyle ilişkilidir	21
Resim 2. 5. Rektal ampullada HPV ile ilişkili lezyondur.....	22
Resim 3. 1. QIA Symphony SP/AS (izolasyon).....	27
Resim 3. 2. Rotor-Gene Q (Hilden, Germany).....	27
Resim 4. 1. Histoloji, invaziv duktal karsinom (Hematoksilen-eozinx200)	34
Resim 4.2. Histoloji, invaziv lobüler karsinom (Hematoksilen-eozinx200).	34
Şekil 4. 1. Servikal intraepitelyal lezyon hastalarından tümör doku DNA'sında HPV enfeksiyonu varlığını tespit etmek için yapılan Kantitatif Real time PCR.....	35
Şekil 4. 2. Meme kanseri hastalarından tümör doku DNA'sında HPV enfeksiyonu varlığını tespit etmek için yapılan Kantitatif Real time PCR.....	36

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3. 1. HPV genotipleri tespiti.....	32
Tablo 4. 1. Hastaların yaş ortalaması	33
Tablo 4. 2. Hasta ve kontrol grubunun kanser tiplerine göre dağılımı.....	33
Tablo 4. 3. Meme ve servikal intraepitelyal lezyon saptanan doku örneklerinde yüksek riskli HPV DNA'sının belirlenmesi	35
Tablo 4. 4. Meme kanserinin patolojik durumuna göre YR-HPV DNA pozitifliğinin karşılaştırması	36
Tablo 4. 5. Yaş gruplarına göre meme kanserisinde YR- HPV DNA pozitifliğinin karşılaştırması	37
Tablo 4. 6. Servikal intraepitelyal lezyon ve meme kanserli doku örneklerinde yüksek riskli HPV genotiplerinin prevalansı ve tip dağılımı	38
Tablo 4. 7. Meme lobüler ve duktal kanserli doku örneklerinde yüksek riskli HPV genotiplerinin prevalansı ve tip dağılımı.....	38
Tablo 4. 8. Servikal intraepitelyal lezyon doku örneklerinde HPV ko-enfeksiyonunun çoklu HPV genotipleri ile sıklığı	39
Tablo 4. 9. Meme kanseri örneklerinde HPV ko-enfeksiyonunun çoklu HPV genotipleri ile sıklığı	39
Tablo 4. 10. Meme kanseri olgularında saptanan genotiplerin değerlendirilmesi	40
Tablo 5.1. Meme kanseri dokusunda HPV DNA sekanslarını tanımlayan çalışmaların listesi.....	42
Tablo 5.2. Meme kanseri dokularında HPV DNA sekanslarını saptamayan çalışmaların listesi.....	43

ÖZET

MEME KANSERLERİ VE HPV ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Mervat Saeed

Doktora Tezi, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Yasemin ZER

16 Temmuz 2019, 61 Sayfa

Yüksek riskli insan papillomavirüsleri (YR-HPV), servikal, kolorektal ve baş ve boyun dahil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinin etiolojisinde rol oynamaktadır; ayrıca, HPV'ler meme karsinogenezisi ve metastazı için önemli risk faktörleri olabilmektedir. Meme kanserinde HPV'lerin prevalansını değerlendiren önceki çalışmalar büyük tartışmalara yol açmıştır. Bu hipoteze dayanarak, bu çalışma, invaziv meme kanseri dokularında HPV enfeksiyonunun rolünün irdelenmesi amacı ile yapılmıştır.

Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi patoloji laboratuvarı arşivinden temin edilen, histolojik olarak meme kanseri tanısı almış kadınlara ait parafinize doku blokları ve aynı arşivden histolojik olarak servikal intraepitelyal lezyon tanısı almış olan kadınlara ait parafinize doku blokları kullanılarak yapıldı. Meme kanseri tanısı almış hastalara ait örnekler hasta grubu, immünohistokimyasal olarak HPV varlığı gösterilmiş, Servikal intraepitelyal lezyon tanısı almış hastalar ise kontrol grubu olarak belirlendi. Hasta ve kontrol grubunda sırası ile 80 ve 13 hastaya ait, toplam 93 doku bloğu çalışmaya dahil edildi. Her iki örnek türünde PCR yöntemi ile Genotypes 14 Real-TM Quant (İtalya) kiti kullanılarak YR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ve 68) genotiplerinin DNA'sı araştırıldı.

Meme kanseri tanısı almış hastaların 8'inde (%10) ve kontrol grubu hastalarının 12'sinde (%92.3)'unda YR-HPV DNA'sı tespit edildi. Servikal intraepitelyal lezyon saptanan grupta HPV saptanması açısından meme kanseri olan hastalara göre istatistiksel anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$). Meme kanseri vakalarında 45-56-68 HPV genotipleri en sık görülen genotiplerdi.

Verilerimiz ile İnsan papillom virüsleri ve bazı meme kanseri türleri arasında olası bir nedensel ilişki bulunmuş olmakla birlikte daha geniş hasta gruplarında çalışılmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: YR-HPV, Meme kanseri, Çoklu Real Time PCR

ABSTRACT
INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN
BREAST CANCERS AND HPV_s

Mervat Saeed

Doctoral Thesis, University of Gaziantep, Institute of Medical Sciences

Department of Medical Microbiology

Thesis Supervisor: Prof.Dr. Yasemin ZER

16 July 2019, 61 pages

High-risk human papillomaviruses (HPVs) have been implicated in the aetiology of a variety of human cancers, including cervical, colorectal, and head and neck (HN); also, (HPVs) may be important risk factors for breast carcinogenesis and metastasis. Previous studies that evaluated the prevalence of HPVs in breast cancer have generated considerable controversy. Based on this hypothesis, we aimed to investigate the prevalence of HPV infection in invasive breast cancer tissues.

Our study included paraffinized tissue blocks taken from the pathology laboratory archive of women histologically diagnosed with breast cancer in Research and Hospital- Sahinbey -Gaziantep University, and paraffinized tissue blocks of women histologically diagnosed with cervical intraepithelial lesion from the same archive. HPV was immunohistochemically detected in breast tissue samples of patients histologically diagnosed with breast cancer and identified as a patient group, and in cervical intraepithelial lesion specimens were determined as a control group.

A total of 93 tissue blocks of 80 and 13 patients, respectively, were included in the study. In both specimen types, HR-HPV DNA of (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68) genotypes was investigated by PCR method using Genotypes 14 Real-TM Quant (Italy) kit.

HR-HPV DNA was detected in 8 (10%) of breast cancer patients and 12 (92.3%) of control group patients. There was a statistically significant difference in HPV detection in the group with cervical intraepithelial lesion compared to breast cancer patients ($p < 0.05$). HPV (45-56-68) were the most prevalent genotypes in breast cancer cases. Although a possible causal relationship between human papillomavirus and some types of breast cancer found in our data, we think that it would be beneficial to study in larger patient groups.

Key words: HR-HPV, Breast cancer, Multiple Real Time PCR

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda en sık tespit edilen malignitedir. İki binoniki yılında, her iki cinsiyette dünya çapında teşhis edilen kanserlerin %11.9'unu temsil eden 1.7 milyon yeni vaka tespit edilmiş olup vakaların büyük çoğunluğunu kadınlar oluşturmaktadır (1). Bu verilere dayanarak Globocan analizler, Türkiye'deki her 25 kadından birinde hayatlarının bir döneminde meme kanseri gelişebileceğini göstermektedir (2). Çoklu risk faktörlerinin meme kanseri gelişimiyle ilişkili olduğu iyi bilinmesine rağmen, çoğu durumda başlangıç nedeni belirlenmemiştir. Dolayısıyla meme kanserinde etyoloji ile ilgili yeni faktörlerin arayışı çalışmalarının artmasına yol açmıştır. Enfeksiyöz ajanların, özellikle *İnsan Papilloma virüsü'nün* (HPV) doğrudan veya promotörler olarak insanlarda meme kanserinde kanserojen rolü olan faktörlerden biri olarak kabul edilebileceğinin saptanması son yıllardaki önemli bulgulardan biri olarak kabul edilmektedir (3).

Meme kanserinin HPV ile ilişkili olabileceği, bir insan meme hücre grubunun HPV 16 ve 18 genomu ile enfekte olduktan sonra ölümsüzleşmesi sebebiyle ortaya atılmıştır (4). Ancak bu hipotez halen oldukça tartışmalıdır. Çalışmalar meme kanser hücrelerinde HPV DNA insidansını % 0 ile % 86.21 civarında değişecek şekilde vermektedirler (1).

İnsan papillom virüsleri, kutanöz ve mukozal epitel yüzeylerini (cilt, genital) enfekte eden ve hem benign hem de malign hiperproliferatif lezyonlara neden olan geniş ve yaygın bir virüs ailesidir (5-7). HPV enfeksiyonlarının yaklaşık % 90'ı asemptomatiktir ve genellikle bağışıklık sistemi tarafından iki yıl içinde spontan temizlenir, ancak uzun latent dönemden sonra, erdike edilmeyen olgularda, başka risk faktörlerinin de varlığı ile beraber, malign transformasyona neden olabilmektedir. HPV enfeksiyonunun latent olarak devam etmesi, uygun risk faktörlerinin varlığında kanser gelişimine neden olabilir. Bu grupta bazı genotipler onkogenetik transformasyona daha fazla neden olması nedeniyle "yüksek riskli" olarak sınıflandırılmaktadır. Örneğin, "yüksek riskli" HPV genotiplerinden genotip 16 ve 18'in enfeksiyonu, serviks kanseri olgularının% 90'ında görülmektedir (3,8).

HPV'nin başlıca bulaş yolu cinsel temastır (8-10). HPV'lerin ayrıca tüm vajinal, penil, anal, kolorektal, oral ve baş-boyun kanserleri ile ilişkili olabileceği bulunmuştur (9, 11-15).

Bu kanserlerde temel olarak yüksek riskli HPV'lerce, eksprese edilen E6 ve E7 gen ürünleri, hücrel tümör baskılayıcı genleri [p53 ve pRb (retinoblastom)] inaktive ederek onkogenik transformasyona neden olmaktadır (16). Bu, inhibitör genlerin inhibisyonu, hücrelerde kontrolsüz mitotik aktivite ve hücrel bazı niteliklerinin değişimi ile kanser oluşumunun hücrel temelini oluşturmaktadır (7). Son yıllarda HPV ve meme kanseri arasında da bir ilgi olabileceği yönünde bazı çalışmalar yapılmıştır. Viremi yapmamasına rağmen, meme kanallarının meme başı areola kompleksi yoluyla dış ortama maruz kalmasının HPV'nin meme dokusuna ulaşabileceği hipotezi, meme kanalı epitelinden köken alan kanser türlerinde virüsün varlığının araştırılması fikrini oluşturmuştur (17).

HPV'nin ispatlanmış kanser türleri dışında diğer kanser türleriyle de ilişkisinin olabileceği hipotezleri ispat bekleyen sorulardandır. Bu çalışma da meme kanseri ve HPV arasında ilişki olup olmadığının araştırılması amacıyla yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsan Papilloma Virüs (HPV)

2.1.1. İnsan Papilloma Virüs Enfeksiyonu

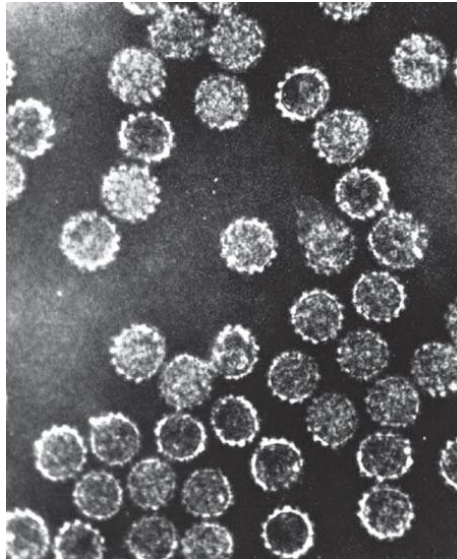
Diğer papilloma virüsler gibi HPV yalnızca deri veya mukozal membranların keratonisitlerinde etkili enfeksiyonlara yol açmaktadır (18,19). HPV'nin tanımlanmış olan 170'in üzerinde tipi bulunmakta olup bunlardan yaklaşık 40'ı tipik olarak cinsel temas ile geçmekte ve anorektal bölgede enfeksiyonlara yol açmaktadır. Subklinik enfeksiyonlar dirençli kaldığında (%5-10) invaziv kansere dönüşebilecek prekanseröz lezyonların ortaya çıkması açısından risk faktörüdür (20). HPV'nin kanser ile ilişkisinin diğer virüslere göre daha fazla olduğu ortaya konmuş olup yıllık 500 bin dolayında yeni kanser olgusunun nedeni olarak bildirilmiştir (21,22). HPV kansere neden olma risklerine göre üç alt gruba ayrılmaktadır. Bunlardan yüksek riskli onkojenik grup HPV tip 16-18-31-33-35-39-45-51-52-56-58-59-68-73 ve 82 şeklinde sınıflandırılmıştır. Düşük onkojenik riskli grup kondilomlarda ve düşük dereceli servikal intraepitelyal neoplazide görülmektedir (23). Yüksek riskli grubun karsinom ve displaziye ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Orta riskli grup, hafif-orta dereceli displastik lezyonlarda karsinoma kıyasla daha sık gözlenmektedir (24). Serviks kanserlerinin %70'ine yüksek risk grubundaki HPV-16 ve 18 türlerinin yol açtığı bilinmektedir (25). Serviks, vulva ve vajinanın prekansöröz ve kanseröz lezyonlar için HPV önemli etkenlerden birisi olarak bilinmektedir (26). Bununla beraber yüksek risk grubundaki HPV enfeksiyonunun diğer maligniteler ile birlikteliği de yapılan çalışmalar ile gösterilmiş olup bunların başlıcaları anüs, orofarenks ve penis kanserleridir (27). Yüksek riskli HPV türleri onkojenik aktivitesini E6 ve E7 onkoproteinleriyle sağlamakta olup (28) E6 proteini p53 genini, E7 proteini de pRb genini inaktifleştirmek suretiyle kanser gelişimine yol açmaktadır (21,29).

2.1.2 Tarihçe

Bindokuzyüz yetmişiki yılında, insan papillomavirüslerinin epidermodisplazya verrusiformis'teki deri kanseri ile ilişkisi, Polonya'da Stefania Jabłońska tarafından gösterilmiştir. 1978 yılında Pasteur Enstitüsündeki Jabłońska ve Gerard Orth cilt kanserinde HPV-5'i keşfetmiştir (30). 1976 yılında Harald zur Hausen, insan papilloma virüsünün servikal kanseri nedeninde önemli bir rol oynadığı hipotezini yayınlamıştır. 1983 ve 1984 yıllarında zur Hausen ve arkadaşları servikal kanserinde HPV16 ve HPV18'i tanımlamıştır (31). HeLa hücre dizisi, HPV tip 18'den kaynaklanan genomunda ekstra DNA içermektedir (32).

2.1.3. İnsan Papilloma Virüsünün Özellikleri

İnsan papilloma virüsü *Papillomaviridae* familyası üyelerindedir. *Papillomaviridae* familyası 12 cins içermekte olup bunlar alfa, beta, gama, mu ve nu cinsleriyle bunların dışında kalan ve hayvan papilloma virüslerini oluşturan yedi cinsi içerir (33). Bunlardan alfa papilloma cinsi en büyük gruptur. Bu grupta mukozayı enfekte eden HPV tipleri ile deride yaygın siğillere yol açan kütanöz tipler bulunur. Alfa cinsinde yer alan HPV türleri 50-55 nm çapında, zarfsız, çift sarmallı, ikozahedral nükleokapsidli ve protein ile çevreli DNA genomuna sahiptirler (34,35). (Resim 2.1).



Resim 2. 1. HPV'lerin elektron mikrofrafisi (36)

Diğer çoğu virüsün aksine HPV'ler antijenik yapılarından ziyade DNA yapısına göre sınıflandırıldığı için serotipler yerine genotipler olarak ve aynı zamanda keşfedildikleri sıraya göre numaralandırılırlar (34,37). Günümüzde 200'ün üzerinde HPV tipi tanımlanmıştır. HPV'lerin sınıflandırılmasında tür orijini ve DNA hibridizasyonu ile saptanan viral genomlar arasındaki homolojinin derecesi oldukça önemlidir. DNA dizilerine göre de papilloma virüsler filogenetik olarak sınıflandırılmıştır. Papilloma virüslerin tiplerinin, alttiplerinin ve varyantlarının sınıflandırılmasında majör viral protein L1 gen bölgesinin homolojisi dikkate alınmaktadır. Birbirinden uzak tiplerde bile %40 oranında benzerlik olduğu bildirilmiştir (37,38).

HPV tipleri klinik olarak üç gruba ayrılmakta olup bunlar kanser bakımından yüksek riskli grup (başta genotip 16 olmak üzere 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68, 73 ve 82 genotipleri), olası yüksek riskli grup (genotip 26, 53 ve 66) ve düşük riskli grup (genotip 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55 ve 62) şeklindedir (24,39).

2.1.4. HPV Genomu, Proteinleri ve Replikasyonu

Papilloma virüsler ikozohedral simetriye sahip olan, genomu çevreleyen 72 kapsomerli zarfsız DNA virüsleri olup dış protein kılıfı "minör" ve "majör" olmak üzere iki protein içerir. Virüsün genetik bilgisi yaklaşık 8 bin baz çiftine sahip çift zincirli, halkasal bir DNA molekülünde kodlanır (24,37). (Resim 2.2).



Resim 2. 2. Kriyoelektron mikroskopide HPV'nin yüzey yapısı (40)

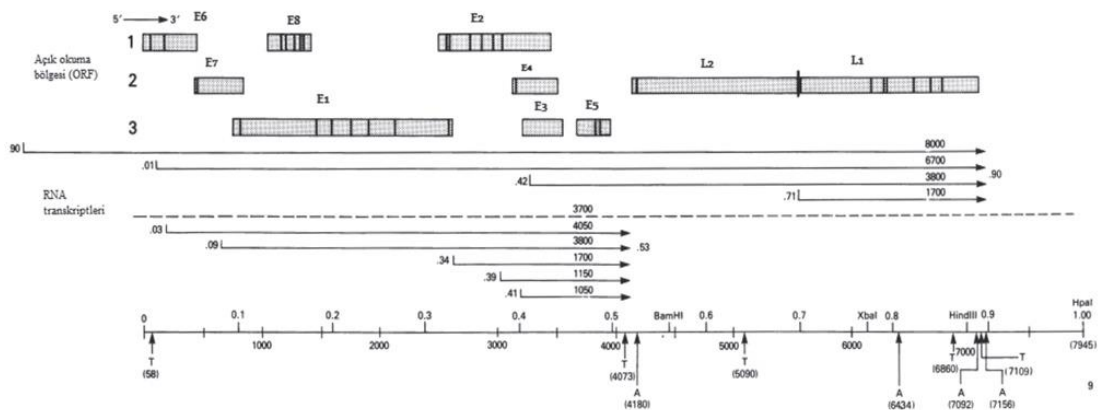


Resim 2. 3. HPV'nin çift sarmallı DNA'sı (300 x 250 Px) (41)

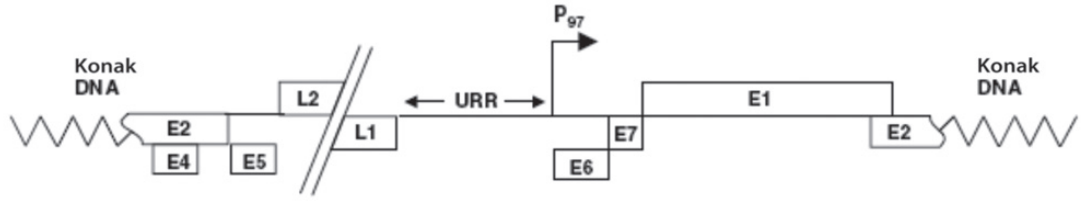
Küçük boyutlarına karşın papilloma virüslerin moleküler yapıları son derece komplekstir (42). Bu kompleks yapı fonksiyonel olarak “erken bölge” (E: Early), “geç bölge” (L: Late) ve “uzun kontrol bölgesi” (LCR: Long Control Region) şeklinde üç bölgeye ayrılır. Bütün papilloma virüslerde bu bölgeler iki poliadenilasyon (pA) bölgesi tarafından Erken pA ve geç pA bölgelerine ayrılır. Erken bölgede altı ve geç bölgede iki ORF (Open Reading Frame =Açık Okuma Bölgesi) bölgesi yer alır. Tüm HPV ORF bölgeleri virüsün yalnızca bir sarmalı üzerinde bulunur ve sekiz ORF bölgesi viral yaşam döngüsündeki gen ekspresyonu sırasında göre erken ve geç olarak adlandırılır. Erken proteinler E1-7 viral replikasyonda ve hücre transformasyonunda rol almaktadır (35,42). Yakın tarihte keşfedilen E3 ve E8 de aynı bölgede oluşmakta olup E2 bölgesinin delesyonu esnasında ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (41,43). Geç gen bölgesinde ise L1 ve L2 kodlanır (Şekil 2.1). L1 geni majör kapsid proteinini kodlarken L2 ise minör kapsid proteinini kodlamaktadır. Bütün bu proteinler transmembranın uyarılması, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve transformasyon aktivitesinin denetlenmesi gibi pleotropik işlevlere sahiptir (44). Entegrasyon genom boyunca rastgele gerçekleşebilir. Fakat genel olarak viral entegrasyon tipik olarak viral E1 ve E2 bölgelerinde ortaya çıkar (42). Bu genler viral gen ekspresyonu ve replikasyonunu regüle eden proteinleri kodlar. E1 proteini viral DNA replikasyonu için önem arz eden helikaz aktivitesine sahip olup viral replikasyonun başlamasında önemli rol oynayan bir terapötiktir. E2 proteini ayrıca iki protein kodlamakta olup bunlardan biri erken bölgenin transkripsiyonunu baskımlarken diğeri ise artırır (24). Servikal kanser gelişiminde E2 bölgesinde sıkça kırılma gerçekleştiği için HPV DNA

entegrasyonu önem arz eder (Şekil 2.2). E2’de entegrasyon sırasında gerçekleşen kırılma E2’nin E6 ve E7 üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırıp virüsün onkoproteinleri olan E6 ve E7 gen ürünlerinin ekspresyonunun artmasına, dolayısıyla onkogeneze neden olmaktadır (45). Bununla birlikte entegrasyon olmaksızın da E6 ve E7 genlerinin ekspresyonu gerçekleşebilir (42,46). Bu nedenle E6 ve E7 onkoproteinleri kanser gelişiminde önemlidir. Bunun yanı sıra HPV tiplerinin yüksek risk taşıması tümör supresör proteini p53 ve retinoblastoma (Rb) ile ilişkili E6 ve E7 proteinlerine sahip olmasından ileri gelir. E6 proteini iki sıra halinde birbirine bağlı 158 aminoasit içerir. E6 proteini p53 ve hücrel ubiquitinasyon enzim E6-AP’yi kapsayan üçlü bir kompleksin oluşumuyla tümör supresör p53 proteinin parçalanmasını uyarmak suretiyle hücre proliferasyonuna teşvik eder (Şekil 2.3). E6 ile aktive edilen parçalanma neticesinde hücre döngüsünün ilerlemesi bozularak tümör hücre gelişiminde artış gerçekleşir (47).

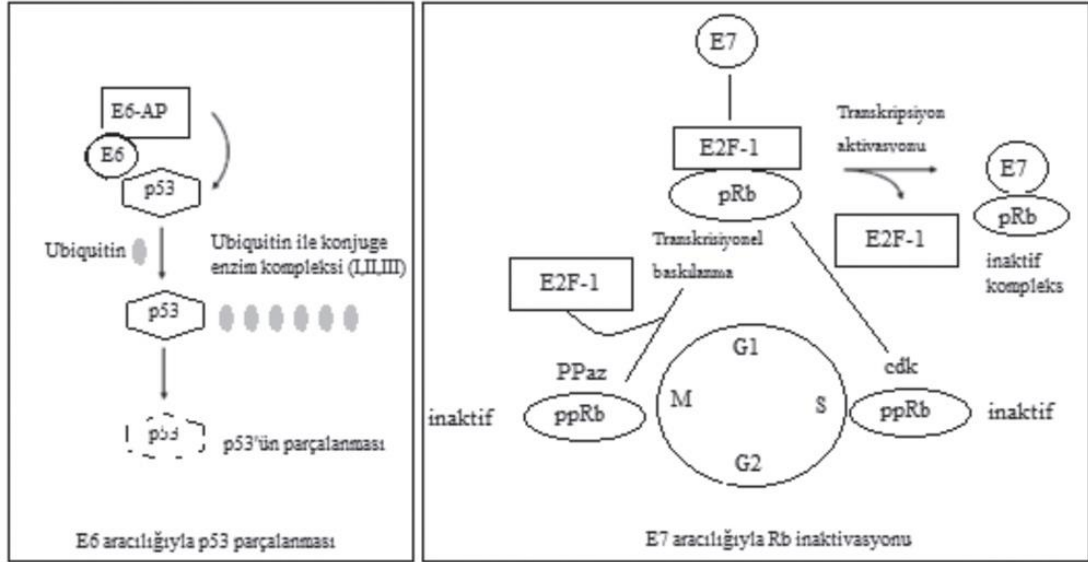
E6 ve E7 genlerinin transformasyon aktivitesi onların hücre döngüsünde görevli proteinlerle olan etkileşimlerinden kaynaklanır. E7 proteinin HPV 16 ve 18 gibi yüksek riskli HPV tiplerince kodlanmakta ve Rb’ye yüksek affinite ile bağlanmaktadır. E7 proteini Rb’ye “cep domaini” olarak adlandırılan bir bölgeden bağlanır. Rb’nin cep domain dizisi tümör supresör fonksiyonu için önem arz eder. Rb’nin önemli biyokimyasal fonksiyonlarından bir diğeri de EF2 transkripsiyon faktörlerine bağlanmak ve replikasyonda görevli olan enzim genlerinin ekspresyonunu inhibe etmektir. Replikasyonda görev alan enzim genlerinin baskılanma kabiliyeti Rb’nin tümör supresyon fonksiyonuyla ilişkilidir (48).



Şekil 2. 1. İnsan papilloma virüsünün genetik yapısı (44)



Şekil 2. 2. Karsinogenezde E2 gen bölgesinde kırılma(46).



Şekil 2. 3. Tümör supressörlerin normal fonksiyonuna engel olan Rb ile p53'e bağlanan HPV E6 ve E7 proteinleri (47).

E5 protein enfeksiyon başlangıcında son derece önemlidir. Epidermal büyüme faktör reseptörü, trombositleri aktif hale getiren büyük faktör reseptörü ve koloni uyarıcı faktör-1 reseptörü ile kompleks meydana getirmek suretiyle hücre büyümesini uyarır. Son dönemlerde ayrıca E5 proteininin apoptozisi takip eden DNA hasarında da etkili olduğu bildirilmiştir (49). Bunun yanı sıra HPV enfeksiyonuyla ortaya çıkan servikal kanser lezyonlarında yaygın olarak episomal viral DNA konak DNA'sına entegre olmakta ve E5 proteinini kodlayan diziyi de kapsayan genomun küçümsenmeyecek bir parçası delesyona uğramaktadır. Bu sebepten ötürü de HPV ile ilişkili karsinogenezin geç döneminde E5 zorunlu değildir (37, 42).

E8 açık okuma bölgesinin HPV-1 ve 31 dışında pek çok tavşan papilloma virüsünde de onkojen olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra HPV-1 ve 31'de viral transkripsiyon ve replikasyonun negatif düzenleyici olarak E8-E2 füzyon proteini tespit edilmiştir (42,43). E8 geninin bir parçası E8-E2 füzyon proteini, E2 geninin C

terminaline bağlanmış olup viral transkripsiyonun alternatif yollarından birini teşkil eder (50). E8-E2C'nin viral yaşam döngüsünün erken evresi süresince HPV DNA replikasyonunun negatif bir regülatörü olduğu ileri sürülmektedir (51,52).

Geç gen bölgesinde bulunan L1 geni viral protein kılıfının önemli bir bölümünü meydana getiren majör kapsid proteinini oluşturmakta iken L2 geni ise minör kapsid proteinini oluşturur (52). L1 bölgesi yeni virüslerin tanımlanmasında kullanılmakta olup yeni bir papilloma virüs izolatu L1 bölgesindeki DNA dizisindeki mevcut papilloma virüslerden %10'dan fazla farklılık arz ediyorsa yeni bir papilloma virüs şeklinde tanımlanırken %2-10 arasında ya da %2'den az farklılık gösteriyor ise alttip olarak tanımlanır (37).

Enfeksiyon ve vejetatif viral büyümenin tanımlanması keratinosit farklılaşmasına bağlıdır. Virüsler ilk olarak öncül bazal keratinositleri enfekte etmekte, fakat viral proteinlerin yüksek düzeyde sentezi ve viral ürünleri bir araya toplanması yalnızca skuamöz epitelin stratum spinosum ve granulosum tabakalarında gerçekleşir (53). Viral genlerin sentezi keratinositlerde gerçekleşmekte olup keratinositlerden başka herhangi bir hücrede viral gen sentezinin gerçekleştiği kanıtlanmamıştır. Bazal hücrelerde virüs enfeksiyonuyla başlangıçta düşük kopya sayısı görülmekte iken daha sonra ise hücre döngüsüne bağlı olarak viral DNA replikasyonunda viral yük yaklaşık 50-100 kopya/hücre sayısına ulaşmaktadır. Enfekte hücre öncül hücreden ayrılıp diğer epitelyum tabakasına girer (54). Daha sonra viral gen ekspresyonu minimal düzeydedir ve bilhassa E6 ve E7 onkogenlerinin ifadesi E6/E7 transkriptleriyle sıkı şekilde kontrol edilir (55). Enfekte keratinosit farklılaşmış olan tabakalara girdiği zaman hücre döngüsünden ayrılır. Burada viral gen ekspresyonunun etkili bir regülasyonu söz konusu olup viral DNA replikasyonu meydana gelir. Viral kopya sayısı en azından 1000 kopya/hücre sayısına ulaşır. Erken genler E6 ve E7'nin çok sayıda ekspresyonu ve geç promoterdan geç genlerin ekspresyonu görülür (54,55).

Hücre döngüsü ile farklılaşan hücrede gerçekleşen bu olaylar son derece önemlidir. Papilloma virüsler yalnızca bir DNA replikasyon enzimi E1 ve viral E2 proteinini kodlamaktadır. Replikasyon tamamen hücresel DNA sentez mekanizmasına bağlı olup hücresel DNA polimerazın ve replikasyon faktörlerinin mitotik olarak aktif

hücrelerde üretilmesi virüs için bir sorundur. Bu sorunun üstesinden gelmek için virüsler viral yaşam döngüsü kapsamında proteinler kodlamaktadır. Döngüsüz hücrelerde hücre DNA sentezini reaktif edip apoptozisi inhibe eder ve enfekte keratinositlerin farklılaşma programının geciktirilmesine neden olur (56). Viral DNA replikasyonuna izin veren bir çevre meydana getirir. Meydana gelen olayların ayrıntıları tam olarak anlaşılammış olmakla beraber bu fonksiyonlar için viral genlerin merkezi E6 ve E7'dir. Yüksek riskli HPV replikasyonda belirtilen bu fonksiyonla enfekte hücrelerde büyüme kontrol edilememekte ve kanser gelişimi gözlenmektedir (57).

2.1.5. HPV Enfeksiyonunda Bulaşma yolları

Human Papilloma virüs kontamine yüzeylerden, ciltteki lezyonlardan, doğum kanalından olmak üzere doğrudan veya dolaylı olarak pek çok şekilde bulaşmakla beraber (55) en önemli bulaş cinsel yolla gerçekleşir (56). Şiddetli enfeksiyonlarda cinsel aktivite sırasında skuamöz veya mukozal epitelde meydana gelen aşınmalar ya da hasarlar ile bazal hücrelere doğru HPV'nin ulaşması gerekir (55). Yapılan araştırmalarda cinsel olarak aktif olan kadınların yaklaşık %75'inde HPV varlığı bildirilmiş olmakla beraber genital HPV enfeksiyona sahip bireylerin eşlerinde %60-66 oranında ortalama üç ay gibi bir süreden sonra genital HPV lezyonlarının görüldüğü bildirilmiştir (56). Cinsel yolla bulaşta en önemli faktörler cinsel eş sayısı ve enfeksiyonun olduğu yaştır. Bilhassa ilk cinsel ilişki yaşının düşük olması HPV enfeksiyonunun ortaya çıkmasında ve daha sonra ortaya çıkacak malign lezyonlar bakımından son derece önemlidir (58). Bunun yanı sıra serviks enfeksiyonunda çoğunlukla cinsel ilişkinin gerekli olduğu ifade edilmektedir. Fakat HPV anogenital bölgeleri de enfekte edebilir. Aynı zamanda HPV'nin cinsel ilişki olmadan dolaylı bulaşla kontamine yüzeylerden ve deriden deriye temas ile de bulaşabileceği bilinir. Ender olarak gözlenen bir durum olarak da annen bebeğe doğum kanalı ile fetal olabilen rekürren solunum papillomatozis (Recurrent Respiratory Papillomatosis, RRP) bulaşı olabileceği de bildirilmiştir (55). Bazı araştırmalarda servikal HPV taşıyan kadınlardan doğan çocukların nazofarenks sekresyonlarında %4-87 oranında HPV DNA pozitifliği bildirilmiştir (59).

2.1.6. HPV Enfeksiyonunun Klinik Belirtileri

Yaklaşık 40 HPV genotipinin genital mukoza enfeksiyonuna yol açtığı bilinmekte olup kanserojen potansiyeline göre sınıflandırılır. Düşük riskli HPV tipleri genital siğiller ve düşük dereceli genital anormallikleri kapsayan benign lezyonlara neden olur. Fakat genital kanserlerde bulunmazlar. Bu sebepten ötürü düşük riskli olarak adlandırılmaktadırlar. Yüksek riskli HPV tipleri hem düşük hem yüksek dereceli prekanseröz lezyonlara yol açarlar. Bunun yanı sıra invaziv kanserlerde gözlenen tipler için yüksek riskli tanımlaması yapılmaktadır (55). HPV yalnızca servikal kanserlerde değil ayrıca deri ve farengeal kanserler gibi diğer malignitelerle ilişkili vajinal, vulvar, penis ve anal kanserlerden de sorumludur (60). HPV enfeksiyonlarının büyük bölümü asemptomatik olmakla beraber farklı klinik tablolar gözlenebilir (35). Değişken klinik tablo virüs tipine, lezyonun lokalizasyonuna, kişinin immünolojik durumuna ve epitelin doğasına bağlıdır (61).

Genital siğiller birkaç ayda gözlenmesine karşın servikal kanser oluşumu ise yıllar alabilmektedir. Bunun yanı sıra çoğu HPV enfeksiyonu asemptomatik olup yalnızca HPV DNA testi uygulandığı zaman saptanabilir. Sağlıklı bireylerde enfeksiyonun %75'ten fazlası 30. ayda belli olmaktadır ki bu durum bilhassa düşük riskli grupta doğrulanmıştır (55). Genital HPV enfeksiyonunun temel klinik aşamaları; 1. Latent, 2. Subklinik ve 3. Klinik dönemler şeklindedir. Virüs öncelikli olarak bazal laminaya yakın stratum germinativumdaki hücreleri enfekte etmektedir. Bu da genellikle cinsel ilişkiye bağlı mikrotravmaların olduğu bölgede meydana gelir. Hastalığın latent dönemde sitolojik ya da morfolojik herhangi bir bulgusu olmayıp yalnızca ultraduyarlı PCR yöntemleriyle HPV DNA'sı gösterilebilir (62). Subklinik dönemde HPV'ye bağlı sitolojik-mikroskobik değişiklikler ya da kolposkopi gibi büyütme teknikleriyle görülebilen lezyonlar bulunmaktadır. Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) ve intraepitelyal neoplaziler genellikle bu dönemde oluşmaktadır. Genital kondilom veya invaziv kanser gibi gözele görülebilen lezyonların ve belirtilen olduğu dönem klinik dönemdir. İmmünolojik kontrolün kaybı ile virüs genomu replike olur ve ortaya çıkan büyüme faktörlerinin etkisi ile epitelyum proliferasyonu, intermediyer hücre hiperplazisi ve hiperkromazi meydana gelir (63).

CIN normal olarak subklinik bir enfeksiyon olup kapiller ve stromal proliferasyon

gözle görülebilecek bir kondilom yapacak düzeyde değildir. Halbuki olguların %30'unda bu proliferasyon yoğun olup servikste gözle görülebilir ekzofitik kondilom meydana gelebilir. Epitelyum tabakası üst sıralarında HPV'nin karakteristik bulgusu olan "koilositoz" ortaya çıkar. Koilositler malign dönüşüm göstermeyen, ölü ya da ölmekte olan stratum granulosum hücreleridir. Koilosit çekirdeği düzensiz ve virüs partikülleriyle dolu olduğunda hiperkromatiktir. Sitoplazmada çekirdeğin hemen üzerinde vakuol bulunmakta olup bu koilositler esasen düşük riskli HPV enfeksiyonlarının belirteci olarak kabul edilir (64,65).

2.1.7. HPV Enfeksiyonunda İmmün Yanıt

HPV enfeksiyonlarında immün yanıt diğer enfeksiyonlara kıyasla çoğunlukla daha geç geliştiğinden konak immün yanıtından HPV kaçmaktadır. Bu kaçma sırasında çeşitli immün sistem fonksiyonları da inhibe edilebilir ki bu sebepten ötürü HPV enfeksiyonları geç iyileşir. Yüksek riskli HPV tiplerinin temizlenmesi yaklaşık 16-18 ay sürmekte iken düşük riskli tiplerin temizlenmesi ise 10 ayda gerçekleşebilmektedir (35). İmmün sistemden kaçabilmek için virüs tarafından pek çok mekanizma geliştirilmiştir. Bu mekanizmalardan en önemlisi "replikasyon döngüsü"dür. Viremi fazı bulunmamaktadır. Enfeksiyonun epitelyum hücrelerinde lizise neden olmaması ve farklılaşmaya bağımlı viral protein ekspresyonunun immün sistem hücrelerinin uzağında, epitelyumun üst tabakalarında olması doğal immün yanıt uyarılmasında azalmaya yol açar. immün yanıtın kaçmadaki bir başka önemli husus da keratinositlerin iyi antijen sunamaması olup böylelikle adaptif immün sistemin aktive olması geciktirilir. Aynı zamanda HPV'de doğal immüniteyi engelleyici çeşitli mekanizmalar da bulunmaktadır. Örneğin yüksek riskli HPV'lerde E6 ve E7 proteinleri hücre yüzeyinde MSHV-I ekspresyonunda azalmaya, Tip-1 interferon ekspresyonu ve sinyal iletiminde inhibisyona yol açmaktadır (66).

2.1.8. HPV Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Yöntemler

1. Moleküler olmayan teknikler

Moleküler yöntemlerin haricinde çıplak gözle muayene, kolposkopi, histoloji ve sitoloji gibi yöntemlerle de HPV tanısı konulabilmekte olup bu yöntemlerden

histoloji ve sitoloji taramalarıyla HPV varlığı arasında ilişki olduğu bildirilmektedir. Özel olarak sitolojinin kullanılması serviks kanserleri için bir seçim aracı olarak kabul edilmektedir (67).

Çıplak gözle inceleme

Çıplak göz ile muayene asetik asit veya lugol iyot kullanılarak yeterli ışık kaynağı altında serviks incelemesi esasına dayanır. Asetik asit HPV içeren epitelyum hücrelerinin beyazlatılmasını sağlamakta iken iyot da hücrelerin koyulaşmasına yol açar (67).

Kolposkopi

Serviksin mikroskop ve ışık yardımı ile görüntülediği işlem olup transformasyon sonunda serviks üzerinde veya kanalındaki lezyonların tanımlanması, prekanseröz servikal lezyonların araştırılması ve anormal Pap-smear neticesinde biyopsi yapılacak alanların belirlenmesi amaçlanmaktadır (68). Servike kolposkopi incelemesinde %3-5'lik asetik asit uygulanır. Bu uygulama hücrelerin sitoplazmasında dehidratasyona yol açar. Malign epitelyum veya benign metaplastik gibi daha fazla nükleer yoğunluğa sahip bölgeler ısıyı altta bulunan stroma tabakasına iletmek yerine daha da ısıtmak suretiyle pembe veya kırmızı yerine beyaz olarak görülür (asetobeyaz). Nükleer dansitenin arttığı yüksek dereceli CIN lezyonlarında epitelyum diğer lezyonlarıkinden daha opak görülmektedir (67).

Sitoloji ve Histoloji

Kolay ve hızlı tanıyan bir yöntem olan sitolojik tanı dokuya herhangi bir zarar vermemekte ve sıkça hücre örneği alınabilmesine uygun bir yöntemdir. Sitoloji yalnızca tarama testidir ve mevcut hastalığın son kanıtı olmayıp yalnızca kolposkopi ve histoloji gibi diğer yöntemler ile birlikte irdelenmelidir (69). Viral enfeksiyon varlığını gösteren sitolojik değişikliklerin Papanicolau boyasıyla tespit edilmesi servikovajinal hücrelerde tarama amacıyla günümüzde kullanılmaktadır. Dr. Papanicolau tarafından geliştirilmiş olan bu yöntem kısaca Pap-smear olarak bilinir (70). Genel olarak bu yöntem dökülen normal hücreler ve hastalıktan ötürü sitolojik olarak değişmiş olan hücrelerin incelenmesi esasına dayanır. Gecikmiş maturasyon

nükleer atipi, parakeratozis, hiperkeratozisin yanı sıra yüksek dereceli sitolojik değişiklikler göstermesi bakımından invaziv servikal kanserlerde tanı koydurucu bir yöntemdir (69). Histolojik incelemelerde kesin tanı için gereken, muayene ve tarama sonucu kuşkulu bölgeden konizasyon, LEEP (Loop Elektrocerrahi Eksizyon Prosedürü), LETZ (Large Excision of the Transformation Zone), endoservikal kürtaj, punc biyopsi ile alınan doku örneklerinin patolojik incelenmesine dayanmaktadır (67). Bu yöntemler düşük duyarlılıkta olduklarından kesin tanı için immünolojik/nükleik asit tanı yöntemlerine ihtiyaç vardır (70).

2. Moleküler teknikler

HPV tespitinde “polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)” ve “hibrid yakalama (Hybrid Capture-HC)” olmak üzere iki temel teknik söz konusudur.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İnvitro olarak nükleik asitlerin replikasyonu amacıyla geliştirilen, oldukça geniş kullanım alanına sahip bir yöntemdir. Hedef DNA'nın seçici olarak amplifiye edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Amplifikasyon sonucunda hedef DNA logaritmik artmakta ve 30 döngüden sonra bir milyonun üzerinde hedef DNA oluşmaktadır (68).

Hybrid Capture Testi

Birinci nesil hibrid yakalama tüp testi (HCT) ve yeni hibrid yakalama II (HCII) olmak üzere iki çeşidi bulunmakta olup bu testler kullanılmak suretiyle yüksek riskli HPV tipleri saptanabilmektedir. Hibrid yakalama testi aynı zamanda gruplar halinde tanımlamaya da imkan tanıyan bir testtir (71).

HPV mRNA'sının Belirlenmesi

Yüksek riskli HPV türlerinde E6/E7 mRNA tespitinin HPV DNA testine kıyasla duyarlılığının daha yüksek olduğu bilinmekte olup bu teknikle öncül işaretleyici olan HPV'nin onkogenik aktivitesinin saptanması, taramanın daha etkin olmasında ve serviks lezyonunun prognozunun tespitinde E6/E7 mRNA'nın kullanılmasının faydalı olabileceği sonucunu ortaya çıkarmıştır (72).

2.1.9. HPV Enfeksiyonunda Tedavi

HPV tanılı bireylerde tedavi planlaması yapılırken hastanın yaşı, lezyonun yaygınlık derecesi, çocuk isteği gibi faktörler dikkate alınmaktadır ki bu şekilde en ideal tedavi planlaması ve seçimi yapılabilmektedir. Kullanılan tedavi yöntemleri arasında elektrokoterizasyon, kriyoterapi, lazer vaporizasyonu veya konizasyonu, sıcak/soğuk konizasyon, LEEP, histerektomi gibi tedavi yöntemleri bulunmaktadır. Genç ve lezyonun yaygın olmadığı hastalarda serviks koterize edilebilir (73,74). Kriyoterapi lezyonun dondurulup tedavi edilmesi prensibine dayanır. Isı ani bir şekilde düşürüldüğünden intrasellüler sıvı kristalleşmekte, hücre zarı ve organeller de parçalanmaktadır (74,75).

Bir diğer tedavi yöntemi lazer vaporizasyon olup bu yöntemde lazer ışığı içerisinde sıvı olan ortamlar tarafından yoğun miktarda abrosblanır. Lezyonun sınırlarının belirlenmesinin ardından 7-10 mm derinliğe kadar olan bölge silindir şeklinde vaporize edilir. Sonuç olarak lezyon yok olur ve yok olduğu bölgede bir krater kalır. Bu krater en geç 45 gün içerisinde epitelize olur (73). Bir diğer tedavi yöntemi lazer konizasyondur. Bu yöntemde lezyon sınıflarının belirlenmesinin ardında lazer yardımıyla konik şekilde bir parça serviksten çıkarılır. Özellikle bütün dokunun histopatolojik olarak incelenmesinin gerekli olduğu durumlarda tercih edilen bir yöntemdir (74). Elektrokoterin serviks için hazırlanmış olan özel kesici tel ucu tarafından gerçekleştirilen prosedür, sıcak konizasyon olarak tanımlanır. Kanamanın daha az ve postop serviks anatomisinin daha iyi olması halinde soğuk konizasyon tercih edilir. Bistüri yardımıyla gerçekleştirilen klasik konizasyon soğuk konizasyondur. Cerrahi sınırların bozulmayıp histopatolojik incelemeyi engellememesi bu yöntemin en önemli özelliklerindedir (73). Bir diğer tedavi yöntemi LEEP'dir. Kolposkop altında bütün transformasyon zonu görülebiliyor ise lokal anestezi uygulanarak düşük voltaj diatermi loop'u ile eksize edilebilir. Lokal anestetik 10 ml'den daha az kullanılmakta olup kan kaybının azaltılması için epinefrin veya vazopressin 3, 6, 9 ve 12 hizalarından servikse enjekte edilmektedir. 3-5 dakika sonra bütün lezyonu eksize edebilecek büyüklükte bir loop ile eksizyon yapılmaktadır. Bu yöntemin inceleme amacıyla doku eldesi ile tanı ve tedavinin aynı seansta gerçekleştirilebilmesi gibi önemli avantajları söz konusudur. Buna karşın pek

çok hekim tarafından serviksin büyük kısmının alınmasından ötürü, genç ve çocuk sahibi olmayan hastalarda çok fazla tercih edilmemektedir (76). Bir diğer tedavi yöntemi de histerektomidir. Bu yöntem CIN'in bütün tedavi yöntemleri arasında en yüksek başarı oranına sahip tedavi yöntemidir. İntraepitelyal ya da invaziv kanser tekrarı %1'in altındadır. Histerektomi çocuk arzusu bulunmayan, kalıcı kontrasepsiyon isteyen, düzenli kontrollere istekli olmayan ve histerektomi gerektiren ek patolojisi bulunan CIN'li vakalarda uygun bir tedavi yöntemidir (74,76).

2.1.10. HPV Enfeksiyonunda Takip

Önlenebilir kanser türlerinden olan serviks kanserinin etyolojisinde bulunan HPV'nin tespiti invaziv kanser sıklığının ve mortalite oranının düşürülmesinde önemlidir. Bilhassa riskli hastalarda yapılan sürveyans neticesinde önemli oranda servikal kanseri önlenebilir hale gelmiştir (77). Ayrıca HPV ile enfekte kişilerin yaklaşık %90'ında viral klirens olduğu bilinmekte olup bunun için belirli bir süre verilmemektedir. Fakat yapılan araştırmalarda 4-6 ay ile 1-2 yıl arasında gerilemenin olduğu bildirilmiştir. Halbuki bu olguların %10'u progrese olarak intraepitelyal lezyona dönüşmekte, bunların da %1'i invaziv kansere dönüşebilmektedir (78). Bu nedenle hasta Pap smear takibi yaptırmalıdır.

2.1.11. HPV Enfeksiyonunda Korunma ve Aşılar

HPV epitelyumda bulunduğu konak immün sistemiyle minimum iletişim halindedir. Bu sebepten ötürü de immün yanıt çoğunlukla kısa süreli ve geçicidir. HPV, virüs benzeri partiküllerin (VBP) keşfiyle beraber proflaktik aşıların ilk jenerasyonu da geliştirilmiştir (72). Proflaktik bivalan HPV 16/18 ve kuadrivalan HPV 6/11/16/18 aşıların klinik uygulamaları yapılmış olup bunların önemli yan etkileri bulunmaksızın HPV enfeksiyonuna karşı yüksek etkinliğe sahip olduğu tespit edilmiştir (79). Bu aşılar primer enfeksiyonun yanı sıra enfeksiyon sonrasına karşı da korumaktadır. Hedef enfeksiyonun meydana geldiği alanda etkin immün yanıt oluşturmak suretiyle ortaya çıkabilecek enfeksiyonu ve tekrar enfeksiyon ortaya çıkmasının önler (80).

Kuadrivalan aşı kadınlarda genital siğiller, vulvar intraepitelyal neoplazi, vajinal intraepitelyal neoplazi, in situ adenokarsinom ve servikal kanserle ilişkili HPV 6/11/16/18'in önlenmesi amacıyla geliştirilmiştir. Bu aşı 2006 yılı Haziran ayında FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Teşkilatı) tarafından adölesan dönemde kullanım için onaylanmıştır. Kuadrivalan aşı ülkemiz ilaç piyasasında 2007 yılı Nisan ayından itibariyle yerini almıştır. HPV 16 ve 18'e karşı koruyan bivalan aşı ise bilhassa serviks kanser ve prekürsör lezyonların önlenmesini amaçlar. Oluşan antikor titresi uzun bir süre yüksek düzeylerde tutulabilmektedir. 2009 yılı Ekim ayında bu aşı adölesan dönemden itibaren kullanılabilmesi için FDA tarafından onaylanmıştır (81). Kuadrivalan ve bivalan aşılardan her ikisi de rekombinant aşı teknolojisi kullanılarak majör kapsid (L1) proteinlerinin saflaştırılması ile elde edilen tipe özgü VBL'leri içerir (82). Aşılar viral DNA yahut biyolojik ürünleri içermediğinden enfeksiyona yol açmazlar. Terapötik aşılar önceden meydana gelen enfeksiyonun bertaraf edilmesi ve malign hastalığın gelişimi bakımında koruyucu etki oluşturan aşılardır. Profilaktik aşılar kullanılmakta olan antijenler ana kapsid antijeni olarak sentezlenmekte olup DNA içermeyen VBP'dirler ve yüksek titrede nötralizan antikor oluşturmak suretiyle humoral yanıt sağlarlar (83). Profilaktik amaçlı antikor uyarıcı aşılar ise mevcut dirençli enfeksiyonu ortadan kaldıramaz. L1 ve L2 kapsid proteinleri basal hücrelerde ifade edilemedikleri için terapötik aşılar açısından iyi hedef değildirlir (84). Buna karşın terapötik aşılar mevcut enfeksiyon yahut neoplazi durumunda tedavi edici aşılar (61). Dolayısıyla da terapötik aşılar E6/E7 gen ürünlerinin kullanılması beklenen etkilerin sağlanabilmesi açısından uygundur. Aşılar üzerine gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar incelendiğinde HPV VBP aşılarının iyi tolere edilebilen ve yüksek düzeyde immünojenik aşılar olduğu, aynı zamanda yüksek antikor titrelerine neden oldukları, dirençli HPV enfeksiyonu ile ilişkili klinik hastalığın ortadan kaldırılmasında etkili aşılar oldukları bildirilmiştir (85). Faz-II çalışmalarında plasebo ile bivalan aşı kontrol edildiğinde serekonversiyon oranının 100 kat ve doğal enfeksiyondan yaklaşık 80-100 kat daha yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir (85). Dirençli enfeksiyonlarda etkinlik %100 iken sitolojik anormalliklerde ise %93 olarak bildirilmiştir. Faz-III çalışmalarında ise kuadrivalan aşıların etkinliğinin dirençli enfeksiyonlarda %90 olduğu tespit edilmiştir (85,86). Servikal kanserlerin önlenmesi için HPV aşılmasının 20 yaşından önce

uygulanması gerekir. Virüse maruz kalan erişkin bireylerin aşılmasının faydalı olup olmayacağı konusu henüz net değildir (85,87). Aşılama için ideal yaş grupları cinsel ilişkiye başlama yaşı, viral epidemiyoloji, ülkelerin aşılama politikaları gibi faktörler dikkate alındığında ülkeler arasında farklılık arz ettiği söylenebilir. İmmünolojik araştırmalar VBP aşıları ile 9-15 yaş grubunda daha iyi serolojik yanıt alındığı tespit edilmiştir (88). Bununla birlikte yapılan bazı araştırmalarda aşıların 15-26 yaşlar arasında daha etkili olduğu gösterilse de etki yalnızca HPV DNA (-) ve serolojik açıdan negatif olanlarda gösterilmiştir. Bu duruma bağlı olarak da ABD’de FDA tarafından quadrivalan aşının 9-26 yaş arasında kullanımını için onay verilmiştir (89).

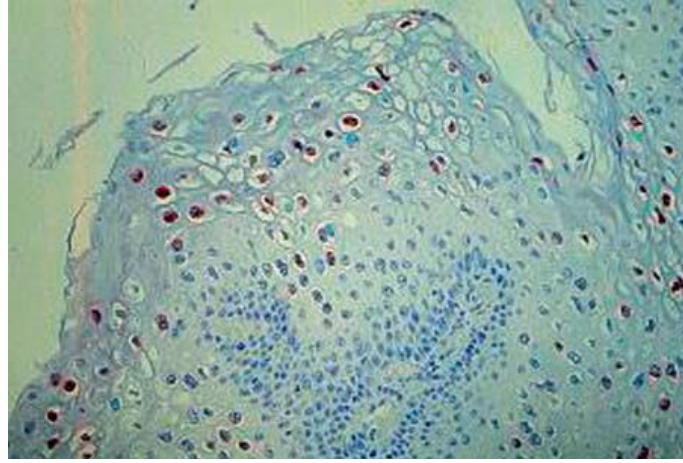
2.1.12. HPV Kanseri İlişkisinde Beklentiler

Human Papilloma Virüs’ün mukotropik bir virüs olması ve etiyolojisinde yer aldığı bilinen kanserler ile ilişkisi incelendiğinde belirli bir takım özellikler gösterdiği saptanmıştır. Bu sebeple HPV’nin sebep olduğu kanserlerin ortak özellikleri olduğu öngörülmektedir. Bu beklenen karakteristikler 2003 yılında Gillison ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (90).

Human Papilloma Virüs ile kanser ilişkisi virüs karakteristikleri tarafından araştırıldığı zaman, HPV’nin bazı tiplerinin kanser gelişimi ile daha yakın ilişkide bulunduğu görülmüştür. Bu bulgu HPV tiplerinin kansere sebep olma yatkınlıklarına göre yüksek ve düşük risk olarak sınıflanmasına neden olmuştur. Yüksek riskli tipler arasında 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 83 sayılabilir. Bu virüslerin DNA kopyaları tümör hücre çekirdeklerinde saptanmış ve viral onkogen ekspresyonunda rol aldıkları bulunmuştur. Viral DNA genellikle tümör DNA’sına entegre şekilde bulunur ve en az bir kopyası transkripsiyonel olarak aktiftir. Düşük riskli tipler ise HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81’dir. Servikal kanser gelişiminin displaziden in situ ve invaziv karsinoma kadar tüm evrelerinde HPV DNA’ya rastlanması da virüs karakteristiklerinin kanser gelişiminde önemli olduğu tezini desteklemektedir (90).

Virüsün tiplerinin oluşan kanser tipleriyle de ilgisi olabilir. Bilindiği gibi serviksın yassı hücreli karsinomunda en sık etken HPV tip 16 iken ilginç bir şekilde, servikal

adenokarsinomunda HPV tip 18'e daha sık rastlanıldığı belirtilmektedir (91).



Resim 2. 4. CIN1 in situ hibridizasyon (ISH) ile HPV 16/18 tespitiyle ilişkilidir (36)

Human Papilloma Virüs ile ilişkili kanserler, tüm dünyada tanı konan kanser vakalarının %5'inden fazlasını oluşturmaktadır, bu insidans gelişmekte olan ülkelerde daha yüksektir ve bu oranın her yıl yaklaşık yarım milyona neden olduğu tahmin edilmektedir (92). HPV'nin, hem DNA'ya entegre edilmesiyle hem de entegre olmayan epizomlar aracılığıyla kansere neden olduğuna inanılmaktadır (93).

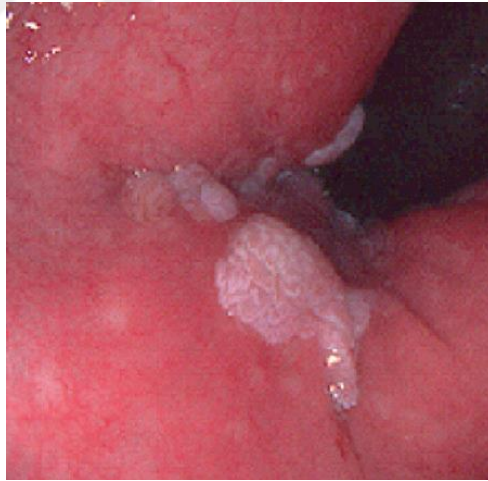
Human Papilloma Virüs tarafından taşınan bazı "erken genler", örneğin E6 ve E7 genleri, tümör büyümesini ve malign transformasyonunu destekleyen onkogen olarak davranırlar. Ayrıca HPV, DNA kopya sayısındaki değişikliklerle ilişkili olan konak genomuna entegrasyon yoluyla bir tümörejenik prosesi indükleyebilir (94).

Bu kanserlerde temel olarak eksprese edilen yüksek riskli HPV'lerin E6 ve E7 onko-proteinleri sırasıyla p53 ve pRb tümör baskılayıcılarını inaktive eder. E6, p53'ün yardımcı bir protein ile birleşmesi yoluyla bozulmasını kolaylaştırır, E6-AP, ubiquitin proteolitik yolağının bir bileşenidir. Her ne kadar yüksek riskli HPV'lerin E7 proteinleri Rb'ye ve ayrıca p107 ve p130 gibi diğer cep proteinlerine bağlanır, bu da hücre döngüsünün deregülasyonuna neden olur. Bu, genomik instabilite ile sonuçlanır ve normal hücrelerin kanser hücrelerine ilerlemesinde rol oynamaktadır (7).

Çalışmalar aynı zamanda çok çeşitli HPV tipleri ve cildin skuamöz hücreli

karsinoması arasında bağlantı olduğunu göstermiştir. Bu gibi durumlarda, in vitro çalışmalar, HPV-E6 proteininin ultraviyole ışının neden olduğu apoptozu inhibe edebileceğini düşündürmektedir (95).

- Servikal kanseri: HPV'nin ilişkisi en iyi gösterilmiş olan kanser türü olup, neredeyse tüm servikal kanserlerin etyolojik nedeni olarak kabul edilmektedir.
- Vulvar kanseri: Yaklaşık % 69'u HPV ile bağlantılıdır.
- Vajinal kanser: Yaklaşık % 75'i HPV ile bağlantılıdır.
- Penil kanseri: Yaklaşık % 63'ü HPV ile bağlantılıdır.
- Anal kanseri: Yaklaşık % 91'i HPV ile bağlantılıdır.
- Oral-farigeal kanser: Yaklaşık % 72'si HPV ile bağlantılıdır (96).



Resim 2.5. Rektal ampullada HPV ile ilişkili lezyondur (36)

2.1.13. Tümör Tipi

Human Papilloma Virüs'ün bulaştığı anatomik bölgeler arasında perine, genital bölgeler, anüs, orofarinks ve cilt olduğu düşünüldüğünde, HPV'nin özellikle epitel dokuya bulaştığı görülmektedir. HPV'nin ilk olarak bazal hücrelere entegre olarak karsinogenezi başlattığını ve bahsettiğimiz alanların önemli bir bölümünde ana hücre

tipinin yassı (skuamöz) hücre olduğu ve bu sebeplerle HPV'nin neden olacağı tümörlerin bazaloid yassı hücre tipinde olacağı rahatlıkla söylenebilir. Serviks kanserleri dışındaki adenokanserler ise HPV ile çok ilişkilendirilememiştir. Bu yassı epitel hücrelerinin kanser gelişimine yatkınlığı ya da HPV'nin belli bir hücre tipini daha kolay enfekte ederek karsinogeneze neden olması ile açıklanabilmektedir (90).

2.1.14. İmmünsüpresyon Bağı

Human Papilloma Virüs bağlantılı hem iyi huylu lezyonların hem de tümörlerin immünsüprese olan ya da immünsüpresif tedavi alan hastalarda çok daha sık olduğu hepimizin günlük hayatta gördüğü bir durumdur. İmmünsüpresiflerde hücre bağımlı bağışıklığın bozulması sebebiyle viral enfeksiyona bağlı gelişen tümörlerin arttığı düşünülmektedir (97). HPV ile ilişkili kanserlerin de bu hasta grubunda arttığı gösterilmiştir (98).

2.2. Meme kanseri

Uluslar arası Kanser Araştırmaları Kurumu (IARC) 2008 yılı verileri incelendiğinde dünya genelinde meme kanseri kadınlar arasında bütün meme kanserleri dikkate alındığında %23'lük oran ile en yaygın, servik kanseri de %8.8'lik oran ile üçüncü sıradadır. Ülkemizde ise meme kanseri ve serviks kanserine ilişkin tahmini değerler sırasıyla %25.6 ve %3.7 şeklindedir (99). Meme kanserinin kadınlarda gelişme riski tüm yaşamları boyunca %7-10 arasındadır. Meme kanserine bağlı ölüm olasılığı ise yaklaşık %3.4 olarak hesaplanmıştır (100).

Erkeklerde meme kanseri görülme insidansı ise yaklaşık %1'dir (101). Meme kanseri 25 yaş altında nadir görülürken insidansı yaşla ilişkili olarak artmaktadır. 45-74 yaşları arasında ise en sık görülür (102). Sol memede sağ memeye oranla meme kanseri görülme sıklığı biraz daha fazladır. Meme kanseri %4 hastada iki taraflı primer tümör olarak görülür veya sonradan ikinci bir tümör gelişir. Meme kanserini vakalarının % 50'sinde tümör üst-dış kadranda lokalizedir. Diğer meme kadrانlarının her birinde % 10 oranında görülür. Meme tümörlerin ortalama %20'si santral veya subareolar bölgede görülmektedir (103). Meme tümörün yerleşim yeri lenf nodu metastazlarının görünümünü etkileyen en önemli faktördür. Meme kanseri elle palpe

edilebilir bir büyüklüğe ulaşması (takriben 10 mm) veya mamografi ile saptanabilmesi için (takriben 3-5 mm) tümörün 28-29 eksponensiyel bölünmesi gerekmektedir. Meme kanserinin 1mm³'lük hacime ulaşması ile tümör hücrelerinin hematojen yolla yayılmaya başladığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (103). Meme kanseri metastazları en sık kemik, akciğer ve karaciğere olmaktadır (104). Metastazlar çok uzun bir zaman diliminden sonra klinik belirti vererek ortaya çıkabilmektedir. Meme kanseri hastalarında metastaz gelişen olgulara bakıldığında tedaviden metastaza kadar geçen süre ortalama yaklaşık 42 aydır. Tümör çapı ne kadar küçükse, uzak metastazlarda o kadar geç ortaya çıkmaktadır (105).

2.2.1. Meme kanseri epidemiyolojisi

Meme kanseri dünya genelinde oldukça yaygın kanser türlerinden birisi olup her yıl binlerce yeni tanı konulmaktadır. Avrupa'da her yıl 180 bin, ABD'de ise 184 bin dolayında yeni vaka bildirilmektedir. Meme kanseri insidansı ülkeler arasında, hatta aynı ülke sınırları içerisindeki farklı bölgeler arasında farklılık arz etmektedir. Kaliforniya, Hawaii, Kanada yılda yüz binde 80-90 görülme insidansı ile ilk sıralarda yer almakta iken Japonya'da ise bu oran yüzbinde 12-15'tir. Japonya, Singapur ve Çin'de 1970'ten beridir batı yaşam tarzının yaygınlaşması, doğurganlığın batı toplumlarına benzemeye başlaması gibi nedenlerden ötürü meme kanseri oranlarında artış olduğu görülmektedir. Avrupa'da meme kanseri insidansı kuzeyde yer alan ülkelerde güneydeki ülkelere göre, batıdaki ülkelere de doğudaki ülkelere göre daha yüksektir (106). Meme kanseri insidansı etnik gruplara göre de farklılaşmaktadır. Aynı ülkede yaşayan siyah-beyaz ırk arasındaki farklılığın nedeni çevresel etkenler, yaşam tarzları, sosyo-ekonomik durum olarak ifade edilebilir (107). Ülkemizde 1999'da 8.879 meme kanserli kadın bulunmakta iken bu sayı 2003'te 12.772'ye ulaşmıştır. Bunun yanı sıra bütün kanser türlerinin %24.1'ini de meme kanserlerinin oluşturduğu bildirilmektedir (108). Meme kanseriyle ilgili bu verilerden görüleceği üzere sağlık alanında yaşanan gelişmelere, erken tanı yöntemlerindeki ilerlemelere (109,110), toplumun bilinçlilik ve duyarlılık düzeyindeki artışa (111-113) rağmen meme kanseri ciddiyetini korumayı sürdürmektedir.

2.2.2. Meme Kanseri Etyolojisi ve Risk Faktörleri

İnsanlarda meme kanserinin kesin sebebi bilinmemekle beraber etyolojisinde genetik, çevresel faktörler, yaş, diyet, vücut ağırlığı, alkol kullanımı, fiziksel aktivite, reproduktif yaşam tarzı, endojen ve ekzojen hormonal faktörler gibi birçok faktör rol oynamaktadır (114). Fakat, aynı zamanda onkojenik bir rol oynayabilecek daha az bilinen faktörler de vardır. Virüsler bu konuda bir örnektir (115). Meme kanseri dokularında bugüne kadar birçok virüs tespit edilmiştir. Üç ana virüs, Epstein Barr virüsü (EBV), fare meme tümörü virüsü (MMTV) ve insan papilloma virüsüdür (HPV) (116,117). Hepsinin ortak karakteristiği, kanserin başlamasını ve ilerlemesini indükleyebilmeleridir (1).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada, HPV ile ilişkisi ispatlanmış çeşitli kanser türleri (serviks ve nazofarink gibi) dışında henüz korelasyonu ispat edilememiş, ancak çelişkili bulguların olduğu meme kanserli hastaların doku örneklerinde YR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ve 68) genotiplerini DNA'sı araştırılarak meme kanseri-virüs ilişkisine katkı sağlanması amacı ile planlanmıştır. Çalışma öncesinde Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (Tarih; 06.11.2017 / Karar no: 2017/376) onay alınmıştır.

3.1. Yöntem

Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesinde 2014-2017 tarihleri arasında meme kanseri tanısı almış olan, 27-86 yaş aralığında, kadın hastalara ait 80 meme dokusu parafin bloğundan çalışma yapılmıştır. Çalışmada parafin bloklar eritilerek dokuda moleküler testler ile (HPV Genotypes 14 Real-TM Quant –Italy kiti) yüksek riskli HPV genotipleri (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ve 68) araştırılmıştır. Ayrıca çalışmada servikal intraepitelyal lezyon tanısı almış ve klinik ön tanıda HPV DNA varlığı raporlanmış (klinik ön tanı, patoloji laboratuvarına örnekle birlikte gönderilen hasta bilgi formundan edinilmiştir) 13 hastaya ait servikal doku parafin blok örnekleri kontrol olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1.1. Adımlar

1. Deparafinize etme işlemi,
2. Doku protokolü,
3. QIASymphony SP/AS (izolasyon),
4. PCR mix hazırlama ve örneklerin eklenmesi,
5. Rotor-Gene Q (Hilden, Germany) ile PCR,

6. Değerlendirme,



Resim 3. 1. QIASymphony SP/AS (izolasyon)



Resim 3. 2. Rotor-Gene Q (Hilden, Germany)

3.1.2. HPV Saptanması ve Tip Spesifikasyonu

Bu çalışmada meme kanseri tanısı almış kadın hastalara ait 80 parafin doku bloğu ve servikal intraepitelyal lezyon tanısı almış hastalara ait 13 parafin doku bloğu kullanıldı. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarında meme veya servikal intraepitelyal lezyon tanısı almış ve formalin ile sabitlenerek (buffered

neutral aqueous % 10 solüsyon), parafine gömülü, arşiv materyali olarak stoklanmış olan, tümör dokusu örnekleri, Patoloji Anabilim Dalı'nda proje araştırmacısı tarafından belirlendi. Seçilen dokular meme kanseri tanısı alanlar olarak belirlenmiş olup, kanser türüne bakılmaksızın örnek seçimi yapıldı. Bu şekilde farklı kanser türleri ve HPV arasında ilişki olup olmadığı da araştırıldı.

Deparafinizasyon

Parafin bloktan DNA izolasyonu için gerekli malzemeler;

- %96-100 etanol (Moleküler biyoloji derecesinde)
- Ribonükleaz A
- Ksilen
- Steril dH₂O
- Isıtıcı blok veya su banyosu
- Vorteks cihazı
- Mikrosantrifüj
- Mikrosantrifüj tüpleri (1.5ml)
- Mikropipet seti
- Filtreli mikropipet uçları

3.1.3. Protokol

1. Parafine gömülü olan doku örneği ince parçalara kesildi. 20-30 mg örnek 1.5 mL'lik nükleaz içermeyen mikrosantrifüj tüpünün dibine yerleřtirildi.
2. 1 mL ksilen eklendi ve vorteksle karıştırıldıktan sonra 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

3. 14000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüj edildi, üst sıvı atıldı.
4. 2-3. Basamaklar bir kez daha tekrar edildi
5. %96'lık 1 mL etanol eklenip vorteksle karıştırıldı. 14000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı.
6. %90'lık 1 mL etanol eklenip vorteksle karıştırıldı. 3 dakika boyunca 14000 rpm'de santrifüj edildi ve üst sıvı kısım atıldı.
7. %70'lik 1 mL etanol eklenip vorteksle karıştırıldı. 14000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüj edildi ve üst sıvı kısım atıldı.
8. Çökelti kuruması için 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
9. Proteinaz K 5.5 mL resüspansiyon buffer ile sulandırıldı.
10. 2 mL'lik numune tüpüne 1200 µL ATL (Doku lizis buffer) doku ilave edildi, 60 µL proteinaz K ilave edilip 56 °C'de 2 saat boyunca inkübe edildi, 2 saatin sonunda örnek spin santrifüj yapıldı.
11. Üstteki sıvıdan 400 µL numune tüp içerisine alındı ve cihaza yüklendi.

Saflaştırılan örnekten protokole uygun olarak gerekli miktarda saf DNA kullanılarak yüksek riskli HPV genotipleri tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ve 68 moleküler yöntem ile araştırılmıştır. Saptamada Real Time Multipleks PCR Kiti (Genotypes 14 Real-TM Quant/Italy) kullanıldı.

3.1.4. HPV Genotypes 14 Real-TM Quant Kit içeriği

Sağlanan Malzemeler

- PCR-mix-1 "16-18-31-IC", 4 x 0.3 mL (mavi kapaklı)
- PCR-mix-1 "39-45-59-IC", 4 x 0.3 mL (pembe kapaklı)
- PCR-mix-1 "33-35-56-68", 4 x 0.3 mL (yeşil kapaklı)

- PCR-mix-1 “51-52-58-66”, 4 x 0.3 mL (turuncu kapak)
- PCR-buffer-FRT, 4 x 0.6 mL
- Hot Start DNA Polymerase, 4 x 0.06 mL
- Negatif Kontrol *, 1.2 ml

Standartlar:

- K1 “16-18-31-IC”, 0.2 ml (HPV DNA C + 16, 18, 31 ve insan DNA'sını karıştırın)
- 1.000.000 GE / mL
- K2 “16-18-31-IC”, 0.2 mL (HPV DNA C + 16, 18, 31 ve insan DNA'sını karıştırın)
- 1.000 GE / mL
- K1 “39-45-59-IC”, 0.2 mL (HPV DNA C + 39, 45, 59 ve insan DNA'sını karıştırın)
- 1.000.000 GE / mL
- K2 “39-45-59-IC”, 0.2 mL (HPV DNA C + 39, 45, 59 ve insan DNA'sını karıştırın)
- 1.000 GE / mL
- K1 “33-35-56-68”, 0.2 mL (mix HPV DNA C+ 33, 35, 56, 68) – 1.000.000 GE/mL
- K2 “33-35-56-68”, 0.2 mL (mix HPV DNA C+ 33, 35, 56, 68) - 1.000 GE/mL
- K1 “51-52-58-66”, 0.2 mL (mix HPV DNA C+ 51, 52, 58, 66) – 1.000.000 GE/mL
- K2 “51-52-58-66”, 0.2 mL (mix HPV DNA C+ 51, 52, 58, 66) – 1.000 GE/mL

3.1.5. HPV Genotypes 14 Real-TM Quant Kitin Protokolü

1. Test tipine göre gerekli miktarda PCR tüpü hazırlandı:

→ **Kantitatif analiz:** Her klinik numune için 4 tüp (yarım şerit), K1 standartları için 4 tüp ve K2 standartları için 4 tüp (toplam 1 şerit), Negatif kontrol için 4 tüp (yarım şerit),

→ **Kalitatif analiz:** Herhangi bir klinik numune için 4 tüp (yarım şerit), standart K2

için 4 tüp (yarım şerit) ve Negatif kontrol için 4 tüp (yarım şerit),

2. Reaksiyon için Mix hazırlanır: PCR-buffer-FRT ile 60 µl Hot Start DNA Polimeraz tüpe eklendi. Tüp dikkatlice vortekslendi (Bu karışım 3 ay + 4 ° C'de stabildir).

3. Her bir PCR-mix-1 için yeni bir tüp hazırlandı ve her bir örnek için (PCR-buffer-FRT with Hot Start DNA Polymerase) Mix'in 5*N+3 (+2 kalitatif analiz için) ve PCR-mix-1'in 10*N+3 (+2 kalitatif analiz için) µL eklendi. Örneğin, 8 klinik numunenin kantitatif analizi için her PCR-mix-1'in (10 x [8 + 3]) 110 uL'sini hazırlayıp ve PCR-buffer-FRT ile Polymerase Mix'in 55 µL eklendi.

4. Her tüp içine Real Reaction Mix'in 15 µL eklendi (her numune 4 tüpte test edilmelidir): tüplerinin ilk satırına "16, 18, 31, IC" Mix'in 15 µL, ikinci satırda "39, 45, 59, IC" Mix'in 15 µL, üçüncü satırda "33, 35, 56, 68" Mix'in 15 µL, dördüncü satırda "51, 52, 58, 66" Mix'in 15 µL eklendi.

5. Uygun bir tüpe ekstrakte edilen DNA örneği 10 µL eklendi.

6. Her bir panel için kontrol ve standartları hazırlandı:

- N°16 şeritli tüplerine Negatif Kontrolden ekstrakte edilen DNA'yı 10 µL eklendi;
- N°17 şeritli tüplerine her bir K1'in 10 µL'si eklendi;
- N°18 şeritli tüplerine her K2'in 10 µL'si eklendi;

3.1.6. Amplifikasyon

Amplifikasyon Rotor-Gene Q (Hilden, Almanya) cihazı ile gerçekleştirildi. Fam (Yeşil), Joe (Sarı) / Hex, Rox (Turuncu) ve Cy5 (Kırmızı) üzerinde algılama yapılmaktadır (Tablo 3.1).

Tablo 3. 1. HPV genotipleri tespiti

FAM	JOE	ROX	Cy5
16	31	18	IC
39	45	59	IC
33	35	68	56
58	52	66	51

3.1.7. Veri Analizi ve Sonuçların Yorumlanması

Karşılık gelen floresan birikimi eğrilerinin eşik çizgisini geçmesi durumunda kanaldaki bir tüpte sinyal pozitif olarak kabul edilir. Analizin yazılımı Ct değerini belirler. Kantitatif analiz için, bu değerler temelinde kalibrasyon eğrisi otomatik olarak çizilir ve insan DNA ve HPV DNA konsantrasyonları hesaplanır. Nihai sonucu elde etmek için, HPV DNA konsantrasyonu, formüle göre insan genomu eşdeğerlerinin sayısına normalize edilir.

$$\log\left(\frac{HPV\ DNA\ copies/reaction}{genomic\ DNA\ copies/reaction} \times 200000\right) = \log(HPV\ DNA\ in\ 100000\ cells)$$

3.2. Verilerin Analizi

Çalışma sonunda elde edilen veriler SPSS 21.0 Paket Programı kullanılarak analiz edilmiştir. Tanımlayıcı istatistiklerden sayılar ve yüzde dağılımlar verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda Ki-Kare testi (Cross-Tabs-Chi Square) uygulanmış olup sonuçlar %95 anlamlılık düzeyinde ($p < 0.05$) değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hastaların Demografik Bulguları

Çalışma süresince toplam 93 hastadan alınan örnekler değerlendirilmiş olup hastalara ilişkin demografik bulgular aşağıda verilmiştir.

Çalışmaya 27-86 yaş arasında hastalar dahil edilmiş olup çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması 51.63 ± 12.217 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4. 1. Hastaların yaş ortalaması

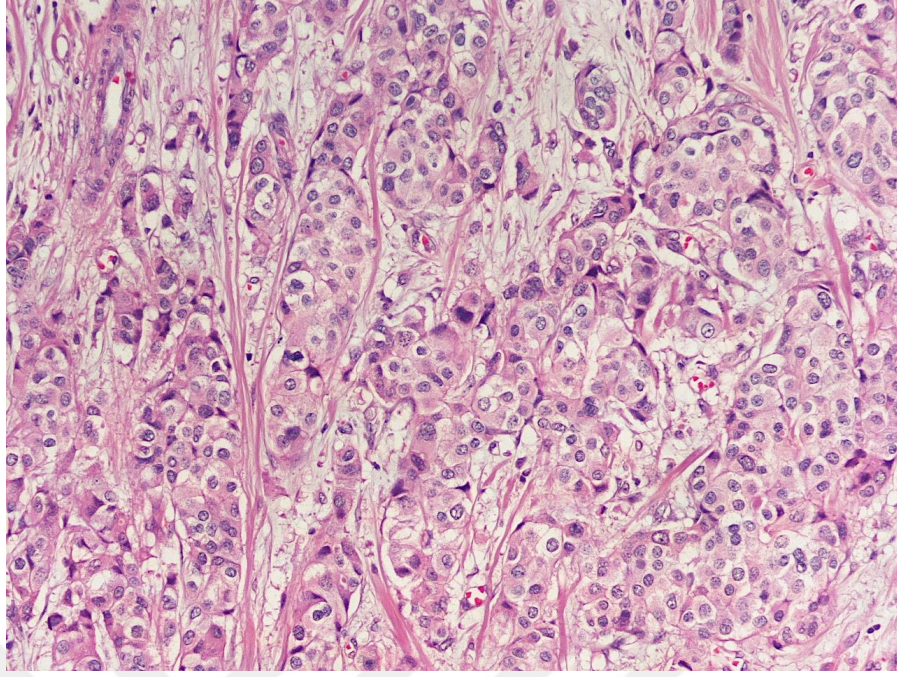
	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	ss (\pm)
Yaş	93	27	86	51.63	12.217

Hastaların kanser tiplerine göre dağılımı aşağıdaki tabloda görülmektedir. Buna göre hastaların büyük çoğunluğu (%75.3) invaziv duktal kanser meme hastası iken %10.8'si invaziv lobüler kanser türünde meme kanseri hastasıdır. Servikal intraepitelyal lezyon olan tüm hastalar, squamoz hücreli kanser türüdür (%14.0) (Tablo: 4.2).

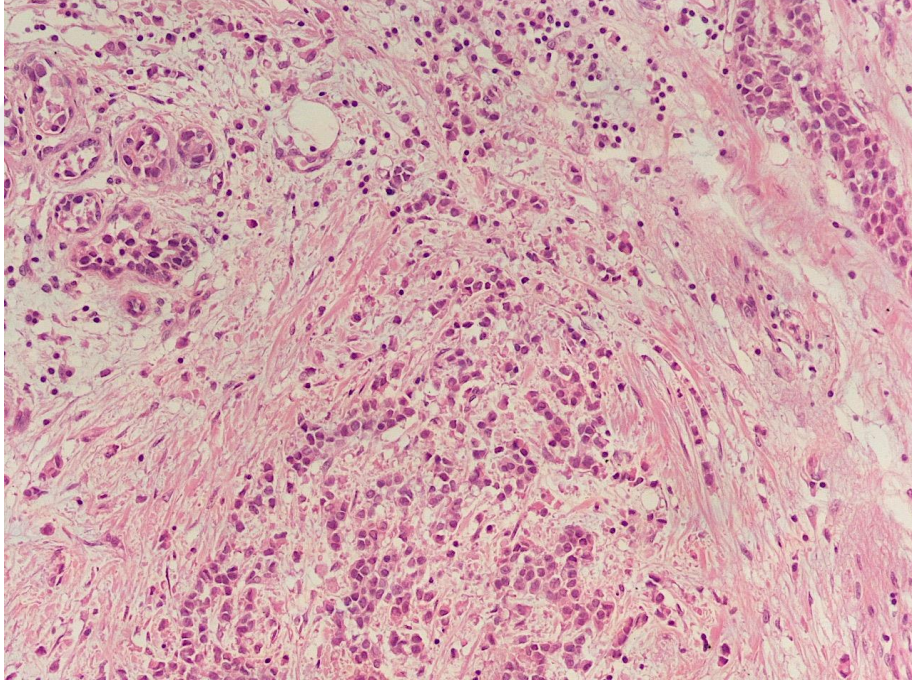
Tablo 4. 2. Hasta ve kontrol grubunun kanser tiplerine göre dağılımı

Tümör Tipleri	n	Yüzde (%)
Servikal intraepitelyal lezyon	13	14.0
Meme invaziv duktal kanseri	70	75.3
Meme invaziv lobüler kanseri	10	10.8
Toplam	93	100

Meme kanseri hastalarının arşivden temin edilen histopatolojik görüntüsü Resim 4.1 ve 4.2'de gösterilmiştir.



Resim 4. 1. Histoloji, invaziv duktal karsinom (Hematoksilen-eozinx200)



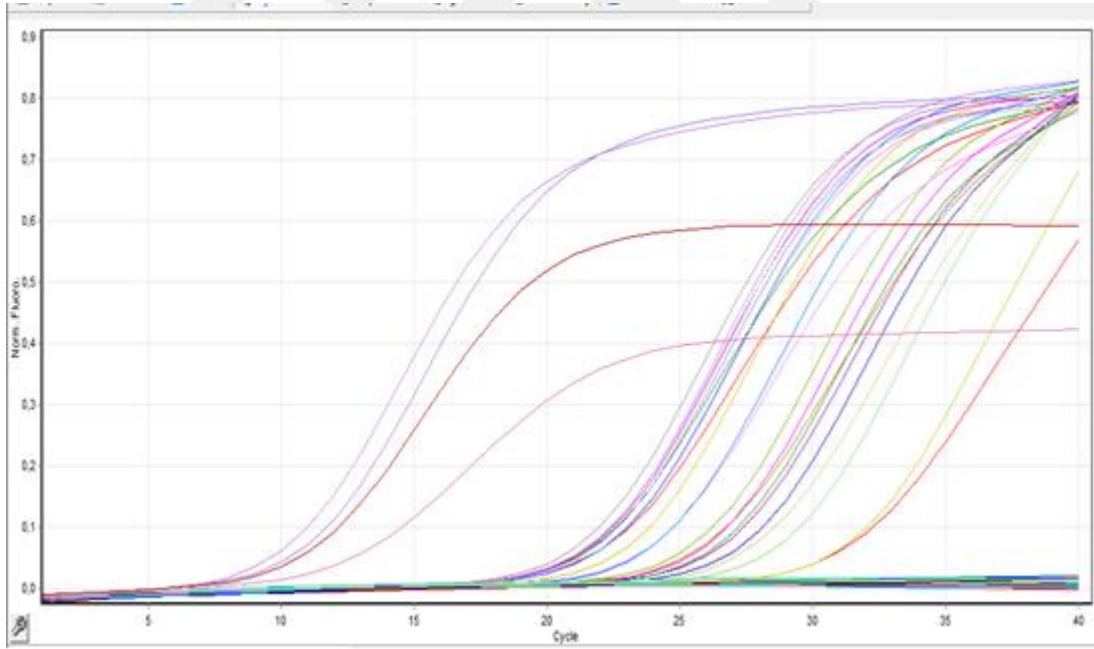
Resim 4. 2. Histoloji, invaziv lobüler karsinom (Hematoksilen-eozinx200)

Kanser türüne göre YR- HPV-DNA pozitifliği değerlendirildiğinde aşağıdaki tabloda görülen sonuçlar elde edilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışma sonucunda meme kanseri örneklerin 8'sinde (%10.0) YR-HPV-DNA pozitif olarak tespit edilmiş olup 72 hasta (%90) ise negatif bulunmuştur, 13 servikal intraepitelyal lezyon örneğinin

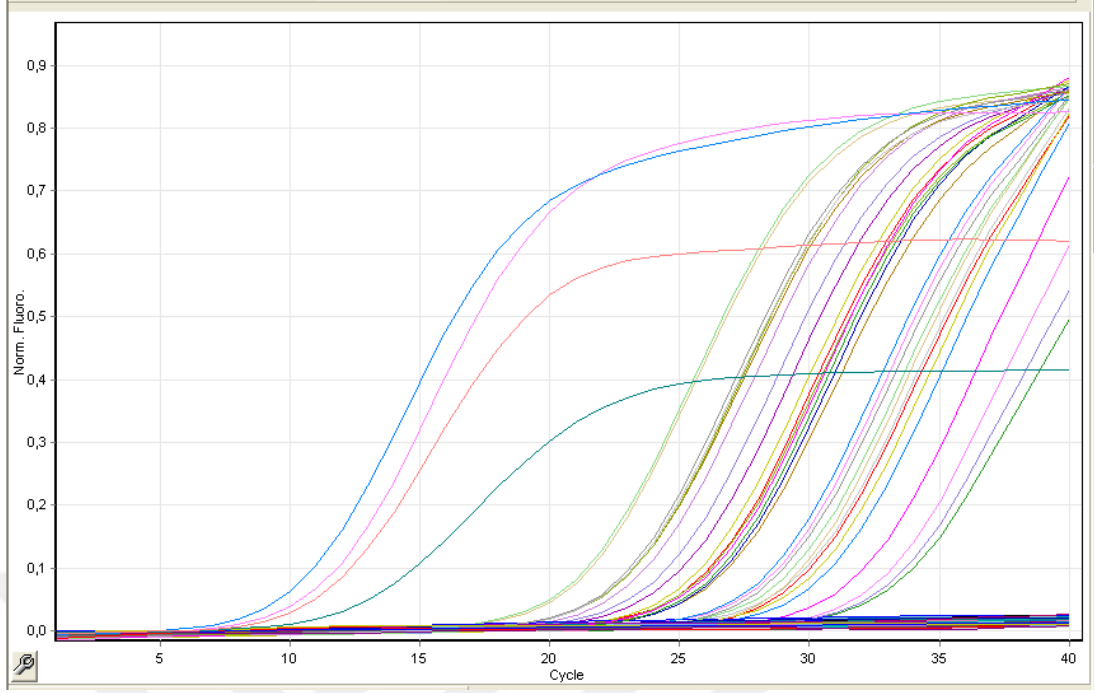
12'sinde (% 92.3) YR-HPV-DNA pozitif bulunmuştur. Yapılan analiz neticesinde servikal intraepitelyal lezyon türlerinde YR-HPV-DNA pozitifliği meme kanseri dokularından istatistiki anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 4.3) (Şekil 4.1, 4.2).

Tablo 4. 3. Meme ve servikal intraepitelyal lezyon saptanan doku örneklerinde yüksek riskli HPV DNA'sının belirlenmesi

Kanser türü		YR-HPV-DNA		Toplam	χ^2	P
		Negatif	Pozitif			
Servikal intraepitelyal lezyon	N	1	12	13	78.300	0.000
	%	7.7	92.3	100.0		
Meme kanseri	N	72	8	80		
	%	90.0	10.0	100.0		



Şekil 4. 1. Servikal intraepitelyal lezyon hastalarından tümör doku DNA'sında HPV enfeksiyonu varlığını tespit etmek için yapılan Kantitatif Real time PCR



Şekil 4. 2. Meme kanseri hastalarında tümör doku DNA'sında HPV enfeksiyonu varlığını tespit etmek için yapılan Kantitatif Real time PCR

Meme invaziv duktal kanseri olan 70 kişinin 5'inde (%7.1) ve meme invaziv lobüler kanseri olan 10 kişinin 3'ünde (%30.0) HPV-DNA pozitifliği tespit edilmiş olup, meme kanserinin patolojik türleri arasında HPV-DNA saptanma oranı açısından anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0.05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4. 4. Meme kanserinin patolojik durumuna göre YR-HPV DNA pozitifliğinin karşılaştırması

Meme kanserinin patolojik durumu		YR-HPV-DNA		Toplam	χ^2	P
		Negative	Positive			
Meme invaziv duktal kanseri	n	65	5	70	5.887	0.015
	%	92.9	7.1	100.0		
Meme invaziv lobüler kanseri	n	7	3	10		
	%	70.0	30.0	100.0		

İnvaziv lobüler meme kanserlerinde, invaziv duktal tümör türüne göre daha yüksek oranda HPV-DNA saptanmıştır (sırasıyla %30, %7.1).

Çalışmaya dahil edilen kişilerin yaşa bağlı olarak YR-HPV-DNA pozitifliğinin farklılık arz edip etmediğini tespit etmek için yapılan analiz neticesinde 50 veya daha küçük yaştaki 36 kişinin 1'inde (%2.8) ve 50 yaşın üzerindeki 44 kişinin 7'sinde (%15.9) YR-HPV-DNA pozitifliği tespit edilmiştir. Gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.05$) (Tablo 4.5).

Tablo 4. 5. Yaş gruplarına göre meme kanserisinde YR- HPV DNA pozitifliğinin karşılaştırması

Yaş		YR-HPV-DNA		Toplam	χ^2	P
		Negatif	Pozitif			
≤ 50	n	35	1	36	3.970	0.046
	%	97.2	2.8	100.0		
> 50	n	37	7	44		
	%	84.1	15.9	100.0		

Elli yaşın üstündeki hastalarda, daha genç olan hastalara göre HPV-DNA daha yüksek oranda bulunmuştur (sırasıyla %15.9, %2.8) ($p<0.05$).

Tablo 4.6'da görülen bulgulara göre servikal intraepitelyal lezyon bulunan 13 vakalarının 12'sinde (%92.3) YR-HPV-DNA tespit edildiğini göstermektedir. Klinik raporlarda belirtilen verilere dayanarak tüm servikal intraepitelyal lezyon dokuları HPV pozitif hastalardan seçilmiş olmasına rağmen, bu çalışmada belirli genotiplerin çoğaltılmasından dolayı, saptanmayan 1 örnekteki HPV genotipinin bu çalışmada hedeflenen bölgelerden farklı bir genotip olabileceği düşünülmüştür. HPV tip 16, servikal intraepitelyal lezyon örneğindeki en yaygın HPV genotipiydi ve 12 örneğin 6'sında (%50) saptandı. HPV tiplerinin her biri (18-39-58) 2 örnekte (%16.7) saptanırken, 33, 35, 56 ve 68 1'er (%8.3) örnekte saptandı. 8 pozitif meme kanseri örneğinde 7 YR-HPV genotip tespit edildi. Meme kanseri hastalarında HPV tiplerinin her biri (45- 56- 68) 4 örnekte (%50) en yaygın saptanan genotip olarak bulundu. HPV genotip 39 meme kanseri vakasının 2'sinde (%25) ve HPV genotiplerinden her biri (18-33-59) ise 1'inde (%12.5) saptandı.

Tablo 4. 6. Servikal intraepitelyal lezyon ve meme kanserli doku örneklerinde yüksek riskli HPV genotiplerinin prevalansı ve tip dağılımı

Kanser türü	pozitif vaka sayısı (n)	YR-HPV Türleri													
		16	18	31	33	35	39	45	51	52	56	58	59	66	68
Servikal intraepitelyal lezyon	12	6	2	-	1	1	2	-	-	-	1	2	-	-	1
Meme kanseri	8	-	1	-	1	-	2	4	-	-	4	-	1	-	4

Yapmış olduğumuz çalışma sonucunda HPV tiplerinin her biri (56-68) HPV-DNA saptanan 5 meme invaziv duktal kanserin örneklerinin 3'ünde (%60) ve HPV genotip 45 HPV-DNA saptanan 3 meme invaziv lobüler kanserin örneklerinin 2'sinde pozitif (%66.7) bulundu (Tablo 4. 7).

Tablo 4. 7. Meme lobüler ve duktal kanserli doku örneklerinde yüksek riskli HPV genotiplerinin prevalansı ve tip dağılımı

HR-HPV tipleri	Meme kanserinin patolojik durumu	
	Meme invaziv duktal kanseri N: 5	Meme invaziv lobüler kanseri N:3
	Pozitif vaka sayısı	Pozitif vaka sayısı
16	-	-
18	1	-
31	-	-
33	-	1
35	-	-
39	1	1
45	2	2
51	-	-
52	-	-
56	3	1
58	-	-
59	-	1
66	-	-
68	3	1

Yapmış olduğumuz çalışmada Tablo 4.8’de görülen bulgular elde edilmiştir. Servikal intraepitelyal lezyon olgularda HPV genotiplerinin tek genotip ile enfeksiyonunun sıklığı 12 örneğin 9’unda (%75) tespit edildi.

Tablo 4. 8. Servikal intraepitelyal lezyon doku örneklerinde HPV ko-enfeksiyonunun çoklu HPV genotipleri ile sıklığı

Tek tip		Multi- tip 2		Multi – tip 3	
N (12) Pozitif vaka sayısı	HPV tipi	N (12) Pozitif vaka sayısı	HPV tipi	N (12) Pozitif vaka sayısı	HPV tipi
5	16	1	16-18	1	39-56-68
1	18	1	35- 58		
1	33				
1	39				
1	58				

Çalışmamızda, çoklu HPV genotipleri ile HPV ko-enfeksiyonu sıklığı, HPV pozitif kanserli meme dokusu numunelerinin 6’sında (%75) tespit edildi (Tablo 4. 9).

Tablo 4. 9. Meme kanseri örneklerinde HPV ko-enfeksiyonunun çoklu HPV genotipleri ile sıklığı

Tek tip		Multi –tip 2		Multi –tip 3	
n/pozitif vaka sayısı	HPV tipi	n/pozitif vaka sayısı	HPV tipi	n/pozitif vaka sayısı	HPV tipi
1/8	18	1/8	39- 45	2/8	45-56-68
1/8	39	2/8	56- 68	1/8	33-45-59

Tüm hastalarda saptanan genotiplerin dağılımı Tablo 4.10'da gösterilmiştir.

Tablo 4. 10. Meme kanseri olgularında saptanan genotiplerin değerlendirilmesi

Hasta	Tanı	Saptanan genotip
1	Meme invaziv duktal kanseri	18
2	Meme invaziv lobüler kanseri	39
3	Meme invaziv duktal kanseri	39- 45
4	Meme invaziv duktal kanseri	56- 68
5	Meme invaziv duktal kanseri	56- 68
6	Meme invaziv lobüler kanseri	33-45-59
7	Meme invaziv lobüler kanseri	45-56-68
8	Meme invaziv duktal kanseri	45-56-68

5. TARTIŞMA

Meme kanseri ve servikal kanser dünya genelinde kadınlarda kanser ilişkili ölüm nedenleri arasında oldukça önemli bir paya sahip kanser türleridir (118). Kadınlarda küresel meme kanseri yükü önemli ölçüde artmaktadır. Bu durum meme kanseri gelişimi ile ilişkili yeni etiyolojik risk faktörlerinin belirlenmesinin önemini vurgulamaktadır. Viral enfeksiyonlar gibi biyolojik karsinojenler, kanserlerin başlatılmasında önemli rol oynamaktadır, çünkü kanserlerin yaklaşık %18-20'sine katkıda bulunmaktadır. YR-HPV'lerin servikal kanser ve çeşitli kanser türleri ile ilişkisi iyi bilinmektedir (119). Moleküler tekniklerin gelişmesi ve bu buluşu takip eden araştırmalar HPV enfeksiyonunun oral kavite, anogenital bölge ve üst gastrointestinal sistemde de lezyonlar oluşturabildiğini göstermiştir (120).

HPV'ler mukotrofik virüslerdir ve birçok kanserin etiyolojisinde rol oynayan spesifik özelliklere sahiptir. Bugüne kadar, HPV doğrudan temas ile kontamine organlarda kanser ile ilişkilendirilmiştir (orofaringeal bölge, genital organlar, deri gibi) (90). YR-HPV'nin yaşam döngüsü, onkojenik özellikleri ve moleküler temelli kanıtları, meme kanseri için nedensel bir rol olduğunu düşündürmektedir (121).

Meme kanserinin HPV ile ilişkili olabileceği bir insan meme hücre grubunun HPV 16 ve 18 genomu ile enfekte olduktan sonra ölümsüzleşmesi sebebiyle ortaya atılmıştır (4). Ancak bu hipotez oldukça tartışmalıdır. Çalışmalar meme kanser hücrelerinde HPV DNA insidansını %0 ile %86.21 civarında değişecek şekilde vermektedirler (121-122). Birçok çalışma meme kanserinde YR-HPV'yi araştırmıştır. Bu çalışmalarda HPV enfeksiyonunun saptanması, bir dizi moleküler yöntem kullanılarak viral DNA varlığının test edilmesine dayanmaktadır (119).

PCR ile yapılan çalışmalarda ağırlıklı olarak HPV'ye rastlanılmamaktadır. Ancak 2009 yılında Avustralya kaynaklı iki çalışma koilosit varlığı ve PCR dayanaklı metodlarla HPV ile meme kanseri arasında bir ilişki bulduklarını iddia etmektedir (115,123).

Her ne kadar viremik yayılımın olmadığı söylene de HPV'nin ispatlanmış kanser türleri dışında diğer kanser türleriyle de ilişkisinin olabileceği hipotezleri ispat

bekleyen sorulardır. Bu çalışma meme kanseri ve HPV arasında ilişki olup olmadığının araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Verilerimiz, Türk kadınlarından 80 meme kanseri olgusunda 8'inde (%10) YR-HPV DNA'sının 7 genotipinin varlığını gösterdi. Elde edilmiş sonuçlar, meme kanserinde insan papilloma virüsü DNA'sının düşük frekansını (%4-15.9) bildiren dünyadaki farklı coğrafi bölgelerdeki diğer çalışmaların bulguları ile uyumludur. Bununla birlikte meme kanseri olgularında HPV varlığı orta (% 20-48) veya yüksek frekansla (% 60-86.2) bir çok yazar tarafından bildirilmiştir (Tablo 5.1).

Bunlara aksine, bazı çalışmalar meme kanserinde HPV enfeksiyonu olmadığını bildirmiştir (Tablo 5.2).

Tablo 5. 1. Meme kanseri dokusunda HPV DNA sekanslarını tanımlayan çalışmaların listesi

Referans numarası	Çalışma raporu	örnek sayısı	Toplam HPV pozitifliği n (%)	Ülke
124	Di Lonardo ve ark., 1992	70	7 (10)	İtalya
125	Henning ve ark., 1999	41	19 (46.3)	İsveç
126	Yu ve ark., 1999	72	19 (26.3)	Çin
127	Yu ve ark., 2000	32	14 (43.8)	Çin
128	Liu ve ark., 2004	17	6 (35)	Çin
129	Damin ve ark., 2004	101	25 (24.7)	Brezilya
130	Widschwendter ve ark., 2004	11	7 (63.7)	Avusturya
121	de Villiers ve ark., 2005	29	25 (86.2)	ABD
131	Kroupis ve ark., 2006	107	17 (15.9)	Yunanistan
132	Kan ve ark., 2005	50	24 (48)	Avustralya
133	Gumus ve ark., 2006	50	37 (74)	Türkiye
134	Khan ve ark., 2008	124	26 (20.9)	Japonya
7	Akil, N. ve ark., (2008)	113	69 (61.06)	Suriye
135	de Leon ve ark., 2009	51	15 (29.5)	Meksika
136	Mendizabal-Ruiz ve ark., 2009	67	3 (4.4)	Meksika
123	Heng ve ark., 2009	26 biopsies 9 cell lines	8 (30.7) 2 (22)	Avusturya
119	Salman, N. A. ve ark., 2017	74	35 (47)	İngiltere
1	Silvia Delgado-García. ve ark.,2017	251	130 (51.8)	İspanya

Tablo 5. 2. Meme kanseri dokularında HPV DNA sekanslarını saptamayan çalışmaların listesi

Referans numarası	Çalışma raporu	örnek sayısı	Toplam HPV pozitifliği n (%)	Ülke
137	Wrede ve ark., 1992	92	0	İngiltere
138	Brathauer ve ark., 1992	43	0	ABD
139	Gopalkrishna ve ark., 1996	30	0	Hindistan
140	Czerwenka ve ark., 1996	20	0	Avusturya
141	Lindel ve ark., 2007	81	0	İsviçre
142	de Cremoux ve ark., 2008	50	0	Fransa
143	Hedau ve ark., 2011	252	0	Hindistan

Meme kanseri ile ilgili daha önceki çalışmalar, Amerika Birleşik Devletleri ve Brezilya'da yaşayan kadınlarda HPV tipleri 11, 16 ve 18'in en sık olduğunu bildirmiştir (128, 129); ve Avustralyalı kadınların çoğunluğunda HPV tip 18 bulunmaktadır (132). Paralel olarak, HPV tip 33, Asyalı kadınlarda en sık görülen genotiptir (126, 127). İtalyan ve Norveçli kadınlarda HPV tip 16 (125), Kanada'lı kadınlarda da HPV tip 16 (133) en sık rastlanan genotipler olduğu bildirilmiştir. Türkiye'den yapılan ve yüksek frekanslı bir birliktelik gösteren çalışmada Gümüş ve ark. (133), Türk kadınlarının hem meme kanseri hem de normal meme dokularında 18, 33 ve 35 HPV tipleri olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Memede HPV'nin olası kökenini belirlemeye yönelik bir araştırmalarda, bir takım yazarlar (125, 130, 144, 145), meme ve servikal dokularda HPV varlığı arasındaki olası ilişkiyi araştırmışlar ve memede saptanan HPV genotipinin serviksten kaynaklanmadığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, HPV tip 16, servikal intraepitelyal lezyon dokularında yüksek riskli HPV ailesinin baskın virüsü olmasına rağmen, meme kanseri dokularında yaygın değildi. Bu çalışmamızda, meme kanseri örneklerinde saptanan HPV tipleri, HPV

pozitif örneklerin 4'ünde (% 50) HPV tipi 45, 56 ve 68, ardından 2'sinde (% 25) HPV tipi 39, ve 1'inde (% 12.5) HPV tipi 18, 33 ve 59 en yaygın saptanan genotipler olarak saptandı. Bu nedenle, verilerimiz meme dokularındaki belirli yüksek riskli HPV enfeksiyonu tiplerinin belirli coğrafi bölgelerle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Li ve ark. (146) yapmış olduğu metaanalizde, meme kanserlerinde HPV tipleri 16 ve 18'in saptanmasının tümör agresyonu ile ilişkisi olduğu da gösterilmiştir. Bununla birlikte bu çalışmalarda sadece YR-HPV türlerinden genotip 16-18 çalışılmıştır. Çalışmamızdan farklı olarak, 14 farklı yüksek riskli HPV tipi araştırılmıştır. Genotip 18 bir örnekte saptanırken, 16'ya rastlanmamıştır. Ayrıca HPV DNA saptanan 8 örneğin 6'sında (%75) ko-enfeksiyon saptanmıştır. Ko-enfeksiyon saptanma oranı, servikal intraepitelyal lezyon olan hastalarda %25 olarak bulunmuş olup, meme kanseri olgularında ko-enfeksiyon oranının daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Çoklu YR-HPV enfeksiyonları, kanser gelişimini indüklemek için sinerjistik olarak etkileyebilir veya muhtemelen diğer ko-faktörlerinin varlığında meme kanseri şiddetini veya meme kanseri ilerlemesinin riskini artırabilir.

Ayrıca verilerimiz, meme kanserli olgularda HPV DNA prevalansının lobular invaziv karsinomlu kadınlarda invaziv duktal karsinomlu kadınlardan daha yüksek olduğunu ortaya çıkardı.

Avustralya'da Heng ve ark. (123) tarafından yapılan bir çalışmada, HPV tip 18'in meme kanserlerinde en sık görülen tip olduğu gözlenmiştir ve (duktal meme karsinomlarının tarihsel yanıtıcı terminolojisine rağmen) çoğu meme kanserinin meme-süt kanal epitel hücrelerinden kaynaklandığı kabul edilebilmektedir. Dolayısıyla, çoğu meme kanseri "glandüler"dir. HPV tip 18, skuamöz epitelyal hücrelere kıyasla glandülere bir afinite veya tropizm göstermektedir (147). Servikal adenokarsinomların da % 12'si HPV tip 45 ile ilişkilidir (148). Çalışmamızda, 3 pozitif meme invaziv lobüler karsinom örneğinin 2'sinde (%70) HPV genotip 45 saptanmıştır.

Yaştaki artışla birlikte meme kanseri de artmasına karşın ülkemizde genç kadınlarda daha yaygın görülmektedir (149). Genel olarak yaşın ilerlemesi ile beraber meme

kanseri görülme oranının arttığı bildirilmektedir. Yirmi yaşında bir kadında meme kanseri görülme riski %0.05 iken 40 yaşında bu oran %1.49'a, 60 yaşında da %3.45'e çıkmaktadır (150-152).

HPV DNA pozitifliği, 50 yaş veya daha küçük yaş grubuna göre 50 yaşın üstündeki yaş grubunda anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 4.5). Elde ettiğimiz sonuçlar literatürle uyumlu görülmüştü ve HPV'nin, yaş gibi diğer ko-faktörlerin varlığında meme kanseri gelişimine neden olabileceği şeklinde yorumlayabilir.

İnvaziv duktal meme kanseri, lobüler türe göre daha fazla görülüyor olmasından dolayı, çalışmada örneklem belirlenmesinde daha fazla sayıda alınmış olmasına rağmen, her iki örnek grubunun eşit sayıda alınmamış olunması bu çalışmanın kısıtlayıcı tarafı olarak bulunmuştur.

Sonuç

Sonuç olarak, Türk kadınlarında invaziv meme kanserinde yüksek riskli HPV prevalansının düşük sıklıkta (%10) olduğunu gösterdik. Ayrıca, meme kanserinde HPV 45, 56 ve 68 tipleri en yaygın tiplendirilmiştir ve pozitif meme kanseri doku örneklerinde HPV ko-enfeksiyonu yüksekti (%75). Verilerimiz İnsan papilloma virüslerinin, bazı meme kanseri tipler olup gelişiminde potansiyel bir nedensel ilişki, aracılık veya hatta bir ko-faktör olarak rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ancak bizim çalışmamızda Türk kadınlarının meme kanseri dokusunda HPV sıklığının düşük olması, meme kanseri gelişiminde HPV'nin rolünü daha iyi anlamak, araştırmak ve değerlendirmek için daha ileri çalışmaların önemini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Delgado-García S, Martínez-Escoriza JC, Alba A, Martín-Bayón TA, Ballester-Galiana H, Peiró G, Caballero P, Ponce-Lorenzo J. Presence of human papillomavirus DNA in breast cancer: a Spanish case-control study. *BMC Cancer*. 2017;17(1):320.
2. Özerdoğan, N., Şahin, B. M., Kösgeroğlu, N., Culha, İ., Çelik, N., Sayiner, F. D., and Boyacı, M. Educational study to increase breast cancer knowledge level and scanning participation among women working at a university. *European journal of breast health*, 2017;13(3), 113.
3. <http://eprints.kingston.ac.uk/37706/1/Ashrafi-G-H-37706-VoR.pdf>
4. Band V, Zajchowski D, Kulesa V, Sager R. Human papillomavirus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 463–7
5. Chang, F., Shen, Q., Zhou, J., Wang, C., Wang, D., Syrjänen, S., & Syrjänen, K. Detection of human papillomavirus DNA in cytologic specimens derived from esophageal precancer lesions and cancer. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 1990;25(4), 383-388.
6. Jenson, A. B., Ghim, S. J., Geyer, S., & Sundberg, J. P. Human papillomavirus and skin cancer. In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 2001; Vol. 6, No. 3, pp. 203-206. Elsevier.
7. Akil N, Kassab A, Yasmeen A, Darnel AD, Bismar TA, and Al Moustafa AE. Human breast cancer and sexual activities. *British Journal of Cancer*, 2008;98(2), 508.
8. Haghshenas M, Golini-Moghaddam T, Rafiei A, Emadeian O, Shykhpour A, and Ashrafi GH. Prevalence and type distribution of high-risk human papillomavirus in patients with cervical cancer: a population-based study. *Infectious Agents and Cancer*, 2013;8(1), 20.
9. Hernandez BY, Wilkens LR, Zhu X, Thompson P, McDuffie K, Shvetsov YB, and Goodman MT. Transmission of human papillomavirus in heterosexual couples. *Emerging infectious diseases*, 2008; 14(6), 888.

10. Ohba K, Ichiyama K, Yajima M, Gemma N, Nikaido M, Wu Q and Yamamoto N. In vivo and in vitro studies suggest a possible involvement of HPV infection in the early stage of breast carcinogenesis via APOBEC3B induction. *PloS One*, 2014;9(5), e97787.
11. Begum S, Gillison ML, Ansari-Lari MA, Shah K, Westra WH. Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. *Clin Cancer Res* 2003;9: 6469– 647
12. Graflund M, Sorbe B, Sigurdardottir S, Karlsson M. HPV-DNA, vascular space invasion, and their impact on the clinical outcome in early-stage cervical carcinomas. *Int J Gynecol Cancer* 2004;14: 896–902
13. Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Mattu R, Dunn ST. Comparison of human papillomavirus genotypes in high-grade squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma: evidence for differences in biologic potential of precursor lesions. *Mod Pathol* 2004;17: 1314–1322
14. Umudum H, Rezanko T, Dag F, Dogruluk T. Human papillomavirus genome detection by in situ hybridization in fine-needle aspirates of metastatic lesions from head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer* 2005;105: 71–77
15. Varnai AD, Bollmann M, Griefingholt H, Speich N, Schmitt C, Bollmann R, Decker D. HPV in anal squamous cell carcinoma and anal intraepithelial neoplasia (AIN). Impact of HPV analysis of anal lesions on diagnosis and prognosis. *Int J Colorectal Dis* 2006;21: 135–142
16. Vousden KH Regulation of the cell cycle by viral oncoproteins. *Semin Cancer Biol* 1995;6: 109 –116
17. Polyak, K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 2007; 117, 3155–3163
18. Stanley MA, Winder DM, Sterling JC, Goon PK. HPV infection, anal intraepithelial neoplasia (AIN) and anal cancer: current issues. *BMC Cancer* 2012;12:398
19. Human papillomavirus (HPV)". World Health Organization. April 13, 2015. Retrieved 2015-07-06.

20. Goldstein MA, Goodman A, del Carmen MG, Wilbur DC. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 10-2009. A 23-year-old woman with an abnormal Papanicolaou smear. *N Engl J Med* 2009;360:1337-1344
21. Javier RT, Butel JS. The history of tumor virology. *Cancer Res* 2008;68:7693-7706.
22. Hoory T, Monie A, Grawitt P, Wu TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc* 2008;107:198-217.
23. Chaturvedi Anil, Gillison ML. Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer. In: Olshan AF. *Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention of Head and Neck Cancer* 1st ed. New York: Springer; 2010. p. 1471-1472.
24. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 2004;50:9-19.
25. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
26. Kurman RJ, Ronnett BM, Sherman ME, Wilkinson EJ. Human papillomavirus: biology and clinical importance. In: *Tumors of the Cervix, Vagina, and Vulva. AFIP Atlas of Tumor Pathology. 4th ed. series.* Silver Spring, MD: ARP Press; 2010. p. 23-58.
27. Ang KK, Harris J, Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tân, P. F., and Kim, H. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 2010;363(1), 24-35.
28. Rubin MA, Kleter B, Zhou M, et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol* 2001;159:1211-1218.
29. Buitrago-Pérez Á, Garaulet G, Vázquez-Carballo A, Paramio JM, and García-Escudero R. Molecular signature of HPV-induced carcinogenesis: pRb, p53 and gene expression profiling. *Current genomics*, 2009;10(1), 26-34.
30. Human papillomaviruses. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 2007. ISBN 978-92-832-1290-4.

31. "HPV-the Shy Virus" (radio program). Sound print. 6 December 2008. Archived from the original on 28 March 2009. Retrieved 6 December 2008
32. Picken RN, Yang HL "The integration of HPV-18 into HeLa cells has involved duplication of part of the viral genome as well as human DNA flanking sequences". *Nucleic Acids Research*. 1987;15(23): 10068. doi:10.1093/nar/15.23.10068. PMC 306572. PMID 2827110
33. Munoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV and Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England journal of medicine*, 2003;348(6), 518-527.
34. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:342-50.
35. Ramael M, Gudleviciene Z, Didziapetriene J. Natural history and biological behaviour of human papillomavirus: implications for cervical cancer screening. *ACTA Med Lituanica* 2004; 11: 1-7.
36. A. Rosenblatt HG. de Campos Guidi, *Human Papillomavirus*, 3 DOI: 10.1007/978-3-540-70974-9-1, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009.
37. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, & zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004;324(1), 17-27.
38. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M and Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 78: 11451
39. Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 2007; 111: 1-12.
40. "HPV — the Shy Virus" (radio program). Sound print. 6 December 2008. from the original on 28 March 2009. Retrieved 6 December 2008. the University of Nebraska-Lincoln/ Angie Fox, illustrator/ 2009
41. <http://www.naturalnews.com/heart.html>
42. Alp Avcı G. İnsan Papillomavirusunun Genomik Yapısı ve Proteinleri. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46: 507-15.

43. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 2006; 11: 2286–302
44. Howley PM. The molecular biology of papillomavirus transformation. Warner - Lambert Parke-Davis Award Lecture. *Am J Pathol* 1983; 113: 414-21.
45. Kadaja, M., Isok-Paas, H., Laos, T., Ustav, E., & Ustav, M. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS pathogens*, 2009;5(4), e1000397.
46. Fehrmann F, Laimonis LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003; 22: 5201–7.
47. Yim EK, Park JS. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV- associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat* 2005; 37: 319-24
48. Kubbutat MH, Vousden KH. Role of E6 and E7 oncoproteins in HPV- induced anogenital malignancies. *Sem Virol* 1996; 7: 295-304
49. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci* 2006;110: 525-41
50. Fertey J, Ammermann I, Winkler M, Stöger R, Iftner T and Stubenrauch F. Interaction of the papillomavirus E8/E2C protein with the cellular CHD6 protein contributes to transcriptional repression. *Journal of virology*, 2010;84(18), 9505-9515.
51. Stubenrauch F, Zobel T, Iftner T. The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8/E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol* 2001; 75: 4139–49.
52. Thomison J, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 2008; 39: 154-66.
53. Palefsky JM, Holly EA. Molecular virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4: 415-28.
54. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 32: 7–15.

55. Milde-Langosch K, Riethdorf S and Löning T. Association of human papillomavirus infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: theoretical and practical implications. *Virchows Archiv*, 2000;437(3), 227-233.
56. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1456-60
57. Moscicki AB. Impact of HPV infection in adolescent populations. *J Adolesc Health* 2005; 37: S3–9
58. Bosch FX, de Sanjose S, Castellsague X. Understanding the origin of cervical cancer. In: Prediville W, Davies P. editors. *The Health Professional's HPV Handbook*. UK: Taylor and Francis Group; 2004: 41-54
59. Cruickshank ME. The role of human papillomavirus in risk management. *RevGynecol Pract* 2003; 3: 229-33
60. Moscicki, A. B., Hills, N., Shiboski, S., Powell, K., Jay, N., Hanson, E., and Darragh, T. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *Jama*, 2001;285(23), 2995-3002.
61. Bosch, F. X., Lorincz, A., Muñoz, N., Meijer, C. J. L. M., and Shah, K. V. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of clinical pathology*, 55(4), 244-265.
62. Munger K. The role of human papillomaviruses in human cancers. *Front Biosci* 2002; 7: d641–9.
63. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, & Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *Journal of the National Cancer Institute*, 2005;97(14), 1066-1071.
64. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, and Schiffman M. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *Journal of the National Cancer Institute*, 2005;97(14), 1072-1079.

65. Gichangi P, Estambale B, Bwayo J, Rogo K, Ojwang S, Opiyo A, & Temmerman M. Knowledge and practice about cervical cancer and Pap smear testing among patients at Kenyatta National Hospital, Nairobi, Kenya. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 2003;13(6), 827-833.
66. Zarakolu IP. Cinsel yolla bulaşan infeksiyonlar. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2006; 37: 24-8.
67. Scott M, Nakagawa M, Moscicki B. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8209–20.
68. İyibozkurt AC, Berkman S. HPV testleri ve HPV tespitinde yeni yöntemler. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji ve Obstetrik dergisi* 2009; 2: 38-41.
69. Bradley J, Barone M, Mahe C, Lewis R, & Luciani S. Delivering cervical cancer prevention services in low-resource settings. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2005;89(S2).
70. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 1-17.
71. Stoler MH. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19: 16-28.
72. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, & Meijer CJ. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*, 2008;26, K29-K41.
73. Castro W, Gage J, Gaffikin L, Ferreccio C, and Sellors J. Effectiveness safety and acceptability of cryotherapy: a systematic literature review. *Cervical cancer prevention issues in depth 1. Alliance for Cervical Cancer Prevention* 2003; 16-30
74. Luciani S, Gonzales M, Munoz S, Jeronimo J, and Robles S. Effectiveness of cryotherapy treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2008;101(2), 172-177.
75. Ortaç UF, Ozpak E. Serviksin preinvaziv hastalığı. In: Ayhan A. editör. *Klinik Jinekolojik Onkoloji*. 6. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2003:p.1-33.

76. Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezi. URL: http://www.ketem.org/hangi_tarama.php. May 15.2011.
77. Jacob M, Broekhuizen FF, Castro W and Sellors J. Experience using cryotherapy for treatment of cervical precancerous lesions in low-resource settings. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2005;89, S13-S20.
78. Andersen ES, Thorup K, Larsen G. The results of cryosurgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*, 1988; 30: 21 –5.
79. Kobayashi A, Greenblatt RM, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, Young M, and Smith-McCune KK. Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. *Cancer research*, 2004;64(18), 6766-6774.
80. Varnai AD, Bollmann M, Bankfalvi A, Speich N, Schmitt C, Griefingholt H & Bollmann R. Predictive testing of early cervical pre-cancer by detecting human papillomavirus E6/E7 mRNA in cervical cytologies up to high-grade squamous intraepithelial lesions: diagnostic and prognostic implications. *Oncology reports*, 2008;19(2), 457-465.
81. Schiller JT, Douglas R. *Lowy Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 2000; 28: 50-54.
82. Galani E, Christodoulou C. Human papillomaviruses and cancer in the post-vaccine. *Clin Microbiol Infect*, 2009; 15: 977–81.
83. Ault KA. Future II Study Group. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomized clinical trials. *Lancet* 2007; 369: 1861-8.
84. Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol* 2008; 109: 15-21.
85. Sanders GD, Taira AV. Cost-effectiveness of a potential vaccine for human papillomavirus. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 37–48.

86. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, and HPV Vaccine Study group. Sustained efficacy up to 4· 5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *The Lancet*, 2006;367(9518), 1247-1255.
87. Bozon M. Sexuality, gender, and the couple: a sociohistorical perspective. *Annu Rev Sex Res* 2001; 12: 1–32.
88. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, and Roteli-Martins CM. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *The lancet*, 2004;364(9447), 1757-1765.
89. FUTURE II Study Group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high- grade cervical lesions. *N Engl J Med* 2007; 356: 1915–27.
90. Gillison ML, Shah KV. Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; (31):5765.
91. Castellsagué X, Díaz M, De Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, & Meijer CJ. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *Journal of the National Cancer Institute*, 2006;98(5), 303-315
92. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002". *Int. J. Cancer*. 2006; 118 (12): 3030–44. doi:10.1002/ijc.21731. PMID 16404738.
93. Liu Y, Lu Z, Xu R, & Ke Y. Comprehensive mapping of the human papillomavirus (HPV) DNA integration sites in cervical carcinomas by HPV capture technology. *Oncotarget*, 2016;7(5), 5852.
94. Parfenov M, Peadarallu CS, Gehlenborg N, Freeman SS, Danilova L, Bristow C. A, and Protopopov A. Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014; 111(43), 15544-15549.95.
95. Karagas MR, Waterboer T, Li Z, Nelson HH, Michael KM, Bavinck JNB and Pawlita M. Genus β human papillomaviruses and incidence of basal cell and squamous cell carcinomas of skin: population based case-control study. *BMJ*, 2010; 341, c2986.

96. "The Link Between HPV and Cancer". CDC. September 30, 2015. Archived from the original on 9 November 2015. Retrieved 11 August 2016.
97. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers a brief historical account. *Virology* 2009; 384 : 2605.
98. Bhatia S, Louie AD, Bhatia R, O'donnell MR, Fung H, Kashyap A, and Parker P. A. Solid cancers after bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Oncology*, 2001;19(2), 464-471.
99. Ferlay J, Shin H, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127: 2893-917.
100. Fisher B. Malignancies of the Breast. In: Cameron RB (eds), *Practical Oncology*. Appleton & Lange, Connecticut, 1994: 417-434
101. Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR, Bosch FX. *Manuel of Clinical Oncology* (5 th ed). UICC Genova, 1990: 236-248
102. Kuzey GM, Ozdamar SO, Zergerođlu S. *Temel patoloji. İçinde: Erhan Y, editor. Meme kanseri*. Ankara: Gunes Kitapevi; 2007.s.726.
103. Spratt JS, Spratt SW. Medical and legal implications of screening and follow-up procedures for breast cancer. *Cancer*.1990; 66:1351-1362.
104. Warren S, Witham E. Studies on tumor metastases: The distribution of metastases in cancer of the breast. *Surg Gynecol Obstet*.1933; 57: 81.
105. Kekilli E ve ark. Meme kanseri olgularında geç çekim pet/ct bulgularının klinik İmmünohistokimyasal prognostik faktörlerle ilişkisi. malatya – 2014
106. Topuz E, Aydın A, Dinçer M. *Meme Kanseri*. Nobel Tıp Kitapevi, 2003.
107. Freeman HP. Cancer in the socio-economically disadvantaged. *C.A.Caner J Clin* 1987;39:267-287.
108. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, organlara göre kanser sıklığının dağılımı ve kadınlarda en sık görülen 10 kanser, [http:// www. saglık. gov.tr](http://www.saglık.gov.tr). 2001.

109. Weber ES. Questions & answers about breast cancer diagnosis. *AJN*1997; 97:34-38.
110. Vogel V. Assessing risk of breast cancer. *Postgraduate Medicine* 1999; 105:63-69.
111. Mincey BA. Genetics and the management in women at high risk for breast cancer. *Oncologist* 2003; 8(5): 466-473.
112. Hulka BS, Stark AT. Breast cancer: cause and prevention. *Lancet* 1995; 346:883-887.
113. Burke W, Daly M, Garber J, Botkin J, Ellis Kahn MJ. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. II.BRCA1 and BRCA2. *JAMA* 1997; 277:997-1003.
114. MacMahon B, Cole P, Brown J. Etiology of human breast cancer: a review. *J Natl Cancer Inst.* 1973;50(1):21-42.
115. Lawson JS, Glenn WK, Heng B, Ye Y, Tran B, LutzeMann L, Whitaker NJ. Koilocytes indicate a role for human papilloma virus in breast cancer. *Br J Cancer.* 2009 Oct 20;101(8):13516.
116. Amarante MK, Watanabe MAE. The possible involvement of virus in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135(3):329–37.
117. Lawson JS, Günzburg WH, Whitaker NJ. Viruses and human breast cancer. *Future Microbiol.* 2006;1(1):33–51.
118. Özçam, H., Çimen, G., Uzunçakmak, C., Aydın, S., Özcan, T., & Boran, B. Kadın Sağlık Çalışanlarının Meme Kanseri, Serviks Kanseri ve Rutin Tarama Testlerini Yaptırmaya İlişkin Bilgi Tutum ve Davranışlarının Değerlendirilmesi. *İstanbul Medical Journal*, 2014;15(3).
119. Salman, N. A., Davies, G., Majidy, F., Shakir, F., Akinrinade, H., Perumal, D., & Ashrafi, G. H. Association of high risk human papillomavirus and breast cancer: a UK based study. *Scientific reports*, 2017;7, 43591.
120. zur Hausen, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account. *Virology*, 2009;384(2), 260-265.

121. De Villiers E, Sandstrom RE, Zur Hausen H, Buck CE. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res*. 2005;7(1):R1–11.
122. Joshi D, Buehring GC. Are viruses associated with human breast cancer? Scrutinizing the molecular evidence. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;135(1):1–15.
123. Heng B, Glenn WK, Ye Y, Tran B, Delprado W, Lutze-Mann L, Whitaker NJ, Lawson JS: Human papilloma virus is associated with breast cancer. *British Journal of Cancer* 2009, 101:1345-1350.
124. Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML: Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992, 21:95-100.
125. Hennig EM, Suo Z, Thoresen S, Holm R, Kvinnsland S, Nesland JM. Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Breast Cancer Res Treat* 1999, 53(2):121-135.
126. Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, Irie Y, Takahashi E, Tanigami A, Izumi K. Human papillomavirus type 33 DNA in breast cancer in Chinese. *Breast Cancer* 2000, 7(1):33-36.
127. Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, Irie Y, Takahashi E, Tanigami A, Izumi K. HPV33 DNA in premalignant and malignant breast lesions in Chinese and Japanese populations. *Anticancer Res* 1999, 19(6B):5057-5061.
128. Liu Y, Klimberg VS, Andrews NR, Hicks CR, Peng H, Chiriva-Internati M, Henry-Tollman R, Hermonat PL. Human papillomavirus DNA is present in a subset of unselected breast cancers. *J Hum Virol* 2001, 4(6):329-334.
129. Damin AP, Karam R, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre CO. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2004, 84(2):131-137.
130. Widschwendter A, Brunhuber T, Wiedemair A, Mueller-Holzner E, Marth C. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. *J Clin Virol* 2004, 31(4):292-297.

131. Kroupis C, Markou A, Vourlidis N, Dionvssiou-Asteriou A, Lianidou ES. Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. *Clin Biochem* 2006, 39:727-731.
132. Kan CY, Iacopetta BJ, Lawson JS, Whitaker NJ. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. *Br J Cancer* 2005, 93(8):946-948.
133. Gumus M, Yumuk PF, Salepci T, Aliustaoglu M, Dane F, Ekenel M, Basaran G, Kaya H, Barisik N, Turhal NS. HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients normal and tumoral tissue samples. *J Exp Clin Cancer Res* 2006, 25(4):515-521.
134. Khan NA, Castillo A, Koriyama C, Kijima Y, Umekita Y, Ohi Y, Higashi M, Sagara Y, Yoshinaka H, Tsuji T, Natsugoe S, Douchi T, Eizuru Y, Akiba S. Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan. *Br J Cancer* 2008, 99(3):408-414. *ncer Res* 2006, 25(4):515-521.
135. de Leon DC, Montiel DP, Nemcova J, Mykyskova I, Turcios E, Villavicencio V, Cetina L, Coronel A, Hes O. Human papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. *BMC Cancer* 2009, 9:26.
136. Mendizabal-Ruiz AP, Morales JA, Ramirez-Jirano LJ, Padilla-Rosas M, Moran-Moguel MC, Montoya-Fuentes H. Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2009, 114:189-194.
137. Wrede D, Luqmani YA, Coombes RC, Vousden KH. Absence of HPV16 and 18 DNA in breast cancer. *Breast Cancer Research* 1992, 65(6):891-4.
138. Bratthauer GL, Tavassoli FA, O'Leary TJ. Etiology of breast carcinoma: no apparent role for papillomavirus types 6/11/16/18. *Pathol Res Pract* 1992, 188(3):384-6.
139. Gopalkrishna V, Singh UR, Sodhani P, Sharma JK, Hedau ST, Mandal AK, Das BC. Absence of human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerase chain reaction. *Breast Cancer Res Treat* 1996, 39(2):197-202.
140. Czerwenka K, Heuss F, Hosmann JW, Manavi M, Lu Y, Jelincic D, Kubista E. Human papillomavirus DNA: a factor in the pathogenesis of mammary Paget's disease? *Breast Cancer Res Treat* 1996, 41:51-57.

141. Lindel K, Forster A, Altermatt HJ, Greiner R, Gruber G. Breast cancer and human papillomavirus (HPV) infection: no evidence of a viral etiology in a group of Swiss women. *Breast* 2007, 16:172-177.
142. de Cremoux P, Thioux M, Lebigot I, Sigal-Zafrani B, Salmon R, Sastre- Garau X. No evidence of human papillomavirus DNA sequences in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2008, 109:55-58.
143. Hedau, S., Kumar, U., Hussain, S., Shukla, S., Pande, S., Jain, N., and Chakraborty, S. Breast cancer and human papillomavirus infection: no evidence of HPV etiology of breast cancer in Indian women. *BMC cancer*, 2011;11(1), 27.
144. Hansen B, Nygård M, Falk R, Hofvind S. Breast cancer and ductal carcinoma in situ among women with prior squamous or glandular precancer in the cervix: a register based study. *Br J Cancer*. 2012; 107(9):1451–3.
145. Lv, Y. R., Wang, J. L., Zhang, K., Gao, H. D., Sun, J. Z., Gong, Y. Y., & Ma, R. Human papilloma viruses (HPVs) no co-existence in breast cancer and cervical cells in the same patient. *Chin J Physiol*, 2014;57(2), 105-6.
146. Li, N., Bi, X., Zhang, Y., Zhao, P., Zheng, T., & Dai, M. Human papillomavirus infection and sporadic breast carcinoma risk: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*, 2011;126(2), 515-520.
147. Clifford G, Franceschi S. Members of the human papillomavirus type 18 family (alpha-7 species) share a common association with adenocarcinoma of the cervix. *Int. J. Cancer*, 2008;122:1684–1685. 10.1002/ijc.23282.
148. de Sanjose, S., Quint, W. G., Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., ... & Vallejos, C. S. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The lancet oncology*, 2010; 11(11), 1048-1056.
149. Demographic and Health Survey 1998. Hacettepe University Institute of Population Studies, Ankara Turkey, 1999.
150. Vogel V. Assessing risk of breast cancer. *Postgraduate Medicine* 1999; 105:63-69.
151. Baron RH, Walsh A. Facts everyone should know about breast. *AJN* 1995; July:29-33.

152. Henderson IC. Risk factors for breast cancer. *Cancer* 1993; 71: 2127-2140.



ÖZGEÇMİŞ

01.01.1974 tarihinde Suriye-Halep'te dünyaya geldim. İlkokul'u Halep'te, ortaokul ve liseyi Halep'te okudum. 1998 yılında Halep Üniversitesi, Tıp Fakültesinden mezun oldum. 2002 yılında Halep Üniversitesinde Hematoloji anabilim dalından uzmanlığımı yaptım. 2015 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından yüksek lisans derecesini aldım. 2015 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimime başladım.

