

T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**ETİNİL ÖSTRADİOL (0.30 mg) VE DROSPİRENON (3 mg)  
İÇEREN ORAL KONTRASEPTİFLERİN SERVİKAL MUKUS  
MUKOPROTEİN İÇERİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Murat AKSOY**

**UZMANLIK TEZİ**

TRABZON

2010

T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**ETİNİL ÖSTRADİOL (0.30 mgr) VE DROSPİRENON (3 mg)  
İÇEREN ORAL KONTRASEPTİFLERİN SERVİKAL MUKUS  
MUKOPROTEİN İÇERİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Murat AKSOY**

**UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı**  
**Yrd. Doç. Dr. Süleyman GÜVEN**

TRABZON

2010

## TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca tüm tecrübe ve bilgilerinden yararlanmamı sağlayan başta Sayın Bölüm Başkanı Prof. Dr. Hasan BOZKAYA olmak üzere tüm hocalarıma, ayrıca benden ilgi ve desteklerini esirgemeyen ve bu tezin hazırlanmasında değerli katkı ve önerilerinden dolayı Doç. Dr. Faruk AYDIN, Doç. Dr. İlkur TOSUN, Sayın Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Süleyman GÜVEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca birlikte çalıştığım tüm asistan, hemşire, teknisyen, sekreter, diğer görevli arkadaşlara da teşekkürü bir borç bilirim.

**Dr. Murat AKSOY**

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No</b>
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii-iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	v
TABLolar DİZİNİ .....	v-vi
GRAFİKLER DİZİNİ .....	vi
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Gerekçe ve Hipotez.....	1
1.2. Amaçlar .....	2
1.3. Kapsam .....	2
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Oral Kontraseptifler .....	3
2.1.1. Tanım .....	3
2.1.2. Tarihçe.....	3
2.1.3. Progestinler .....	4
2.1.4. Östrojenler .....	5
2.1.5. Oral Kontraseptif Jenerasyonları .....	6
2.1.6. Etkinlik .....	6
2.1.7. Etki Mekanizması .....	6
2.1.8. Oral Kontraseptiflerin Yan Etkileri.....	7
2.1.9. Oral Kontraseptiflerin Etkileri.....	8
2.1.9.1. Kan Basıncı Üzerine Etkileri .....	8
2.1.9.2. Metabolizma Üzerine Etkileri .....	9

2.1.9.3. Venöz Tromboemboli.....	9
2.1.9.4. Trombofili.....	10
2.1.9.5. Serebrovasküler Atak .....	10
2.1.9.6. İskemik Kalp Hastalığı .....	10
2.1.9.7. Neoplazi.....	11
2.1.10. Oral Kontraseptifler ve Serviks Kanseri .....	11
2.2. Servikal Mukus.....	12
2.2.1. Servikal Mukusun Yapısı .....	12
2.2.2. Steroidlerin Servikal Mukus Üzerine Etkileri .....	12
2.3. Mukoproteinler.....	13
2.3.1. Mukoproteinlerin Fonksiyonları ve Çeşitleri .....	13
2.3.2. Servikal Mukoproteinler .....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3.1. Bireyler.....	16
3.2. Olgu Seçimi.....	16
3.3. Oral Kontraseptif Preparatı Kullanımı.....	17
3.4. Servikal Mukusta Mukoprotein İçeriğinin Ölçülmesi.....	18
3.4.1. Servikal Mukoprotein Ölçüm Prensibi.....	18
3.4.2. Reaktiflerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü.....	19
4. BULGULAR.....	22
5. TARTIŞMA.....	27
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	34
7. ÖZET.....	35
8. SUMMARY.....	36
9. KAYNAKLAR .....	37

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

OK	:	Oral Kontraseptif
LH	:	Luteinleştirici Hormon
HPV	:	İnsan Papilloma virusu
SVO	:	Serebrovasküler olay
MI	:	Myokard infarktüsü
IARC	:	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IgA	:	İmmünglobulin A
MUC	:	Mukoprotein
DM	:	Diabetes Mellitus
HT	:	Hipertansiyon
HRP	:	Horseradish Peroksidaz
ELISA:		Enzim bağımlı immüno assay
mRNA:		Haberci RNA

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Deney Prosedürü.....	20
----------	----------------------	----

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Oral Kontraseptiflerin Tarihi Gelişimi.....	4
Tablo 2.	Oral Kontraseptiflerin Kesin Kontrendikasyonları.....	7
Tablo 3.	Oral Kontraseptiflerin Kontraseptif Olmayan Yararları.....	8
Tablo 4.	Mukoproteinlerin Sınıflandırılması .....	14
Tablo 5.	ELISA Kit Sistemi Elemanları.....	18
Tablo 6.	Araştırma Grubuna Ait Genel Klinik Özellikler .....	22

Tablo 7. Araştırma Grubunda OK Kullanımı Öncesinde ve Sonrasında Siklusun Foliküler Fazında MUC 1, 2, 5B ve 5AC Düzeyi Ortalama Değerleri.....23

Tablo 8. Araştırma Grubunda OK Kullanımı Öncesi ve Sonrasında Siklusun Foliküler Fazında MUC 1, 2, 5B ve 5AC Düzeyi Değişimleri ile İlgili Veriler ve İstatistiksel Analiz Verileri.....26

## GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Araştırma grubunda oral kontraseptif kullanım öncesi ve sonrasında servikal mukusta MUC1 dağılımı.....24

Grafik 2. Araştırma grubunda oral kontraseptif kullanım öncesi ve sonrasında servikal mukusta MUC2 dağılımı.....24

Grafik 3. Araştırma grubunda oral kontraseptif kullanım öncesi ve sonrasında servikal mukusta MUC5B dağılımı.....25

Grafik 4. Araştırma grubunda oral kontraseptif kullanım öncesi ve sonrasında servikal mukusta MUC5AC dağılımı.....25

## 1. GİRİŞ

### 1.1 Gerekçe ve Hipotez

Oral kontraseptifler (OK), %100'e yakın etkinlik, yüksek güvenlik sınırları ve sağlığa diğer önemli katkılarıyla, bugün en etkili geriye dönebilir doğum kontrol yöntemidirler (1). Son yıllardaki bilimsel çalışmalar, OK'lerin neden olabileceği, özellikle tromboembolik hastalık ve kardiyovasküler hastalıklar gibi potansiyel riskleri azaltmaya ve oral kontraseptiflerin yararlarını arttırmaya yönelmiştir. Bununla birlikte araştırmalar, OK'ler içindeki hormonların birtakım kanserler üzerinde rol oynayabileceği ve hormon bazlı oral kontraseptiflerin bunların gelişimine nasıl katkıda bulunduğu fikri üzerine yoğunlaşmıştır. OK kullanımıyla, meme ve serviks kanseri riskleri artmakta iken, endometrial ve ovaryan kanser riskleri azalmaktadır (2).

Çalışmalar, OK'lerin uzun süreli kullanımının (5 veya daha fazla yıl), Serviks kanseri ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (3). Bununla birlikte, OK kullananlarda Serviks Kanseri'ndeki risk artışının mekanizması ile ilgili bilgiler uzun süredir tartışmalı olup, henüz kesin bir mekanizma ortaya konamamıştır. Mekanizmalardan biri steroid kontrasepsiyonu olarak varsayılmakta ve HPV aracılığıyla servikal dokudaki tümörojenik etkinin arttığı varsayılmaktadır(4).

OK kullanımıyla servikal mukus, OK içeriğindeki progesteron etkisiyle kalın ve visköz hale gelir (5, 6). Servikal mukus yapısındaki bu değişim, içeriğindeki mukoprotein içeriğinin değişimiyle ilişkilendirilmiştir (7). Bu nedenle OK'lerin servikal karsinogenezle ilişkisini tanımlamak için öncelikle servikal mukustaki değişikliklere sebep olan mukoproteinleri saptamak ve ardından bu mukoproteinlerin HPV ve servikal karsinogenez ile ilişkilerini araştırmak gerekmektedir. OK kullanıcılarındaki servikal kanser gelişiminin patofizyolojisinde servikal mukus değişikliklerinin rolü iyi açıklanmamıştır.



Bu tez çalışmamdaki hipotez; OK kullanıcılarındaki yetersiz, kalın ve yüksek oranda viskoz servikal mukusun servikal kanser patogeneziyle yakından ilişkili olduğu şeklindedir. Belki de; servikal mukusun bu yapısı, yüksek viskoz paterni nedeniyle, karsinojenik ajanların uzaklaştırılmasına izin vermeyerek, koitusla taşınan ve serviksin skuamokolumnar bileşkesi ve posterior vajinal fornikte depolanan bu karsinojenik ajanların etkilerini uzatabilir veya değiştirebilir. Servikal mukustaki makroskopik ve mikroskopik değişiklikler, servikal kansere predispozisyon yaratan servikal mukoproteinler ve diğer proteinlerin oranlarındaki değişikliklerle bağlantılı olabilir (8).

## **1.2 Amaçlar**

- Foliküler fazda, servikal mukus içindeki mukoprotein kontentini belirlemek.
- OK kullanımı sonrasında servikal mukus mukoprotein kontentini belirlemek.
- OK kullanımı sonrası servikal mukustaki mukoprotein kontentini normal menstrüel siklustaki ile karşılaştırmak.
- Bu konuda yapılacak diğer çalışmalara kaynak oluşturmak.

## **1.3 Kapsam**

Ekim 2008 – Kasım 2009 arasında, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine kontrasepsiyon amacı ile başvurup, OK kullanımı için uygun ve istekli 20 üreme çağındaki kadın çalışmaya dahil edilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Oral Kontraseptifler

#### 2.1.1 Tanım

Hormonal kontraseptifler; sentetik östrojen, sentetik progesteron (progestin), veya yalnızca progestin içeren kadın seks steroidleridir. Oral yolla, transdermal, implant veya enjeksiyon formu şeklinde uygulanabilirler. En yaygın kullanılan hormonal kontraseptifler, kombine oral kontraseptiflerdir (9).

Oral kontraseptifler monofazik, bifazik veya trifazik formda bulunabilirler. Monofazik olanlarda her tablet sabit miktarda östrojen ve progesteron içerir. Bifazik olanlarda östrojen miktarı sabit olmakla birlikte, progesteron miktarı siklusun ikinci yarısında artar. Trifazik olanlarda ise östrojen miktarı sabit veya değişken olabilmekle birlikte, progesteron miktarı 3 eşit fazda artar (10).

Kombine oral kontraseptiflerin 21 ve 28 günlük kullanım versiyonları mevcuttur. 28 günlük hap rejimi 21 aktif, 7 etkisiz (hatırlatıcı) hap içerir. Bu rejimde son 7 gün plasebo tabletler veya demir verilir. Son 7 hap alınırken adet kanaması olacağı konusunda hasta bilgilendirilir. 21 günlük rejimde etkisiz hap bulunmaz. Hap bittikten sonra 7 gün ara verilir ve geri çekilme kanaması olur. Monofazik preparatlardan farklı olarak multifazik preparatlar sıraya uygun olarak alınmalıdır. Konvansiyonel yöntemde ilk hap bir sonraki adetin başında kullanılmaya başlanır (11, 12). Diğer bir alternatif de, hekimin değerlendirme günü gebelik dışlandıktan sonra ilacın başlandığı “hemen başlama” (quick start) metodudur (13).

#### 2.1.2 Tarihçe

1940 yılında Sturgis ve Albright östrojen kullanılarak uygulanan ovulasyon indüksiyonuyla dismenorenin tedavi edilebildiğini öne sürdüler. Takip eden yıllarda kontrasepsiyon amacıyla, yapının yan ürünü olarak, içinde bir miktar östrojen içeren

progesterinler her ne kadar kontrasepsiyonda etkili olarak düşünölmüşse de, sonrasında üretilen saf progesterinler düzensiz kanama yapması nedeniyle tatminkar sonuçlar yaratmamıştır. Nitekim 1960 yılında östrojenin tekrar eklenmesi ile kombine oral kontraseptifler günümüze kadar gelmiştir (9, 10). Oral kontraseptiflerin tarihsel gelişimi tablo 1’de özetlenmiştir.

**Tablo 1** : Oral kontraseptiflerin tarihi gelişimi (14)

Yıl	Araştırmacı	Bulgu
1897-1898	Beard ve Prenant	Gebelik boyunca ovulasyon yok
1898	Zschokke	Korpus luteum persistansına bağlı sterilite
1916	Hermann ve Stein	Luteal ekstreler ovulasyonu baskılanmakta
1924	Haberlandt	Ovarian ve plasental hormonların tatbiki ile fertilitte regölasyonu
1929	Corner ve Allen	Progesterasyonel ajanların biyolojik olarak denenmesi
1931	Haberlandt	Hormonal sterilizasyon aracılığıyla doğum kontrolü
1934	Wintersteiner ve Allen	Progesteronun izolasyonu
1936	Kurzrok	Östrojen kullanımıyla hormonal sterilizasyon
1937	Makepeace ve ark.	Progesteron ile ovulasyon inhibisyonu
1940	Sturgis ve Albright	Ovulasyon inhibisyonuyla (Östrojenler) dismenore tedavisi
1945	Albright	Östrojen kullanımı ile kontrasepsiyon
1955	Pincus	Oral progesteron ile ovulasyon inhibisyonu

### 2.1.3 Progesterinler

Progesterinler, doğal progesteronların etkisini taklit eden, fakat yapısal farklılıkları olan sentetik bileşiklerdir (9). Kombine oral kontraseptiflerde, farklı düzeylerde progesterasyonel güç gösteren birçok farklı progesterin türevi kullanılmaktadır. Progesterinler,

östrojenik, antiöstrojenik veya androjenik aktiviteye sahip olabilir (10). Levonorgestrel ve noretindron, reseptörlerine direkt bağlanmakta iken, desogestrel, karaciğerde biyoaktivasyona maruz kalarak aktif metaboliti olan 3-ketodesogestrel'e dönüşmektedir (15).

Kombine oral kontraseptiflerde kullanılan progestinler, kimyasal yapılarına göre 2'ye ayrılır:

1- Estranlar: Noretindron, etinodiol diasetat

2- Gonanlar: Levonorgestrel, desogestrel, norgestimate (19 norprogestinler)

Yeni progestinlerden norgestimate, desogestrel ve gestodene diğer 19 norprogestinlerden daha selektif olup, ovulasyon inhibe edici dozlarda neredeyse hiç androjenik etki barındırmamaktadırlar (16). Gestodene, levonorgestrel türevi olup, en potent progesterondur.

Yeni bir progestin türevi olan Drospirenon, diüretik Spironolakton türevi olup, progesteron, mineralokortikoid ve androjen reseptörlerine yüksek afinite gösterir. Progesteron agonisti gibi davranır, fakat mineralokortikoid ve androjen antagonistidir (17). Polikistik over sendromuyla ilgili bir çalışmada drospirenonun ile iyi siklus kontrolü ve androjen düzeylerinde azalma yaptığı saptanmışken, kilo, kan basıncı ve glukoz metabolizmasını etkilemediği gösterilmiştir (18). 3 mg drospirenone / 30 µg etinil östradiol kombinasyonunun 150 µg levonorgestrel / 30 µg etinil östradiol kombinasyonu ile karşılaştırıldığı başka bir çalışmada da her iki kombinasyonda siklus kontrolü ve kontraseptif etkinlik açısından fark saptanmazken, drospirenon kombinasyonunda vücut ağırlığı ve kan basıncına etki açısından daha olumlu sonuçlar elde edilmiştir (19).

#### **2.1.4 Östrojenler**

Kombine oral kontraseptifler içinde, mestranol ve etinil östradiol olmak üzere 2 tip östrojen kullanılır. Mestranol in vivo olarak karaciğerde metil grubunun kesilmesiyle etinil östradiole çevrilir (20). 50 µg mestranol ile 35 µg etinil östradiol aynı kan düzeylerini oluşturur (21).

### 2.1.5 Oral Kontraseptif Jenerasyonları

1. Jenerasyon:  $\geq 50$   $\mu\text{g}$  etinil östradiol içerenler

2. Jenerasyon:  $\leq 35$   $\mu\text{g}$  etinil östradiol + desogestrel ve gestoden dışında diğer progestinler içerenler

3. Jenerasyon:  $\leq 30$   $\mu\text{g}$  etinil östradiol + desogestrel veya gestoden içerenler olmak üzere üç kısımda incelenir (22).

### 2.1.6 Etkinlik

Mükemmel kullanıcılarda, gebeliğin önlenmesinde % 99.9 oranında etkilidir (23). Etkinliği kısıtlayan ana faktör hasta uyumu olup, yapılan bir çalışmaya göre her bir siklуста kadınların % 47' si 1 veya daha fazla, % 22' si ise 2 veya daha fazla hap alımını unutmuştur (24).

### 2.1.7 Etki Mekanizması

OK'lerin temel etki mekanizmaları aşağıda verilmiştir.

- Östrojen aracılığıyla gonadotropin sekresyonu baskılanır, böylece ovulasyon inhibe olur (25).
- Östrojen, progesteron reseptör konsantrasyonunu artırır, böylece progesteron dozu azaltılır (22).
- Progestinler, östrojen ile kombine edildiğinde LH (Luteinleştirici Hormon) üretimi ve salınımı ve böylece ovulasyon baskılanır (12).
- Progestinler, endometriumda atrofiye neden olarak implantasyonu engellerler (26).
- Progestinler servikal mukusun viskozitesini arttırarak, sperm transportunu engellerler (5, 27).
- Fallop tüpünün sekresyonu ve peristaltizmi üzerine olası etkisiyle, ovum ve sperm transportunu engeller (25).

Oral kontraseptiflerin kesin kontrindikasyonları tablo 2' de özetlenmiştir.

**Tablo 2** : Oral Kontraseptiflerin Kesin Kontrendikasyonları (23)

- 
- Laktasyon, postpartum < 6 hafta
  - 35 yaş üzeri sigara kullanımı ( $\geq 15$  sigara / gün)
  - Hipertansiyon (Sistolik  $\geq 160$  mm Hg veya diastolik  $\geq 100$  mm Hg)
  - Geçirilmiş veya aktif venöz tromboembolizm
  - İskemik Kalp Hastalığı
  - Serebrovasküler Atak Öyküsü
  - Komplike kalp kapak hastalığı (pulmoner hipertansiyon, atrial fibrilasyon, subakut bakteriyel endokardit öyküsü)
  - Fokal nörolojik semptomları olan migren
  - Meme kanseri
  - Retinopati, nefropati veya nöropati ile komplike diabet
  - Dekompanse siroz
  - Karaciğer tümörü (adenom veya hepatom)
- 

### 2.1.8 Oral Kontraseptiflerin Yan Etkileri

Hastaların oral kontraseptif kullanımını bırakmalarına sebep olan sık yan etkiler, sırasıyla:

- Anormal menstrüel kanama
- Mide bulantısı
- Kilo alımı
- Psikolojik değişiklikler
- Göğüslerde duyarlılık
- Baş ağrısı'dır (28).

Oral kontraseptiflerin kontraseptif olmayan yararları tablo 3'de verilmiştir.

**Tablo 3** : Oral Kontrasepsiyonun Kontraseptif Olmayan Yararları

- 
- Siklus regülasyonu (29)
  - Artmış kemik mineral dansitesi (30, 31)
  - Azalmış menstrüel kan kaybı (32)
  - Daha az dismenore (33)
  - Daha az hirsutizm (34)
  - Daha az akne (35)
  - Azalmış peri-menopozal semptomlar (36)
  - Azalmış endometrial kanser (2, 37)
  - Azalmış ovarian kanser (2, 37)
  - Azalmış fibroid riski (38)
  - Ovarian kist oluşumunda muhtemel azalma (39)
  - Kolorektal kanser riskinde muhtemel azalma (40)
  - Benign meme hastalığı olgularında muhtemel azalma (41)
  - Azalmış pelvik inflamatuvar hastalık insidansı (42)
- 

### 2.1.9 Oral Kontraseptiflerin Etkileri

Oral kontraseptiflerin bir çok sistem üzerine etkileri mevcuttur. Bu sistemler üzerine olan etkiler aşağıda kısaca özetlenmiştir.

#### 2.1.9.1 Kan Basıncı Üzerine Etkileri

Özellikle yüksek doz östrojen içeren oral kontraseptif kullanan hastalarda %5 oranında kan basıncı 140/90 mmHg üzerine çıkmaktadır. Mekanizma anjiyotensin miktarındaki artışla açıklanmaktadır. Yine yüksek doz östrojen içerenler, plazma hacmi ve dolayısıyla kalp atım hacminde artışa sebep olabilmektedir hipertansiyona katkıda bulunabilmektedir. Düşük doz östrojen içerenlerde bunlar ihmal edilebilir düzeydedir (43).

### 2.1.9.2 Metabolizma Üzerine Etkileri

İçeriğindeki progestinin dozu ve tipine göre, kontrole kıyaslandığında, kombinasyon ilaçları kullanan kadınlarda plazma glukoz, insülin ve c-peptid düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. Östrojenin karbonhidrat metabolizmasına etkisi görülmemiştir. En fazla etki Levonorgestrel kombinasyonlarında gösterilmiştir (44).

Östrojenler LDL-kolesterol düzeyini düşürüp HDL-kolesterol düzeylerini arttırlar (45). Androjenik yan etkisi olan progestinler ise LDL'yi arttırıp, HDL'yi düşürerek östrojenin bu yararlı etkisini antagonize ederler. Geçmişteki kombinasyonlar, östrojenin HDL/LDL kolesterol oranlarındaki pozitif etkisini etkisiz hale getiren estran progestinler ve levonorgestrel içermektedir. Geliştirilen desogestrel, norgestimate ve drospirenon gibi yeni gonan progestinler, HDL/LDL oranında pozitif etki yapmaktadırlar (2, 46-48)

OK'ler içindeki östrojen, dolaşımdaki tiroid bağlayıcı globulin ve total tiroksin düzeylerini arttırırken, triiyodotironin resin geri alımını da azaltmaktadır (49).

### 2.1.9.3 Venöz Tromboemboli

Düşük doz östrojen içeren oral kontraseptifler, koagülasyon sistemi üzerinde daha az etkili olmakla birlikte, fibrinolitik faktörler, prokoagülan faktörlerle aynı oranda artış gösterir (50, 51). Düşük östrojen dozları içeren OK'ler, (30-35 µg Etinil Östradiol), yüksek doz östradiol içeren oral kontraseptiflerle (50 µg östradiol) karşılaştırıldığında düşük östrojen dozlarında tromboemboli riski azalmaktadır (4.2/10.000 ve 10/10.000) (52).

Kombine OK kullanıcılarındaki venöz tromboemboli oranları, kullanmayanlara kıyasla 3-4 kat artmıştır (53). Ayrıca, yeni progestinlerden desogestrel veya gestodene ile kombine edilmiş 20-30 µg Etinil Östradiol içeren oral kontraseptifleri kullanan hastalardaki venöz tromboemboli riski, levonorgestrel'in aynı dozlarda östrojen ile kombine edildiği preparatları kullanan hastalarla karşılaştırıldığında biraz daha yüksek olarak saptanmıştır (54).

30-35µg Etinil Östradiol içeren oral kontraseptifler ile oluşabilecek venöz tromboz riski 3/10.000 kadın/yıl, normal reproduktif dönemdeki kadınlarda 1/10.000 kadın/yıl, gebelerde ise 6/10.000 kadın/yıl'dır (55).



#### **2.1.9.4 Trombofili**

Kalıtımsal antitrombin 3, protein c veya protein s defekti olan kadınlar gebelik ve östrojen tedavisi açısından çok yüksek risk altında olmakla birlikte, bunlar potansiyel OK kullanıcılarının çok küçük bir kısmını oluşturmaktadırlar. Son zamanlarda tanımlanan Faktör V Leiden Mutasyonu ise beyaz nüfusun %3-5'inde saptanmaktadır (9). OK kullanıp Faktör V Leiden Mutasyonu bulunmayan kadınlar arasında ilk tromboembolik atak riski oranı 2.2/10.000 kadın/yıl iken, OK kullanıp mutasyon olan kadınlar arasında bu oran artmış olup 27.7/10.000 kadın/yıl'dır (56). Buna rağmen OK başlanmadan önce Faktör V Leiden Mutasyonu açısından rutin tarama önerilmemektedir. Bunun yerine, östrojen içeren hormonal kontrasepsiyon başlanmadan önce veya gebelik öncesi hastanın özgeçmiş ve soygeçmişini Derin Ven Trombozu öyküsü açısından sorgulama önerilmektedir (57).

#### **2.1.9.5 Serebrovasküler Atak**

50 µg'dan fazla Etinil Östradiol içeren kombine OK kullanıcılarında belirgin risk artışı gözlenmektedir (58). Sigara kullanımı ve Hipertansiyon, SVO için majör risk faktörleridir (59). Hipertansif kombine oral kontraseptif kullanıcıları, hipertansif olmayan kullanıcılara kıyasla SVO açısından yüksek risk altındadırlar (60). 50 µg'dan az östrojen içeren haplar, SVO riskini arttırmamaktadır (61).

#### **2.1.9.6 İskemik Kalp Hastalığı**

Majör risk faktörleri ve sosyodemografik faktörler hesaba katılmadığında, düşük doz OK kullanıcılarında myokard infarktüsü açısından risk artışı saptanmamıştır (62). Sigara kullanımı ve Hipertansiyon, OK kullanıcılarında MI için bağımsız risk artırıcı faktörlerdir (63). 50 µg altında östrojen içeren OK kullanımında, myokard enfarktüsü riski artmamaktadır (64). Bir çalışmada, yeni progestinlerden desogestrel ve gestoden içeren oral kontraseptifler, içeriğinde aynı doz östrojen ve progestin olarak levonorgestrel bulunan oral kontraseptiflerle kıyaslandığında myokard enfarktüsü riski yeni progestinleri içerenlerde daha düşük saptanmıştır (65).

### 2.1.9.7 Neoplazi

Hormonal OK'lerin neoplastik etkileri üzerinde geniş çalışmalar yapılmış ve son meta-analizler göstermiştir ki, OK kullanımıyla, meme, serviks ve karaciğer kanseri riskleri artmakta iken, endometrial ve ovarian kanser riskleri azalmaktadır (2). Ovarian ve endometrial kanser riskinin OK ilişkili olarak azalmasına dair neden-sonuç ilişkisi kaynaklı oldukları düşünülen akla yakın biyolojik mekanizmalar mevcuttur (37).

Oral kontraseptiflerin, karaciğerin benign adenomunun sebeplerinden biri olduğu öne sürülmektedir. Bu durum, OK kullanımı sonlandırıldığında genellikle gerilemektedir. Bu tümörler bazen ölümcül kanamalara sebep olabilmektedir (66).

OK kullanımı sırasında kadınlarda meme kanseri riskinde %24 artış olup (rölatif risk 1.24), kesilmesini takiben 1-4 yıl içinde risk %16'ya kadar hızlıca düşmekte, 10 yıldan sonra da kaybolmaktadır (67). Meme kanseri riski, OK'leri geçmişte kullanmış olanlar ve halen kullananlarda artış göstermemiş, ayrıca kullanım süresinin uzun olması ve yüksek östrojen içeren OK'lerin kullanımı da riskte artışa sebep olmamıştır. Ne ailede meme kanseri öyküsü olması, ne de ilacı erken yaşta başlamak risk artışı ile ilişkilendirilebilmiştir (68). OK kullanan hastalarda daha ayrıntılı muayene yapıldığı için daha fazla olgunun saptanabildiği de göz önünde bulundurulmalıdır (12).

### 2.1.10 Oral Kontraseptifler ve Serviks Kanseri

Her ne kadar OK ilişkisi tam olarak tanımlanamamışsa da, invaziv servikal kanserin, en bilinen sebebi HPV enfeksiyonu gibi gözükmemektedir (69). İn vivo ve in vitro bazı çalışmalarda, OK kullanımının, sebep zincirinin bir parçası olabileceğine dair veriler mevcuttur (70, 71).

İnvaziv servikal kanser, özellikle tarama testlerinin eksik yapıldığı veya yapılmadığı gelişmekte olan ülke kadınları arasında önde gelen morbidite ve mortalite sebeplerinden biridir. Çalışmalar, OK'lerin uzun süreli kullanımının (5 veya daha fazla yıl), Serviks kanseri ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (3). IARC'den (*International Agency for Research on Cancer*) elde edilen 9 vaka-kontrol çalışması; HPV maruziyeti sonrasında, OK'lerin uzun süreli kullanımı, artmış parite, sigara ve cinsel yolla bulaşan hastalıkların Serviks Kanseri lehine olan etkilerini doğrulamıştır (3).

Diğer bir çalışmanın bulgularına göre, uzun süreli OK kullanıcıları (8 yıldan uzun süreli) arasında Serviks Kanseri açısından belirgin risk artışı (Rölatif risk 2.73) gözlenmiştir (72).

Farklı bir çalışmada da araştırmacılar, serviks kanserli 12531 kadından oluşan 28 çalışmadan elde edilen verileri incelemişlerdir. Bu verilere göre, OK kullanımının kesilmesinden sonra Serviks Kanseri riski azalabilmektedir. (73).

Diğer bir IARC raporunda, HPV pozitif kadınların servikal kanser riskinde OK kullanımının etkilerini değerlendirmek amacıyla 8 çalışmanın verileri birleştirilmiştir. Hiç kullanmayanlarla karşılaştırıldıklarında, 5 yıldan kısa süreli OK kullanmış olanlarda servikal kanser riskinde artış saptanmamıştır. 5 yıldan uzun süreli OK kullanan HPV DNA pozitif kadınlarda 4 kata kadar risk artışı saptamışlardır. OK kullanımına 20 yaşından önce başlayanlarda risk ayrıca artmaktadır (74).

## **2.2 Servikal Mukus**

### **2.2.1 Servikal Mukusun Yapısı**

Servikal mukus menstrüel siklus boyunca üretilmektedir. Kadın reproduktif sisteminin yüzeyini çevreleyen bu mukusun, reproduktif sistemin fonksiyonu ve savunmasında önemi vardır. Primer olarak endoservikal epitelden salgılanan mukus jeli, sperme ve endometrium içine penetre olabilecek patojenlere bariyer ve vajinal ve servikal epitel için koruyucu bir tabaka oluşturur (75, 76). Servikal mukus yapısında, su (%90 – 98), organik komponentler (aminoasitler, kolesterol, lipidler, glukoz, askorbik asit, polisakkaritler) ve inorganik iyonlar gibi düşük moleküler ağırlıklı komponentler ve ayrıca enzimler gibi yüksek moleküler ağırlıklı komponentler, bakterisidal proteinler (sekretuar IgA, laktoferrinler), plazma proteinleri ve mukoproteinler bulunur (77, 78).

### **2.2.2 Steroidlerin Servikal Mukus üzerindeki Etkileri**

Progesteronlar, sperm penetrasyonunu ve sonrasında uterus içine migrasyonunu engellemek için servikal mukusu değiştirirler. Servikal mukus niteliği, yaymadaki

dallanma karakteristikleri, *spinbarkeit* testi ve viskozite ile değerlendirilir. Menstrüel siklusun çoğu döneminde servikal mukus kalın ve visközdür, ovulasyon sürecinde incelik ve sıvılaşır. OK kullanımı boyunca, servikal mukusun dallanma paterni, miktarı, viskozitesi ve *spinbarkeit*, OK kullanılmayan bir siklusun preovulatuvar fazına benzer, progesterin etkisiyle her zaman kalın ve yüksek oranda visküz olur (5, 6). Bu etki, böyle mukus yapısının, penetrasyonu engelleyebileceği gibi, diğer patojen ve karsinojenlerin uzaklaştırılmasını da engelleyebileceği fikrini akla getirmektedir.

Kombine oral kontraseptif kullanan kadınlarda servikal mukus yetersiz, kalın ve yüksek oranda visküz olmaktadır. Bu değişim sperm penetrasyonunu engelleyerek kontrasepsiyona katkıda bulunur (79).

## 2.3 Mukoproteinler

### 2.3.1 Mukoproteinlerin fonksiyonları ve Çeşitleri

Mukus jelinin majör yapısal komponentleri; büyük oranda o-linked karbonhidratlardan oluşan ve yüksek miktarda glikozile proteinlerden ibaret mukoproteinlerdir (7). Protein omurgaları, serin ve treonin aminoasit rezidülerinden zengin, sekansı ve uzunluğu herbir mukoproteine özgü değişen sayılarda ardışık yineleyici bölgelerden oluşur (7, 80-82). Mukoproteinlerin, normal fizyolojik şartlarda epitelyal dokuları koruduğu bilinmektedir. Bunun yanında, büyüme, fetal gelişim, epitelyal yenilenme ve farklılaşma, epitelyal bütünlük, hatta karsinogenez ve metastazda etkili oldukları düşünülmektedir (81). Mukoprotein gen ekspresyonu nispeten doku tipine spesifik olup, pH, oksijenasyon ve iyonik konsantrasyon açısından sürekli dalgalanma halinde olan, mikroorganizmalara, toksinlere, proteaz ve lipazlara maruz kalan, genellikle dış çevre ile temas halinde olan epitelyal dokulardan sekrete edilirler (82, 83). Genel yapıları ve biyokimyasal bileşimleri, hücre yüzeyi için protektif etkili olup, spesifik moleküler yapıları hücre yüzeyi etrafındaki lokal mikroçevreyi düzenler. Buna ek olarak, mukoproteinler, ayrıca hücreler arası sinyal yolu ile dış çevre – epitel hücresi iletişimini sağlarlar (81, 82).

Günümüzde, 20 çeşit mukoprotein tanımlanmıştır. Mukoproteinler, genel olarak sekrete edilen mukoproteinler ve membran ilişkili mukoproteinler olmak üzere iki

kategoriye ayrılır. Sekrete edilen mukoproteinler de jel oluşturan ve jel oluşturmeyan şekilde iki gruba ayrılır (82). Mukoproteinler ve grupları tablo 4’te özetlenmiştir.

**Tablo 4:** Mukoproteinlerin Sınıflandırılması

Sekrete Edilen Mukoproteinler		Membran İlişkili Mukoproteinler
Jel Oluşturanlar	Jel Oluşturmeyanlar	MUC 1
MUC 2	MUC 7	MUC 3
MUC 5AC	MUC 8	MUC 4
MUC 5B	MUC 11	MUC 9
MUC 6		MUC 10
		MUC 12
		MUC 13
		MUC 16
		MUC 17
		MUC 18
		MUC 20

### 2.3.2 Servikal Mukoproteinler

Endoservikal epitelden salınan mukoproteinler ve sınıflandırmaları şu şekildedir (7, 76):

1- *Sekrete Edilen Mukoproteinler:* MUC 2, 5AC, 5B, 6 (Jel Oluşturucu)

2- *Membran İlişkili Mukoproteinler:* MUC 1, 4

Normal dokularda, mukoproteinler nispeten organ ve hücreye spesifik bir şekilde eksprese edilirler. Bazı mukoproteinler, birçok farklı dokuda izlenebilirken, bazıları daha sınırlı ekspresyon paterni gösterir (80). Örneğin, Endoservikal dokudaki mukoproteinlerden MUC 1’in bu doku dışında, genital sistemde tuba uterina, ektoserviks ve vajen epitellerinde (7), genital sistem dışında meme, sindirim sistemi ve solunum sistemi de dahil olmak üzere bu sistemlerdeki epitelyal hücrelerin apikal yüzeylerinde eksprese edildiği gösterilmiştir (80). MUC 2 ve MUC 5AC mukoproteinleri ise daha kısıtlı

bir dağılım göstermektedir (80). MUC 2'nin spesifik olarak en fazla ince barsak ve kolondaki goblet hücrelerinde (80), zayıf olarak da endoservikal dokuda (7), MUC 5AC mukoproteininin ise mide, solunum sistemi (80) ve endoservikte (7) eksprese edildikleri gösterilmiştir. MUC 4 ilk defa bronşiyal mukusta saptanmış, ayrıca akciğer ve pankreas kanserlerinde bu dokularda ekspresyonları gözlenmiştir (81). Yine bu mukoprotein ölçülebilir düzeylerine ektoserviks, vajen ve konjonktivada da rastlanmıştır (76). MUC 6 mukoproteininin ise endoserviks (7) dışında ovarian kist mukusunda da (84) ekspresyonu tanımlanmıştır.

Üreme sürecini kolaylaştırmak için, midsiklusta endoserviksten salgılanan mukusun fiziksel yapısı ve miktarı dramatik olarak değişir. Bu önemli fizyolojik hadiseye, endoservikal epitelde eksprese edilen mukoproteinler katkıda bulunur (7).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu klinik-laboratuvar çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiş (Proje kodu: 2008.114.002.8) ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından planlanıp, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın katkılarıyla yapılmıştır.

#### 3.1. Bireyler

22.09.2008 tarih 2008/39 sayılı KTÜ Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulunun onayı ile Ekim 2008 - Kasım 2009 arasında, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine kontrasepsiyon amacı ile başvurup, OK kullanımı için uygun ve istekli olan 20 üreme çağındaki kadın araştırma kapsamına alındı.

#### 3.2. Olgu Seçimi

Araştırma süresi olan 13 aylık süre içinde, kliniğimiz kadın hastalıkları ve doğum polikliniğine kontrasepsiyon amaçlı başvuran 320 hastadan oral kontraseptif kullanımı reçete edilen 88 olgu araştırma onam formu imzalatıldıktan ve araştırmaya katılmak için gönüllü oldukları tesbit edildikten sonra araştırmaya kabul edilme ve edilmeme kriterleri açısından değerlendirildi.

Araştırmaya kabul edilme kriterleri: (a) Araştırmaya katılma için onam verip formu imzalamak; (b) 18-35 yaş arasında ve üreme çağında olmak; (c) Gebelik veya laktasyon dönemi dışında olmak; (d) Herhangi bir sistemik hastalığa (DM, HT, hiperlipidemi, iskemik / kalp hastalığı, derin ven trombozu, vasküler hastalık, serebrovasküler olay, karaciğer hastalığı) sahip olmamak; (e) Sigara kullanmamak; (f) OK kullanımı açısından istekli, ilaç kullanımı açısından uyumlu olmak; (g) Araştırma süresinde ve 2 ay öncesinde

herhangi bir ilaç kullanmamak; h) Normal pelvik muayene bulgularına sahip olmak, düzenli adet görmek; ı) Servikal sitolojide anormal bulguya sahip olmamak; i) Rutin kan biyokimyasında normal karaciğer, böbrek fonksiyon testlerine sahip olmak; j) Herhangi bir kanser tanısı almamış olmak olarak belirlenmiştir.

Araştırmaya kabul edilmeme kriterleri: (a) DM, HT, hiperlipidemi, iskemik / kalp hastalığı, derin ven trombozu, vasküler hastalık, serebrovasküler olay, karaciğer hastalığı veya bilinen herhangi bir sistemik hastalık varlığı (n=16); (b) 35 yaş üzeri olgu (n=24); (c) Sigara kullanma (n=8); (d) Anormal servikal sitoloji varlığı (n=6); (e) Anormal pelvik muayene bulguları (n=3); (f) Araştırmaya katılım için istekli olmama (n=11) olarak belirlenmiştir.

Araştırmaya dahil edilme kriterlerini sağlayan olgular bu kontrollü klinik-laboratuvar araştırma kapsamında değerlendirildi.

Her olgudan, oral kontraseptif kullanımı için ön değerlendirme yapıldı; pelvik muayenede adet dönemi bittikten hemen sonra (10.gün) mukus aspiratörü yardımı ile 0.5 - 1 ml servikal mukus örneği alındı ve alınan bu materyaller steril tüpe kondu. Alınan mukus örnekleri Mikrobiyoloji Anabilim dalı bünyesinde bulunan medikal buzdolabında - 80 °C'de dondurularak saklandı. Daha sonra tüm olgulara temin edilen kombine oral kontraseptif preparatından 3 kutu verildi.

### **3.3. Oral kontraseptif preparatı kullanımı**

Tüm olgulara 3 ay Etinil Estradiol 0,03 mg + Drospirenon 3 mg içeren oral kontraseptif preparatından (Yasmin® film tablet, Schering-Bayer Farma, İstanbul, Türkiye) 3 kutu verilerek kullanım şemasına uygun olarak (Adetin 3. günü başlayarak 21 gün, ilaç kesildikten sonra adet kanaması olunca 2. adetin 3. gününde tekrar başlanarak 21 gün devam şeklinde) kullanması önerildi. İki ayın sonunda yani iki kutu bitip üçüncü kutuya başladığı ayda adet dönemi bitiminde (10.günde) tekrar servikal mukus örneği alınması için başvurusu önerildi.

2 ay ilaç kullanımını takiben yapılan pelvik muayenede adet dönemi bittikten hemen sonra (10.gün) mukus aspiratörü yardımı ile tekrar 0.5 - 1 ml servikal mukus örneği alınıp, alınan örnek steril tüpe kondu. Alınan ikinci mukus örnekleri de Mikrobiyoloji Anabilim dalı bünyesinde bulunan medikal buzdolabında -80 °C'de dondurularak saklandı.



Araştırma kapsamındaki tüm olguların değerlendirilmesi, muayenesi, servikal mukus örneği alınması aynı araştırmacı tarafından yapılmıştır.

### 3.4. Servikal mukusta mukoprotein içeriğinin ölçülmesi

Tüm mukus örnekleri (40 adet) toplandıktan sonra uygun şartlarda çözüldü ve servikal mukus örneklerinde elde edilen ticari ELISA kitleri yardımı ile MUC1 (Human Mucin 1, MUC1 ELISA Kit, Katalog numarası E0413h, USCNLIFE™, China), MUC2 (Human Mucin 2, MUC2 ELISA Kit, Katalog numarası E0705h, USCNLIFE™, China), MUC5B (Human Mucin-5 subtype B, MUC5B ELISA Kit, Katalog numarası E0684h, USCNLIFE™, China) ve MUC5AC (Human Mucin-5 subtype AC, MUC5AC ELISA Kit, Katalog numarası E0756h, USCNLIFE™, China) düzeyleri ölçüldü. Ölçüm tekniği prensibi aşağıda verilmiştir.

#### 3.4.1 Servikal mukoprotein ölçüm prensibi

Her bir mukoprotein için özel ELISA kit sistemi ve elemanları yardımı ile servikal mukus içindeki mukoprotein içeriği ng/ml cinsinden ölçüldü. ELISA kit sistemindeki elemanlar tablo 5’de verilmiştir.

**Tablo 5 : ELİSA kit sistemi elemanları**

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar</b>
Deney Levhası	1
Standard	2
Örnek seyreltici	1 x 20 ml
Deney Seyrelticisi A	1 x 10 ml
Deney Seyrelticisi B	1 x 10 ml
Tespit Ayracı A	1 x 120µl
Tespit Ayracı B	1 x 120µl
Yıkama Tamponu (25 x konsantre)	1 x 30ml
Sübrat	1 x 10ml
Stop Solüsyonu	1 x 10ml
96 kuyucuk için levha kapayıcısı	5 Adet
Kullanım kılavuzu	1 adet

Bu kitler ile birlikte verilen her bir mikrotitrasyon levhası, Mukoprotein (MUC 1, 2, 5B, 5AC) spesifik bir antikorla önceden kaplanmıştı. Standard veya örnekler, mukoprotein tipi için spesifik bir biotin konjüge poliklonal antikor preparatı ile birlikte uygun mikrotitrasyon levha kuyucuklarına eklendi. Daha sonra Avidin-konjüge Horseradish Peroksidaz (HRP) her levha kuyucuğuna eklendi ve inkübe edildi. Ardından her kuyucuğa bir TMB sübstrat solüsyonu eklendi. İçinde sadece spesifik mukoprotein tipi, biotin konjüge antikor ve Avidin konjüge enzim içeren kuyucuklar renk değişikliği gösterdi. Enzim-sübstrat reaksiyonu, bir sülfürik asit solüsyonu eklenmesiyle sınırlandı ve renk değişimi spektrofotometrik olarak 450 nm dalgaboyunda ölçüldü. Herbir örnek için her mukoprotein tipine spesifik olarak ölçüm yapıldı. Örneklerdeki MUC 1, 2, 5B, 5AC konsantrasyonları, daha sonra örneklerin optik dansitelerinin standard eğri ile karşılaştırılmasıyla belirlendi.

### 3.4.2 Reaktiflerin hazırlanması ve deney prosedürü

Tüm reaktifler, kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.

**Yıkama tamponu:** Konsantre içinde kristaller oluşmuşsa, konsantre oda sıcaklığına getirilip kristaller eriyinceye kadar nazikçe çalkalandı. 30 ml'lik yıkama tamponu konsantresi, 750 ml'lik yıkama tamponu hazırlanacak şekilde deiyonize veya distile su ile dilüe edildi.

**Standard:** 1 ml'lik örnek seyrelticiyle standard oluşturuldu. Bu oluşum, 20 ng/ml'lik bir ana solüsyon yarattı. Seri dilüsyonlar yapmadan önce, standard hafif çalkalanarak 10 dakika kadar bekletildi Dilüe edilmemiş standard, en yüksek standardı oluştururken (20 ng/ml) örnek seyreltici ise sıfır standardı yerine geçti (0 ng/ml).

**Tespit Reaktifleri (Ayrıçaları) A ve B:** Sırasıyla, deney seyreltici A ve B kullanılarak ayrıçalar çalışma konsantrasyonlarına (1:100) seyreltildi.

**Deney Prosedürü:** Tüm reaktiflerin oda sıcaklığına ulaşması beklendikten sonra. bütün reaktifler, pipetlemeden önce iyice karıştırıldı, köpürtmeden kaçınıldı. 1 deney için uygun strip sayısı belirlenerek, ekstra stripler mikrotitrasyon levhasından kaldırıldı. Kaldırılan stripler kapatıldı ve kitlerin son kullanma tarihine kadar 4 derecede saklandı.

Tüm reaktifler, çalışma standartları ve örnekler daha önceki bölümlerde anlatıldığı gibi hazırlandı. Deney aşamaları (Şekil 1);

1. Her kuyucuğa Standard veya örnekten 100 µl eklendi. Üzeri kapatılıp 37°C’de 2 saat inkübe edildi.

2. Her kuyucuktaki sıvı yıkanmadan kaldırıldı.

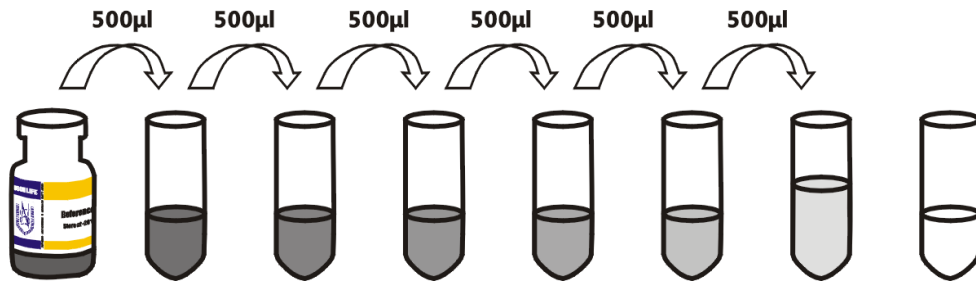
3. Her kuyucuğa 100 µl Tespit Solüsyonu A çalışma solüsyonundan eklendi. Üzeri kapatılıp, 37°C’de 1 saat inkübe edildi. Tespit Solüsyonu A çalışma solüsyonu bulanık olduğu durumda, oda sıcaklığına getirilerek solüsyon üniform görünene kadar hafifçe karıştırıldı.

4. Her kuyucuk aspire edildi ve yıkandı, bu işlem toplamda 3 kere yıkamak suretiyle 3 defa tekrar edildi. Enjektör, çok-kanallı pipet veya otomatik yıkayıcı kullanılarak, yıkama tamponu ile (yaklaşık 400 µl ) her kuyucuk doldurularak yıkandı. Son yıkamanın ardından, geride kalan yıkama tamponu da aspire edildi. Levha ters çevrilip kağıt havlu ile kurutuldu.

5. Her kuyucuğa 100 µl Tespit Solüsyonu B çalışma solüsyonundan eklenip kuyucukların üzeri kapatıldı, 37°C’de 1 saat inkübe edildi.

6. 4. Basamakta anlatılan aspirasyon yıkama süreci 5 kez tekrar edilip en son olarak renk değişimi spektrofotometrik olarak 450 nm dalgaboyunda ölçüldü ve standart eğrilere uygun olarak ng/ml cinsinden ölçüm yapıldı.

#### *Ana Standard*



**Şekil 1 : Deney prosedürü**

### **3.5. Diğer Bilgiler**

**Araştırma Bölgesi:** Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Trabzon, Türkiye.

**Araştırma Tipi:** Prospektif kohort çalışma.

**Araştırma grubu:** 01 Ekim 2008- 30 Ekim 2009 arasında, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Polikliniğine kontrasepsiyon isteği (OK kullanımı isteği) nedeni ile başvuran tüm olgular.

**Araştırma grubu büyüklüğü:** Kontrasepsiyon amacı ile kombine oral kontraseptif kullanan toplam 20 olgu.

**Bağımlı-bağımsız değişken:** Bağımlı değişken MUC 1, 2, 5B, 5AC düzeyleri. Bağımsız değişkenler: kadın yaşı, gravida, parite, vucüt kitle indeksi.

**Veri kaynakları:** Anket, pelvik muayene değerlendirmesi, laboratuvar sonuçları.

**Araştırma süresi:** 13 ay (01 Ekim 2008- 01 Kasım 2009)

**İstatistiksel yöntemler:** Tüm veriler SPSS 10.0 paket programına kodlanarak girildi. Paired sample Student-t test, One-way ANOVA ile bilgisayar ortamında istatistiksel analiz yapıldı. Olguların ilaç öncesi ve sonrası mukoprotein verileri birbiri ile karşılaştırıldı. *P* değeri <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Araştırma grubunun bazı demografik ve klinik faktörlerine göre dağılımı tablo 6'da verilmiştir.

#### 4. BULGULAR

Kliniğimize kontrasepsiyon amaçlı başvuran olgularda oral kontraseptif kullanımı açısından istekli olan olguların oranı %27.5 olarak bulunmuştur. Araştırma grubuna ait genel klinik özellikler Tablo 6'da verilmiştir.

**Tablo 6:** Araştırma grubuna ait genel klinik özellikler (Ortalamalar  $\pm$  standart sapma parantez içinde minimum ve maksimum değerleri veya olgu sayısı ve parantez içinde yüzdeler olarak verilmiştir.)

Toplam olgu sayısı	<b>20</b>
Ortalama yaş (yıl)	<b>30.95 <math>\pm</math> 4.43 (20-35)</b>
Ortalama evlilik yaşı (yıl)	<b>19.85 <math>\pm</math> 2.62 (16-25)</b>
Ortalama vücut kitle indeksi (kg/m <sup>2</sup> )	<b>23.76 <math>\pm</math> 3.34 (17-31)</b>
Ortalama gravida (no.)	<b>2.55 <math>\pm</math> 1.19 (0-5)</b>
Ortalama parite (no.)	<b>1.80 <math>\pm</math> 1.06 (0-4)</b>
Ortalama yaşayan (no.)	<b>1.70 <math>\pm</math> 0.92 (0-3)</b>
Ortalama adet düzeni (gün)	<b>26.65 <math>\pm</math> 3.73 (21-34)</b>
Daha önce başka doğum kontrol yöntemi kullanma öyküsü (%)	
Yok	<b>10 (%50)</b>
Var (Oral kontraseptif kullanımı)	<b>5 (%25)</b>
Var (Rahim için araç kullanımı)	<b>5 (%25)</b>
Meslek (%)	
Ev hanımı	<b>19 (%95)</b>
Serbest meslek	<b>1 (%5)</b>

Oral kontraseptif kullanımı için uygun olan olgularda ortalama kadın yaşı 30.95  $\pm$  4.43 (20-35), adet düzeni 26.65  $\pm$  3.73 (21-34) olarak bulunmuştur. Olguların sadece %25'i daha önce oral kontraseptif kullanmış olup olguların %95'i ev hanımı idi.

Araştırma grubunda oral kontraseptif kullanımı öncesi ve sonrasında siklusun foliküler fazında MUC 1, 2, 5B ve 5AC düzeyi ortalama değerleri Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 7:** Araştırma grubunda oral kontraseptif kullanımı öncesi ve sonrasında siklusun foliküler fazında MUC 1, 2, 5B ve 5AC düzeyi ortalama değerleri (Ortalamalar  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.)

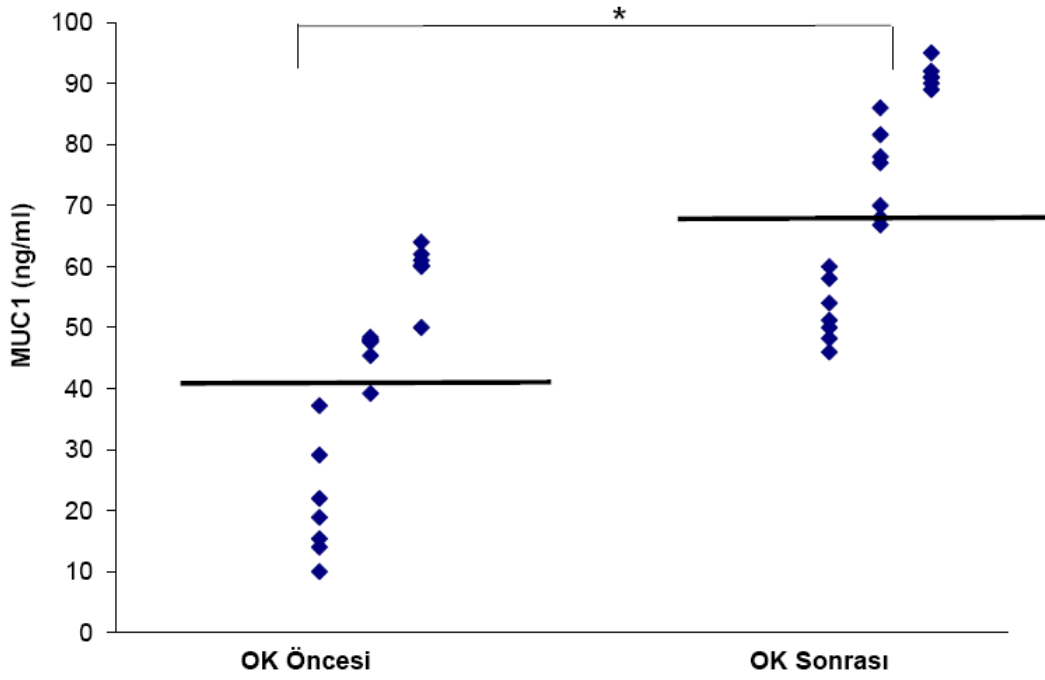
<b>Servikal mukoprotein</b>	<b>OC öncesi*</b>	<b>OC sonrası**</b>
	<b>(n=20)</b>	<b>(n=20)</b>
MUC 1 (ng/ml)	<b>41.41 <math>\pm</math> 1.76</b>	<b>72.14 <math>\pm</math> 16.99</b>
MUC 2 (ng/ml)	<b>37.94 <math>\pm</math> 24.46</b>	<b>92.30 <math>\pm</math> 25.32</b>
MUC 5B (ng/ml)	<b>42.90 <math>\pm</math> 21.14</b>	<b>95.91 <math>\pm</math> 26.98</b>
MUC 5AC (ng/ml)	<b>89.68 <math>\pm</math> 38.81</b>	<b>110.45 <math>\pm</math> 47.73</b>

\* $p < 0.001$ , One-way ANOVA; OK öncesi mukoprotein düzeyleri karşılaştırılması.

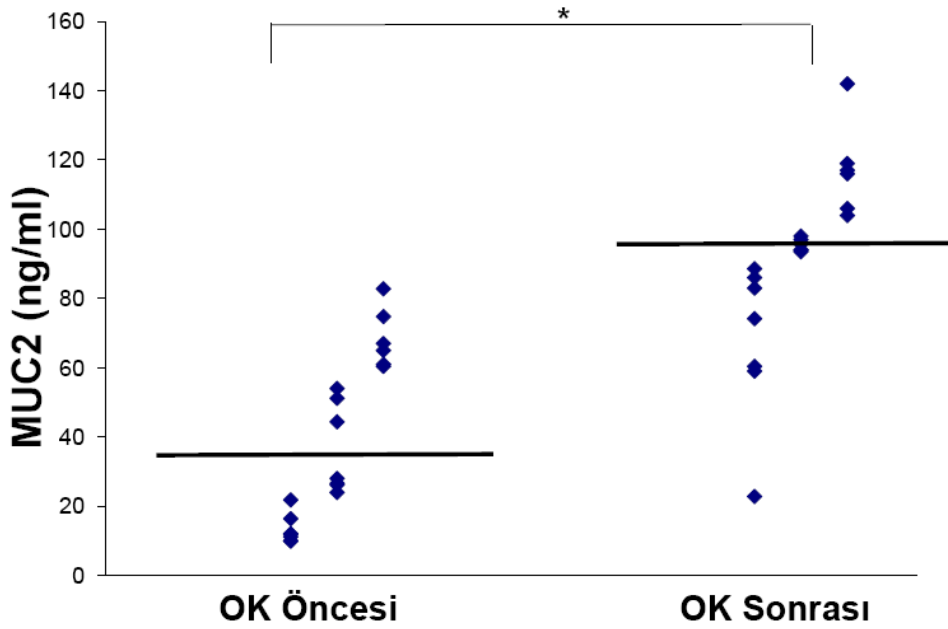
\*\* $p = 0.003$ , One-way ANOVA; OK sonrası mukoprotein düzeyleri karşılaştırılması.

Tablo 4’te verildiği üzere her dört mukoprotein ortalama düzeyleri 2 aylık oral kontraseptif kullanımını takiben artış göstermektedir. Servikal mukusta MUC 2 düzeyi OK kullanım öncesi  $37.94 \pm 24.46$  ng/ml düzeyinde iken, OK kullanım sonrasında  $92.30 \pm 25.32$  ng/ml düzeyine çıkmıştır. Araştırma grubunda oral kontraseptif kullanım öncesi ve sonrasında servikal mukusta MUC 1 (grafik 1), MUC 2 (grafik 2), MUC 5B (grafik 3) ve MUC 5AC (grafik 4) değişiminin dağılım grafikleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

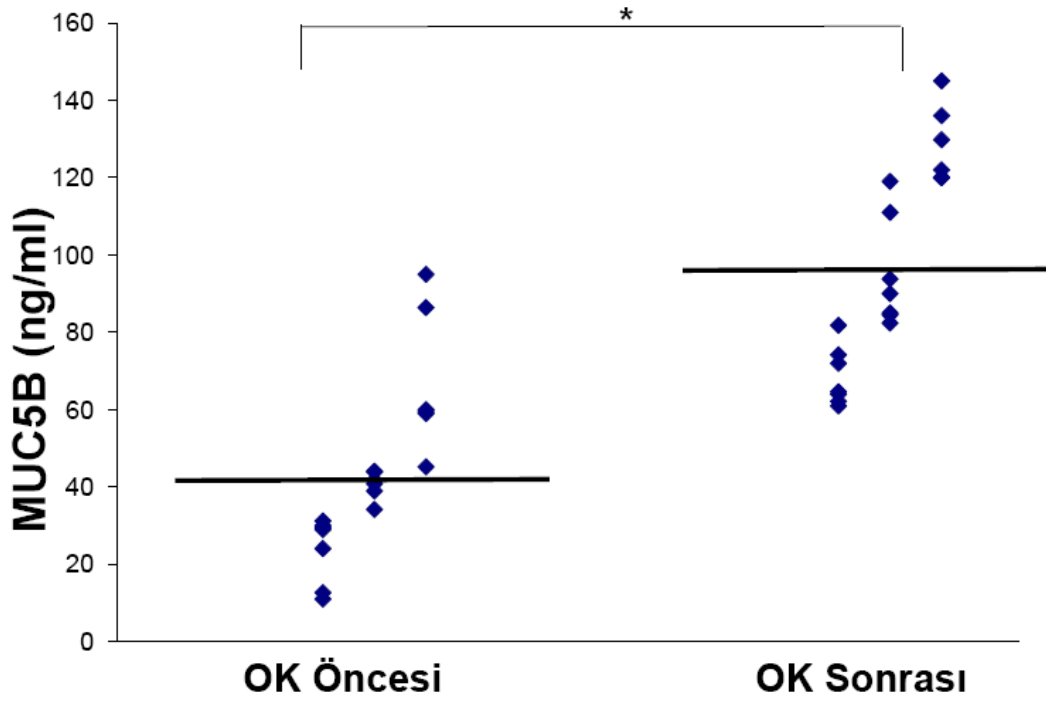
OK öncesi normal menstrual siklusun foliküler fazında ve OK sonrası oluşan menstrual siklusda servikal mukusta en çok bulunan mukoprotein MUC 5AC olarak bulunmuştur.



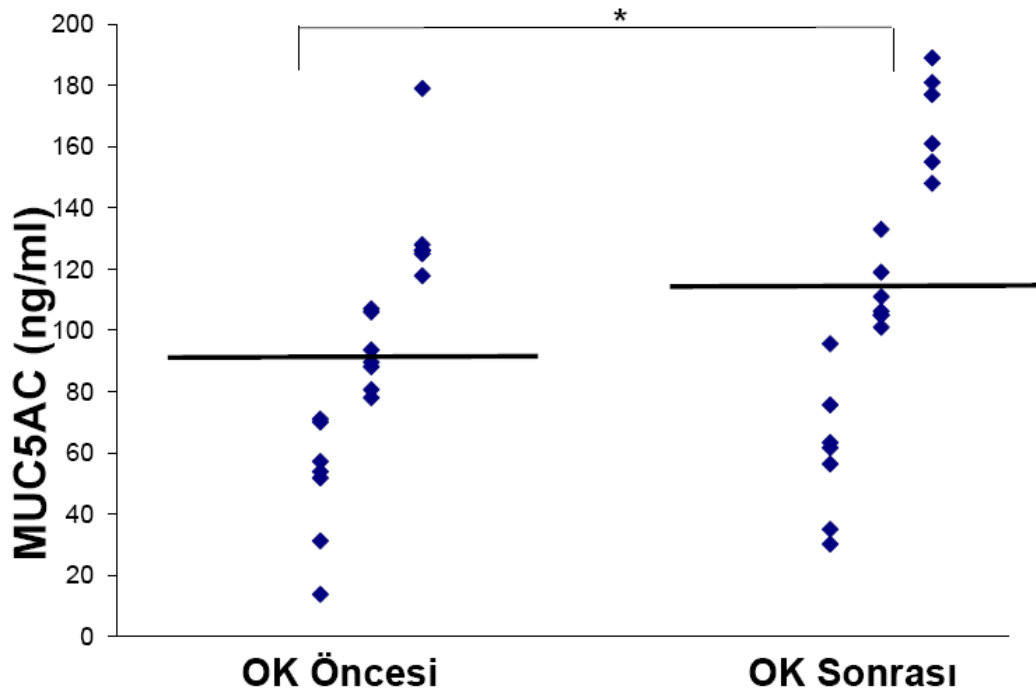
**Grafik 1** : Araştırma grubunda oral kontraseptif kullanım öncesi ve sonrasında servikal mukusta MUC 1 dağılımı (\* $p < 0.001$ , paired sample t-test).



**Grafik 2** : Araştırma grubunda oral kontraseptif kullanım öncesi ve sonrasında servikal mukusta MUC 2 dağılımı (\* $p < 0.001$ , paired sample t-test).



**Grafik 3** : Araştırma grubunda oral kontraseptif kullanım öncesi ve sonrasında servikal mukusta MUC 5B dağılımı (\* $p < 0.001$ , paired sample t-test).



**Grafik 4** : Araştırma grubunda oral kontraseptif kullanım öncesi ve sonrasında servikal mukusta MUC5AC dağılımı (\* $p = 0.055$ , paired sample t-test).



Araştırma grubunda oral kontraseptif kullanımı öncesi ve sonrasında siklusun foliküler fazında MUC 1, 2, 5B ve 5AC düzeyi değişimleri ile ilgili veriler ve istatistiksel analiz verileri Tablo 8’de verilmiştir.

**Tablo 8:** Araştırma grubunda oral kontraseptif kullanımı öncesi ve sonrasında siklusun foliküler fazında MUC 1, 2, 5B ve 5AC düzeyi değişimleri ile ilgili veriler ve istatistiksel analiz verileri (Ortalamalar  $\pm$  standart sapma değişimi olarak verilmiştir.)

Servikal mukoprotein	*OC öncesine göre değişim (n=20)	%95 Güven aralığı	p
MUC1 (ng/ml)	+30.73 $\pm$ 24.44	19.29 - 42.17	<0.001
MUC2 (ng/ml)	+54.36 $\pm$ 31.88	39.44 - 69.29	<0.001
MUC5B (ng/ml)	+53.01 $\pm$ 33.68	37.25 - 68.78	<0.001
MUC5AC (ng/ml)	+20.76 $\pm$ 45.39	-0.48 - 42.01	0.055

Karşılaştırma için paired sample t test kullanılmıştır.

\*p=0.005, One-way ANOVA; OK öncesine göre mukoprotein düzeylerinin karşılaştırılması.

İki aylık oral kontraseptif kullanımını takiben servikal mukustaki mukoprotein 1, 2, ve 5B düzeyleri anlamlı olarak artış göstermiştir. Oral kontraseptif öncesi düzeyine göre servikal mukustaki mukoprotein 2 düzeyi +54.36  $\pm$  31.88 ng/ml artış göstermiştir. OK kullanımı ile servikal mukusta kantitatif olarak düzeyi en çok değişen iki mukoprotein MUC2 ve MUC5B’dir.

İki aylık oral kontraseptif kullanımını takiben hiçbir olguda oral kontraseptif kullanımına bağlı yan etki saptanmamıştır.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda polikliniğimize kontrasepsiyon amaçlı başvuran ve oral kontraseptif başlanması düşünülen üreme çağındaki (18 – 35 yaş) 20 kadından ilaç kullanımı öncesi folliküler fazda (adetin 10. Günü) servikal mukus örneği alınmış, 2 ay oral kontraseptif kullanımını takiben yine siklusun aynı döneminde tekrar mukus örneği alınmıştır. Servikal mukus örnekleri, örneklerin toplanması bittikten sonra spesifik antikolar aracılığıyla ELİSA (Enzyme linked immunosorbent assay) yöntemiyle MUC1, MUC2, MUC5AC ve MUC5B düzeyleri açısından değerlendirilmiştir. Oral kontraseptif öncesinde alınan mukus örnekleri, oral kontraseptif sonrasında alınanlarla mukoprotein düzeyleri açısından karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda, oral kontraseptif kullanımı sonrasında, çalışılan tüm mukoprotein düzeylerinde artış kaydedilmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı artışlardan biri de jel oluşturucu mukoproteinlerden biri olan MUC2 düzeylerinde saptanmıştır.

OK kullananlarda Serviks Kanseri'ndeki risk artışının mekanizması uzun süredir tartışmalı olup, henüz kesin bir mekanizmaya ulaşamamıştır. HPV'nin Serviks Kanseri'nin major sebebi olarak tanımlanması, potansiyel kanser nedeni olan yaklaşık 14 tip HPV gösterilmiş olması ve dünya çapında servikal kanserli hastaların biopsi spesmenlerinin %99'unda HPV'lerin saptanması nedeniyle, en popüler mekanizma; OK'lerle HPV arasındaki ilişkiyi gösteren mekanizmadır (3). Bununla birlikte, HPV'li her kadında Serviks Kanseri gelişmemektedir (3).

Mekanizmalardan biri Steroid kontrasepsiyonu olarak varsayılmakta ve HPV aracılığıyla servikal dokudaki tümörojenik etkinin arttığı varsayılmaktadır. Servikal dokudaki hormon reseptörlerinin keşfinden sonra hormonların rolü üzerinde daha fazla durulmuştur. Steroidlerin, HPV DNA'sının transkripsiyonel regülatuar bölgelerindeki spesifik DNA sekanslarına bağlanarak, değişik genlerin transkripsiyonunu arttırdığı veya suprese ettiği düşünülmektedir. HPV tip 16 viral genomunun regülatuar bölgesi HPV genomunun transkripsiyonel kontrolünden sorumlu olup, bu bölgenin steroid hormonlarca aktive edilen gelişmiş unsurlara sahip olduğu düşünülmektedir. Steroid hormonların, HPV DNA'sında spesifik glukokortikoid yanıt elemanlarına bağlandıkları gösterilmiştir. Deneysel kanıtlar, human keratin-14 promoter mevcudiyetinde yavaş salınımlı 17 β-östradiol ilaçları verilen transgenik sıçanlarda yüksek riskli HPV Tip 16'nın vajinal ve

servikal sküamoz hücreli kanser gelişimini stimüle ettiğini göstermiştir. HPV Tip 16'nın E6 onkoproteininin p53 tümör supresör genine bağlanarak bu onkoprotein bozulmasını stimüle ettiği gösterilmiştir. Steroid hormonların, p53 gen ürününe bağlanıp, onu bozan ve bu nedenle apoptotik bozukluk ve karsinogeneze neden olan E6 ve E7 HPV onkoproteinlerinin ekspresyonlarını arttırdıkları düşünülmektedir (4). Bu bulgular göz önüne alındığında, servikal kanser gelişiminde lokal faktörlerin rolünden şüphelenmek mantıklı gözükmektedir.

Uzun süreli Oral kontraseptif kullanımı ile servikal kanser ve öncül lezyonlar riskindeki artış bilinmekte olup bunun mekanizması tam olarak bilinmemektedir (2, 3, 73, 74). Servikal mukusun majör yapısal komponentleri mukoproteinler olup (7), bu mukoproteinlerin servikal mukustaki içeriği, normal menstrüel siklus boyunca da değişiklikler gösterebilmektedir (7, 85). Servikal mukusun menstruasyon periyodunun belli dönemlerindeki miktar ve kalınlığındaki değişimlerinin mukoprotein içeriğindeki bu değişimlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Kombine oral kontraseptif kullanan kadınlarda servikal mukus azalmakta, vizkozitesi ve kalınlığı artmaktadır (5, 79). Mukus yapısındaki, dolayısıyla mukoprotein içeriğindeki bu değişimin, penetrasyonu engelleyebileceği gibi, karsinojen ve patojenlerin uzaklaştırılmasını da engelleyebileceği fikri akla gelmektedir. Bu da kombine oral kontraseptif kullanıcılarındaki servikal kanser patogenezinin mekanizmalarından biri olabilir. Fakat, OK kullanıcılarındaki servikal kanser gelişiminin patofizyolojisinde servikal mukus ve mukoprotein değişikliklerinin rolü iyi açıklanmamıştır.

Literatürde servikal mukoproteinler üzerine yapılmış çalışmalar mevcuttur. Ayrıca oral kontraseptif kullanımı ve Serviks Kanseri ilişkisini irdeleyen inceleme ve yayınlar da bulunmaktadır. Fakat oral kontraseptif kullanımıyla servikal mukoprotein düzeylerindeki değişiminin değerlendirildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak bu konu ile ilgili hipotez daha önce Guven S ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (8).

Servikal mukustaki mukoprotein içeriğinin siklusun farklı dönemlerindeki değişimlerinin araştırıldığı bir çalışmada Gipson ve arkadaşları (76), mukoproteinlerin servikal mukustaki göreceli değişim düzeylerini belirlemişlerdir. Bu çalışmada MUC4, MUC5AC, MUC5B ve MUC6 değişim düzeyleri değerlendirilmiştir. Çalışmalarında 6 kadından toplam 21 servikal mukus örneği alınmış olup, siklusun her haftası temsil edilmiştir. Buna göre, MUC4 ve MUC5B mesaj düzeyleri servikal mukusta, diğer

mukoproteinlerle kıyaslandığında siklus dönemine bakılmaksızın göreceli olarak daha baskın saptanmışlardır. Jel oluşturucu mukoproteinlerden MUC2 ise örneklerin yalnızca 2'sinde zayıf değişim düzeyleriyle temsil edilmiştir. Bu çalışmada ise aynı hastaların servikal mukusları oral kontraseptif kullanımının öncesinde ve sonrasında 4 mukoprotein açısından değerlendirilmiştir. MUC4 bu çalışmaya dahil edilmemiş olmakla birlikte, gerek oral kontraseptif kullanımı öncesinde, gerek ise sonrasında bu çalışmada servikal mukusta baskın olan mukoprotein jel oluşturucu mukoproteinlerden MUC5AC olduğu görülmüştür. Fakat bu tez çalışmasında mRNA düzeyleri değil, mukoproteinlerin mililitredeki kantitatif miktarları ölçülmüş olup örneklerde sadece siklusun foliküler fazı temsil edilmiştir. MUC5AC'nin ardından, servikal mukustaki miktarına göre sırasıyla MUC2, MUC5B ve MUC1 mukoproteinleri gelmektedir. Bu sıralama çalışmamda, oral kontraseptif kullanımı sonrası alınan mukus örneklerinde de değişmemiştir.

Yine Gipson ve arkadaşlarının (76) aynı çalışmasında, eş zamanlı kan östrojen ve progesteron düzeyleri ölçüldüğünde, servikal mukustaki MUC4 ve MUC5B mRNA düzeylerinin serum progesteron düzeyinin arttığı siklusun luteal fazında progesteron düzeyleri ile ters orantılı olarak azaldıkları gözlenmiştir. Serum östrojen düzeyleriyle herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Bu bulgu, servikal mukoproteinlerin hormonal regülasyonunu akla getirmektedir. Bu tez çalışmamda, oral kontraseptif kullanımı öncesinde alınan servikal mukus örnekleri, tüm kadınlardan siklusun 10. Günü alınmış olduğu için, siklusun farklı dönemlerindeki hormon cevabına muhtemel servikal mukoprotein değişimini çalışmamın verileri ışığında yorumlayamamaktayım. Fakat çalışmamın verilerine göre foliküler fazın ortalarında servikal mukusta hakim mukoprotein MUC5AC'dir. Bu sonuç da Gipson ve arkadaşlarının (76) verileriyle örtüşmemektedir.

Servikal mukus mukoprotein içeriğinin menstrüel siklusun farklı dönemlerinde değişiklik göstermesi, mukoproteinlerin servikal mukustaki fonksiyonlarını merak etmemize neden olmaktadır. Servikal mukoproteinler konusunda seri çalışmalar yapan Gipson ve arkadaşları diğer bir çalışmalarında servikal mukus kıvamının midsiklusta daha sulu ve ince olmasının servikal mukustaki mukoprotein içeriği ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (7). Bu çalışmalarında MUC5B ve MUC4 mRNA düzeylerinin midsiklus öncesi pik yaptığını tespit etmişlerdir. Takip eden çalışmalarında ise (85) midsiklusun tam ortasında ve siklusun erken ve geç dönemlerinde MUC5B mukoprotein miktarlarını bu kez kantitatif olarak ölçmüşler ve bu mukoprotein düzeyinin midsiklus ortasında pik yaptığını

saptamışlardır. Midsiklustaki bu pikin sonucu olarak MUC5B'nin, hidrofilik özelliği nedeniyle endoservikal kanalda sperm geçirgenliğini artırmak için su tutulumu yaparak viskoziteyi kendisinden beklenmeyecek şekilde azalttığı, aynı zamanda ikinci bir potansiyel rol olarak da, bu su tutulumu nedeniyle servikal kanala ulaşabilecek patojenlere bariyer teşkil edebileceği öne sürülmüştür. Bu düşünceden yola çıktığımızda, her ne kadar MUC5B, patojenlere tuzak oluşturarak endoserviks ve kavite içerisine lokalize olmalarını engelliyorsa da, bu patojenlerin hidrofilik jel yapılı bu ortamdan uzaklaştırılmayarak daha uzun süre serviks ile temas halinde olmalarına sebep olabilir. Bu etkileşimi karsinogenler açısından incelersek, karsinogenler ile daha uzun süre temasta olan serviksin, servikal karsinogenez açısından daha riskli olabileceğini öngörebiliriz. Bu nedenle MUC5B ve servikal HPV kolonizasyonu veya karsinogen ilişkisini doğrulayacak kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır

Menstrüel siklusun ikinci yarısındaki progesteron hâkimiyetine bağlı olarak servikal mukusun viskozitesinde artış olduğu bilinmektedir. Viskozitedeki bu artış sperm penetrasyonuna izin vermemektedir. Oral kontraseptif preparatlar da içeriğindeki progestinler nedeniyle servikal mukusta aynı etkiye neden olmakta, bu etki de kontrasepsiyona katkıda bulunmaktadır. Hangi mukoprotein kontentindeki değişimin servikal mukustaki bu etkiye yol açtığı bilinmemekle birlikte, çalışmamın bulgularıyla Gipson ve arkadaşlarının bulguları birleştirildiğinde anlamlı olabilecek sonuçlar ortaya atılabilir. Buna göre, çalışmamda, oral kontraseptif kullanımı sonrası alınan servikal mukus örneklerinde, öncesinde alınanlarla kıyaslandığında, mukoprotein kontenti açısından çalışılan 4 mukoprotein hepsinde artış gözlenmiş, bunlardan 3'ündeki (MUC1, 2, 5B) artış, istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır.. Gipson ve arkadaşlarının (76) bulgularına göre de servikal mukusun ince ve sulu olduğu midsiklusta MUC4 mRNA düzeyi ve MUC5B mukoproteininin kantitatif değerleri yüksek saptanmış, aynı değerler progesteron hakimiyetinin olduğu siklusun luteal fazında bu tez çalışmamın verileriyle uyumlu olmayarak düşüş göstermiştir. Her iki çalışmamın bulgularına göre yorum yaparsak, fakat MUC5B düzeyinin Gipson ve arkadaşlarının verilerine göre siklusun luteal fazında azaldığını kabul edersek, servikal mukusun kalınlaşmasında en fazla sorumlu olan mukoprotein MUC2 olması muhtemeldir. Her ne kadar, çalışmamın verilerine göre MUC5B düzeylerinde OK kullanımıyla anlamlı artış saptanmış olsa da, bu artış MUC2 düzeylerindeki artış kadar değildir ve bu artış servikal mukusun kalın ve visköz yapıya

dönüşmesinden sorumlu olmayabilir. Serviksteki spesifik mukoproteinlerin fonksiyonlarına ve menstrüel siklusun farklı dönemlerindeki kantitatif miktarlarına yönelik daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Servikal mukus, içeriğindeki mukoprotein kontentinin değişimine bağlı olarak menstrüel siklusun farklı dönemlerinde fizyolojik olarak vizkosite değiştirir (7, 76, 85). Bu değişim, kombine oral kontraseptifleri de içeren steroid hormonlarla iatrojenik olarak da gerçekleşebilir. OK kullanımı boyunca servikal mukus kalın ve visköz olur (5, 6). OK kullanımıyla, servikal mukusun yapısındaki gözlenen bu değişim, yine mukoprotein kontentindeki varyasyonla açıklanmaktadır (7). Bu nedenle, OK kullanıcılarındaki artmış preinvaziv ve invaziv servikal kanser riskinin (3, 70-73) sebebini servikal mukustaki mukoprotein içeriğindeki değişimi veya servikal mukoproteinler ve HPV ilişkisini aydınlatmaya çalışarak araştırmanın doğru bir yaklaşım olduğu kanısındam. Fakat, mukoprotein içeriğindeki değişim, servikal preinvaziv ve invaziv lezyonların oluşumuna katkıda bulunabileceği yani sebep zincirinin bir parçası olabileceği gibi, oluşan preinvaziv ve invaziv lezyonların sonucunda da servikal mukus mukoprotein içeriği değişebilir. Nitekim, bir epitel malign transformasyon geçirdiğinde, mukoprotein genleri de aberran ekspresyona uğrar ve bu da transformasyona uğramış epitelyumde mukoprotein beklenenden az üretimi ve/ya yapısal olarak farklı ve beklenmeyen bir mukoprotein üretimi ile sonuçlanır (85, 86). Mukoproteinlerin, hücre çoğalması, büyümesi, diferansiyasyonu ve apoptozisi gibi birtakım hücrel cevaplarda hücre yüzey reseptörü, sensör, sinyal iletici gibi rolleri gerçekleştirme yeteneklerinin olduğu düşünülmektedir (82). Bu şekilde düşünüldüğünde, aberran mukoprotein ekspresyonu, servikal kanserin oluşumu veya progresyonundan sorumlu diğer bir mekanizma olabilir. Literatürde servikal neoplastik lezyonların servikal mukoprotein içeriği ile ilişkilendirildiği birkaç adet yayın mevcuttur.

Baker ve arkadaşları (86), servikste benign ve neoplastik glandüler lezyonları olan 52 hastada MUC1, MUC2, MUC4 ve MUC5AC servikal mukoprotein düzeylerini değerlendirmişlerdir. 14 endoservikal kanser, 9 endometrial kanser, 8 adenokarsinoma insitu, 2 glandüler displazi, 10 mikroglandüler hiperplazi tanısı olan hasta ve endoserviksi normal olan 3 hasta çalışmalarına dahil edilmiştir. Çalışmalarının sonucunda, tüm benign endoservikal epitellerden MUC1, MUC4 ve MUC5AC eksprese edilirken, MUC2

ekspresyonu izlenmemiştir. Ayrıca, MUC4 ve MUC5AC ekspresyonunun benign endoservikal lezyonlarla karşılaştırıldığında, adenokarsinoma insitu lezyonlarında istatistiksel anlamda azaldığı izlenmiştir. Bu tez çalışmamda ise MUC2 dahil olmak üzere servikal mukusta çalışılan tüm mukoproteinler hem OK kullanımı öncesi, hem de OK kullanımı sonrasında mukusta saptanmakla birlikte, MUC5AC düzeyinin, çalışmamızda, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da OK kullanımı sonrasında arttığı izlenmiştir. MUC4 mukoproteini ise çalışmamda dahil edilmemiştir.

Baker ve arkadaşlarının (86) aynı çalışmasında MUC2 ekspresyonu, adenokarsinoma insitu, endoservikal adenokarsinom, ve endometrial adenokarsinom tanısı olan hastalarda, sırasıyla, % 25, % 40 ve % 22 oranlarında gözlenmiştir. Bu çalışmaya göre, her ne kadar, benign endoservikal epitelyum, adenokarsinoma insitu ve endoservikal karsinom arasında MUC2 ekspresyonu açısından belirgin istatistiksel fark saptanmamışsa da, non – neoplastik epitelde hiç eksprese edilmeyen MUC2 mukoproteininin neoplastik epitelde, özellikle de endoservikal kanserde %40 oranında saptanması bu mukoprotein neoplastik lezyonlarca daha fazla eksprese edildiğini göstermekte veya bu mukoprotein, daha fazla eksprese edildiği servikal epitelde neoplazi oluşumuna zemin hazırlayabileceğini akla getirmektedir.

Buna benzer bir çalışma Riethdorf ve arkadaşları (87) tarafından yapılmış olup bu çalışmada da serviksiz neoplastik ve non – neoplastik lezyonlarında MUC2 ve MUC5AC ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. MUC2 ekspresyonu Baker ve arkadaşlarının (86) çalışmalarında olduğu gibi bu çalışmada da normal epitelyum ve non – neoplastik lezyonlarda gözlenmemiş, % 36 oranında yalnızca neoplastik lezyonlarda gösterilmiştir. MUC5AC ise hem normal endoservikal epitelde (% 100), hemde neoplastik lezyonlarda (% 73) temsil edilmiş olmakla birlikte, ekspresyonunun neoplastik glandüler lezyonlarda azaldığı gözlenmiştir.

Aynı konuda yapılan daha geniş popülasyonlu bir çalışma (83), Zhao ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. 278 normal endoservikal doku, 42 adenokarsinomlu (27 mukoproteinöz adenokarsinom, 15 endometrioid adenokarsinom) servikal doku ile MUC1, MUC2, MUC5AC ve pilorik gland tipi mukoprotein ekspresyonları açısından karşılaştırılmıştır. Sonuçta MUC2 ekspresyonu Baker ve Riethdorf'un çalışmalarında olduğu gibi normal endoservikal epitelde izlenmemiş, MUC1 ve MUC5AC ise tüm normal endoservikal epitelde eksprese edilmiştir. 27 endoservikal mukoproteinöz adenokarsinoma

dokusunun 20'sinde ve 15 endometrioid adenokanser dokusunun 5'inde MUC2 eksprese edilmiştir. MUC5AC ve MUC1 mukoproteinlerinin ise kanser dokularında belirgin olarak azaldıkları izlenmiştir. Bu sonuçlar Baker ve Riethdorf'un sonuçlarıyla korelasyon göstermektedir.

Lau ve arkadaşları (80) ise, vücudun değişik bölgelerindeki 194 kanserde MUC1, MUC2, ve MUC5AC ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. Çalışmalarına 10 endoservikal kanserli hasta dahil edilmiş olup bu hastalardan 8'i MUC1, 7'si MUC5AC mukoproteini ekspresyonu açısından pozitif saptanırken, MUC2 mukoproteini ise 10 endoservikal kanserli hastanın hiçbirinde eksprese edilmemiştir. MUC1 ve MU5AC, mevcut çalışmalara göre normal endoservikal epitelde de yüksek oranda eksprese edildiği için kanserli dokuda pozitif saptanması anlamlı olmamakla birlikte MUC2 ekspresyonunun endoservikal kanserli epitelde gözlenmemesi Baker ve Riethdorf ve Zhao'nun çalışmalarıyla örtüşmemektedir.

OK kullanımı – MUC2 artışı – Servikal Karsinogenez ilişkisi göz önüne alındığında çalışmam ile Baker, Riethdorf ve Zhao'nun çalışmaları birbirlerini tamamlamaktadır. Nitekim, çalışmamda OK kullanımından sonra alınan mukus örneklerinde, öncesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artışlardan biri de MUC2 mukoproteininde kaydedilmiştir. Bu sonuç, OK kullanıcılarındaki servikal mukus MUC2 düzeyi artışının servikal karsinogenez sürecine katkıda bulunabileceğini düşündürmekte olup, MUC2 ve servikal karsinogenez sebep – sonuç ilişkisinin geniş hasta popülasyonlarında çalışılarak daha net sonuçlar elde edilmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniğine kontrasepsiyon amaçlı başvuran olgularda oral kontraseptif kullanımı açısından istekli olan olguların oranı %27.5 olarak bulunmuştur (88 / 320).
- OK kullanımı öncesinde ve sonrasında siklusun foliküler fazında alınan servikal mukus örneklerinde çalışılan 4 mukoprotein de (MUC 1, 2, 5AC, 5B) kantitatif olarak ölçülebilir miktarlarda saptanmış olup, OK kullanımı sonrasında tüm mukoprotein düzeylerinde artış saptanmıştır.
- OK kullanımı öncesinde ve sonrasında servikal mukusta kantitatif miktarı en fazla olan mukoprotein MUC 5AC olarak saptanmıştır.
- İki aylık oral kontraseptif kullanımını takiben servikal mukustaki MUC 1, 2, ve 5B düzeyleri anlamlı olarak artış göstermiştir ( $p < 0.001$ ).
- OK kullanımı sonrasında, öncesindeki düzeyine göre servikal mukusta en fazla artış gösteren, MUC 2 mukoproteini ( $+54.36 \pm 31.88$  ng/ml) olmuştur.
- Mukoproteinlerin hormonal regülasyon mekanizması ve fonksiyonlarını netleştirecek çalışmalar yapılmalıdır.
- OK kullanıcılarındaki servikal kanser gelişiminin patofizyolojisinde servikal mukus ve mukoprotein değişikliklerinin rolü aydınlatılmalı, özellikle de MUC 2 ve servikal karsinogenez sebep – sonuç ilişkisi geniş serili çalışmalarla desteklenmelidir.
- Yapılacak uzun süreli ve geniş kapsamlı çalışmalar ile OK kullanımı ile servikal mukusta hangi mukoprotein lehine nasıl değişiklikler olduğu ve servikal kansere yatkınlık yaratan mukoprotein tipi belirlendikten sonra serviks kanseri ile oral kontraseptif kullanımı arasındaki mekanizma daha fazla aydınlanmış olacak ve belki de bu mukoproteinler, servikal kanser ve öncül lezyonlarının taramasında kullanılabilir.

## 7. ÖZET

### ETİNİL ÖSTRADİOL (0.30 mgr) VE DROSPİRENON (3 mg) İÇEREN ORAL KONTRASEPTİFLERİN SERVİKAL MUKUS MUKOPROTEİN İÇERİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

**Aksoy M. Etinil estradiol (0.30 mg) ve drospirenon (3 mg) içeren oral kontraseptiflerin servikal mukus mukoprotein içeriği üzerine etkisi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanlık Tezi, Trabzon, 2010.** Oral kontraseptifler (OK), %100'e yakın etkinlik, yüksek güvenlik sınırları ve sağlığa diğer önemli katkılarıyla, bugün en etkili geriye dönebilir doğum kontrol yöntemidirler. Çalışmalar, OK'lerin uzun süreli kullanımının (5 veya daha fazla yıl), Serviks kanseri ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. OK kullananlarda Serviks Kanseri'ndeki risk artışının mekanizması uzun süredir tartışmalı olup, henüz kesin bir mekanizmaya ulaşılamamıştır. Kombine oral kontraseptif kullanan kadınlarda servikal mukus yetersiz, kalın ve yüksek oranda viskoz olmaktadır. OK kullanıcılarındaki servikal kanser gelişiminin patofizyolojisinde servikal mukus değişikliklerinin rolü iyi açıklanmamıştır. Çalışmamda oral kontraseptif kullanımıyla servikal mukus mukoprotein içeriğinde meydana gelebilecek değişimin saptanması amaçlanmıştır. Ekim 2008 - Kasım 2009 tarihleri arasında, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine kontrasepsiyon amacı ile başvurup, OK kullanımı için uygun ve istekli olan 20 üreme çağındaki kadın araştırma kapsamına alındı. Gönüllülerin ortalama yaşı  $30.95 \pm 4.43$  idi. Gönüllülerden ilaç kullanımı öncesi folliküler fazda servikal mukus örneği alındı, 2 ay Etinil estradiol (0.30 mg) ve drospirenon (3 mg) kullanımını takiben yine siklusun aynı döneminde tekrar mukus örneği alındı. Servikal mukus örnekleri, örneklerin toplanması bittikten sonra spesifik antikorlar aracılığıyla ELİSA yöntemiyle MUC1, MUC2, MUC5AC ve MUC5B düzeyleri açısından değerlendirildi. Oral kontraseptif öncesinde alınan mukus örnekleri, oral kontraseptif sonrasında alınanlarla mukoprotein düzeyleri açısından karşılaştırıldı. Kontrasepsiyon amaçlı başvuran olgularda oral kontraseptif kullanımı açısından istekli olan olguların oranı %27.5 olarak bulundu. OK kullanımı öncesinde ve sonrasında kantitatif olarak en yüksek değer MUC 5AC mukoproteininde saptandı. Oral kontraseptif kullanımı sonrasında, çalışılan tüm mukoprotein düzeylerinde artış kaydedilmekle birlikte MUC 1 ( $+30.73 \pm 24.44$  ng/ml,  $p<0.001$ ), MUC 2 ( $+54.36 \pm 31.88$  ng/ml,  $p<0.001$ ) ve MUC5B ( $+53.01 \pm 33.68$  ng/ml,  $p<0.001$ ) düzeylerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı idi. OK kullanımının sonrasında, öncesindeki değerine göre en fazla artış gösteren mukoprotein MUC 2 idi. OK kullanıcılarındaki servikal kanser gelişiminin patofizyolojisinde servikal mukus ve mukoprotein değişikliklerinin rolü daha geniş serili çalışmalarla aydınlatılmalıdır.

## 8. SUMMARY

### THE EFFECT OF ETHINYL ESTRADIOL (0.30 mg) AND DROSPIRENONE CONTAINING ORAL CONTRACEPTIVES UPON MUCOPROTEIN CONTENT OF CERVICAL MUCUS

**Aksoy M. The Effect of Ethinyl Estradiol (0.30 mg) and Drospirenone Containing Oral Contraceptives Upon Mucoprotein Content of Cervical Mucus. Karadeniz Technical University Faculty of Medicine. Thesis in Obstetrics and Gynecology, Trabzon, 2010.** Oral contraceptives (OC) remain among the most effective reversible methods of birth control available today, providing almost 100% effectiveness with an impressively high margin of safety and other important health benefits. Evidence shows that long-term use of oral contraceptives (five or more years) may be associated with an increased risk of cancer of the cervix. The mechanism of increased risk of cervical cancer in OCs users has long been debated, and remains uncertain. In women using combined oral contraceptives, the cervical mucus remains scanty, thick, and highly viscous. The role of cervical mucus changes on the pathophysiology of cervical cancer development in OC users has not been well described. In current study, it is aimed to determine the changes on the mucoprotein content that might result by using oral contraceptives within the cervical mucus. This study involved 20 women within the reproductive age who were willing and suitable to use oral contraceptives and who have applied to Obstetrics and Gynecology policlinic in Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Karadeniz Technical University to demand contraception. Women's mean age was  $30.95 \pm 4.43$ . Prior to use of the pills, cervical mucus samples were obtained from the women at the follicular phase of the menstrual cycle, following 2 months oral contraceptive use, at the same phase of the cycle, mucus samples were obtained again. Cervical mucus samples were then evaluated quantitatively for MUC 1, MUC 2, MUC 5AC and MUC 5B by ELISA by using specific antibodies. Mucus samples obtained prior to OC use were compared with those obtained following to OC use in terms of quantitative mucoprotein levels. The 27.5 % of cases who have applied for the purpose of contraception were willing to use oral contraceptive pill. MUC 5AC mucoprotein was predominant at both prior to and following to OC use, quantitatively. Following to OC use, when compared prior to use, variable increase at the levels of all studied mucoproteins was recorded, however, increase at the levels of MUC 1 ( $+30.73 \pm 24.44$  ng/ml,  $p < 0.001$ ), MUC 2 ( $+54.36 \pm 31.88$  ng/ml,  $p < 0.001$ ) and MUC 5B ( $+53.01 \pm 33.68$  ng/ml,  $p < 0.001$ ) were significant statistically. The difference of MUC 2 mucoprotein level was remarkable ( $+54.36 \pm 31.88$  ng/ml). More studies to determine the role of cervical mucus changes on the pathophysiology of cervical cancer development in OC users are needed.

## 6. KAYNAKLAR

1. Hedon B. The evolution of oral contraceptives. Maximizing efficacy, minimizing risks. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1990;152:7-12.
2. Burkman R, Schlesselman JJ, Zieman M. Safety concerns and health benefits associated with oral contraception. *Am J Obstet Gynecol* 2004 Apr;190(4 Suppl):S5-22.
3. Franceschi S. The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. *Recent Results Cancer Res* 2005;166:277-97.
4. Moodley M, Moodley J, Chetty R, Herrington CS. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review. *Int J Gynecol Cancer* 2003 Mar-Apr;13(2):103-10.
5. Lammers P, Blumenthal PD, Huggins GR. Developments in contraception: a comprehensive review of Desogen (desogestrel and ethinyl estradiol). *Contraception* 1998 May;57(5 Suppl):1S-27S.
6. Burkman RT. Oral contraceptives: current status. *Clin Obstet Gynecol* 2001 Mar;44(1):62-72.
7. Gipson IK. Mucins of the human endocervix. *Front Biosci* 2001 Oct 1;6:D1245-55.
8. Guven S, Kart C, Guvendag Guven ES, Gunalp GS. The underlying cause of cervical cancer in oral contraceptive users may be related to cervical mucus changes. *Med Hypotheses* 2007;69(3):550-2.

9. Stubblefield PG, Ellis S, Kapp N. Family Planning. In: Berek JS, editor. Berek & Novak's Gynecology. 14 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 376 - 93.
10. Black A, Francoeur D, Rowe T, Collins J, Miller D, Brown T, et al. SOGC clinical practice guidelines: Canadian contraception consensus. J Obstet Gynaecol Can 2004 Mar;26(3):219-96.
11. Williams-Deane M, Potter LS. Current oral contraceptive use instructions: an analysis of patient package inserts. Fam Plann Perspect 1992 May-Jun;24(3):111-5.
12. Mercan R, Urman B. Fertilite Kontrolü. In: Attar E, Ata B, editors. Gommel'in Jinekolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2007. p. 573 - 89.
13. Westhoff C, Heartwell S, Edwards S, Ziemann M, Cushman L, Robilotto C, et al. Initiation of oral contraceptives using a quick start compared with a conventional start: a randomized controlled trial. Obstet Gynecol 2007 Jun;109(6):1270-6.
14. Diczfalusy E. The contraceptive revolution: an era of scientific and social development New York: The Parthenon Publishing Group limited; 1997.
15. Yücebilgin MS, Terek MC, Yıldız PS. Hormonal Kontrasepsiyon. In: Beksaç MS, Ayhan A, Demir N, Hassa H, Kösebay D, Tıraş MB, et al., editors. Jinekoloji; Üreme Endokrinolojisi & İnfertilite ve Jinekolojik Onkoloji. Ankara: Medical Network; 2006. p. 720 - 34.
16. Phillips A. The selectivity of a new progestin. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl 1990;152:21-4.

17. Oelkers W. Drospirenone, a progestogen with antimineralocorticoid properties: a short review. *Mol Cell Endocrinol* 2004 Mar 31;217(1-2):255-61.
18. Guido M, Romualdi D, Giuliani M, Suriano R, Selvaggi L, Apa R, et al. Drospirenone for the treatment of hirsute women with polycystic ovary syndrome: a clinical, endocrinological, metabolic pilot study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Jun;89(6):2817-23.
19. Suthipongse W, Taneepanichskul S. An open-label randomized comparative study of oral contraceptives between medications containing 3 mg drospirenone/30 microg ethinylestradiol and 150 microg levonogestrel/30 microg ethinylestradiol in Thai women. *Contraception* 2004 Jan;69(1):23-6.
20. Fotherby K. Bioavailability of orally administered sex steroids used in oral contraception and hormone replacement therapy. *Contraception* 1996 Aug;54(2):59-69.
21. Brody SA, Turkes A, Goldzieher JW. Pharmacokinetics of three bioequivalent norethindrone/mestranol-50 micrograms and three norethindrone/ethinyl estradiol-35 micrograms OC formulations: are "low-dose" pills really lower? *Contraception* 1989 Sep;40(3):269-84.
22. Speroff L, Glass R, Kase N. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 6 ed: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
23. World Health Organization. *Improving access to quality care in family planning: Medical eligibility criteria for contraceptive use* 2001; Geneva: World Health Organization; 2001.

24. Rosenberg MJ, Waugh MS, Burnhill MS. Compliance, counseling and satisfaction with oral contraceptives: a prospective evaluation. *Fam Plann Perspect* 1998 Mar-Apr;30(2):89-92, 104.
25. Diczfalusy E. Probable mode of action of oral contraceptives. *Res Steroids (Amst)* 1966;2:389-92.
26. Mitra PK, Roychadhuri J. Effect of oral contraceptives on the ultrastructure of the endometrium. *J Gynaecol Endocrinol* 1987;3(1-4):13-5.
27. Rossmannith WG, Steffens D, Schramm G. A comparative randomized trial on the impact of two low-dose oral contraceptives on ovarian activity, cervical permeability, and endometrial receptivity. *Contraception* 1997 Jul;56(1):23-30.
28. Rosenberg MJ, Waugh MS. Oral contraceptive discontinuation: a prospective evaluation of frequency and reasons. *Am J Obstet Gynecol* 1998 Sep;179(3 Pt 1):577-82.
29. Davis A, Godwin A, Lippman J, Olson W, Kafriksen M. Triphasic norgestimate-ethinyl estradiol for treating dysfunctional uterine bleeding. *Obstet Gynecol* 2000 Dec;96(6):913-20.
30. Berenson AB, Radecki CM, Grady JJ, Rickert VI, Thomas A. A prospective, controlled study of the effects of hormonal contraception on bone mineral density. *Obstet Gynecol* 2001 Oct;98(4):576-82.
31. Petitti DB, Piaggio G, Mehta S, Cravioto MC, Meirik O. Steroid hormone contraception and bone mineral density: a cross-sectional study in an international

population. The WHO Study of Hormonal Contraception and Bone Health. *Obstet Gynecol* 2000 May;95(5):736-44.

32. Iyer V, Farquhar C, Jepson R. Oral contraceptive pills for heavy menstrual bleeding. *Cochrane Database Syst Rev* 2000(2):CD000154.

33. Vessey M, Doll R, Peto R, Johnson B, Wiggins P. A long-term follow-up study of women using different methods of contraception--an interim report. *J Biosoc Sci* 1976 Oct;8(4):373-427.

34. Dewis P, Petsos P, Newman M, Anderson DC. The treatment of hirsutism with a combination of desogestrel and ethinyl oestradiol. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1985 Jan;22(1):29-36.

35. Lemay A, Poulin Y. Oral contraceptives as anti-androgenic treatment of acne. *J Obstet Gynaecol Can* 2002 Jul;24(7):559-67.

36. Casper RF, Dodin S, Reid RL. The effect of 20mcg ethinyl estradiol/1 mg norethindrone acetate (Minestrin), a low-dose oral contraceptive, on vaginal bleeding patterns, hot flashes, and quality of life in symptomatic perimenopausal women. *Menopause* 1997;4:139 - 47.

37. Schlesselman J, Collins J. The influence of steroids on gynecologic cancers. In: Fraser ISJR, Lobo RA, Whitehead MI, editors. *Estrogens and progestogens in clinical practice*. London: Churchill Livingstone; 1998. p. 831 - 64.



38. Chiaffarino F, Parazzini F, La Vecchia C, Marsico S, Surace M, Ricci E. Use of oral contraceptives and uterine fibroids: results from a case-control study. *Br J Obstet Gynaecol* 1999 Aug;106(8):857-60.
39. Lanes SF, Birmann B, Walker AM, Singer S. Oral contraceptive type and functional ovarian cysts. *Am J Obstet Gynecol* 1992 Mar;166(3):956-61.
40. Fernandez E, La Vecchia C, Franceschi S, Braga C, Talamini R, Negri E, et al. Oral contraceptive use and risk of colorectal cancer. *Epidemiology* 1998 May;9(3):295-300.
41. Rohan TE, Miller AB. A cohort study of oral contraceptive use and risk of benign breast disease. *Int J Cancer* 1999 Jul 19;82(2):191-6.
42. Panser LA, Phipps WR. Type of oral contraceptive in relation to acute, initial episodes of pelvic inflammatory disease. *Contraception* 1991 Jan;43(1):91-9.
43. Yücesoy İ, Çalışkan E. Kontrasepsiyon ve Aile Planlaması. In: Çiçek MN, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A, editors. *Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*. 2 ed. İstanbul: Güneş Kitabevi; 2006. p. 789 - 805.
44. Godsland IF, Crook D, Simpson R, Proudler T, Felton C, Lees B, et al. The effects of different formulations of oral contraceptive agents on lipid and carbohydrate metabolism. *N Engl J Med* 1990 Nov 15;323(20):1375-81.
45. Knopp RH. Cardiovascular effects of endogenous and exogenous sex hormones over a woman's lifetime. *Am J Obstet Gynecol* 1988 Jun;158(6 Pt 2):1630-43.
46. Speroff L, DeCherney A. Evaluation of a new generation of oral contraceptives. The Advisory Board for the New Progestins. *Obstet Gynecol* 1993 Jun;81(6):1034-47.

47. Mann JJ. Progestogens in cardiovascular diseases: an introduction to the epidemiologic data. *Am J Obstet Gynecol* 1982 Mar 15;142(6 Pt 2):752-7.
48. Godsland IF, Crook D. Update on the metabolic effects of steroidal contraceptives and their relationship to cardiovascular disease risk. *Am J Obstet Gynecol* 1994 May;170(5 Pt 2):1528-36.
49. Mishell DR, Jr., Colodny SZ, Swanson LA. The effect of an oral contraceptive on tests of thyroid function. *Fertil Steril* 1969 Mar-Apr;20(2):335-9.
50. Notelovitz M, Kitchens CS, Coone L, McKenzie L, Carter R. Low-dose oral contraceptive usage and coagulation. *Am J Obstet Gynecol* 1981 Sep 1;141(1):71-5.
51. Notelovitz M, Levenson I, McKenzie L, Lane D, Kitchens CS. The effects of low-dose oral contraceptives on coagulation and fibrinolysis in two high-risk populations: young female smokers and older premenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 1985 Aug 15;152(8):995-1000.
52. Gerstman BB, Piper JM, Tomita DK, Ferguson WJ, Stadel BV, Lundin FE. Oral contraceptive estrogen dose and the risk of deep venous thromboembolic disease. *Am J Epidemiol* 1991 Jan;133(1):32-7.
53. Vandembroucke JP, Rosing J, Bloemenkamp KW, Middeldorp S, Helmerhorst FM, Bouma BN, et al. Oral contraceptives and the risk of venous thrombosis. *N Engl J Med* 2001 May 17;344(20):1527-35.
54. Lewis MA, Heinemann LA, MacRae KD, Bruppacher R, Spitzer WO. The increased risk of venous thromboembolism and the use of third generation progestagens:

role of bias in observational research. The Transnational Research Group on Oral Contraceptives and the Health of Young Women. *Contraception* 1996 Jul;54(1):5-13.

55. Farmer RDT, Preston TD. The risk of venous thromboembolism associated with low oestrogen oral contraceptives. *Journal of Obstetrics & Gynaecology* 1995;15(3):195 - 200.

56. Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994 Nov 26;344(8935):1453-7.

57. Vandenbroucke JP, van der Meer FJ, Helmerhorst FM, Rosendaal FR. Factor V Leiden: should we screen oral contraceptive users and pregnant women? *BMJ* 1996 Nov 2;313(7065):1127-30.

58. Ischaemic stroke and combined oral contraceptives: results of an international, multicentre, case-control study. WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. *Lancet* 1996 Aug 24;348(9026):498-505.

59. Goldstein LB, Adams R, Becker K, Furberg CD, Gorelick PB, Hademenos G, et al. Primary prevention of ischemic stroke: A statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. *Stroke* 2001 Jan;32(1):280-99.

60. Curtis KM, Chrisman CE, Peterson HB. Contraception for women in selected circumstances. *Obstet Gynecol* 2002 Jun;99(6):1100-12.

61. Petitti DB, Sidney S, Bernstein A, Wolf S, Quesenberry C, Ziel HK. Stroke in users of low-dose oral contraceptives. *N Engl J Med* 1996 Jul 4;335(1):8-15.

62. Sidney S, Siscovick DS, Petitti DB, Schwartz SM, Quesenberry CP, Psaty BM, et al. Myocardial infarction and use of low-dose oral contraceptives: a pooled analysis of 2 US studies. *Circulation* 1998 Sep 15;98(11):1058-63.
63. Croft P, Hannaford PC. Risk factors for acute myocardial infarction in women: evidence from the Royal College of General Practitioners' oral contraception study. *BMJ* 1989 Jan 21;298(6667):165-8.
64. Castelli WP. Cardiovascular disease: pathogenesis, epidemiology, and risk among users of oral contraceptives who smoke. *Am J Obstet Gynecol* 1999 Jun;180(6 Pt 2):S349-56.
65. Lewis MA, Heinemann LA, Spitzer WO, MacRae KD, Bruppacher R. The use of oral contraceptives and the occurrence of acute myocardial infarction in young women. Results from the Transnational Study on Oral Contraceptives and the Health of Young Women. *Contraception* 1997 Sep;56(3):129-40.
66. Rooks JB, Ory HW, Ishak KG, Strauss LT, Greenspan JR, Hill AP, et al. Epidemiology of hepatocellular adenoma. The role of oral contraceptive use. *JAMA* 1979 Aug 17;242(7):644-8.
67. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 1996 Jun 22;347(9017):1713-27.

68. Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2002 Jun 27;346(26):2025-32.
69. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999 Sep;189(1):12-9.
70. Chen YH, Huang LH, Chen TM. Differential effects of progestins and estrogens on long control regions of human papillomavirus types 16 and 18. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 Jul 25;224(3):651-9.
71. Hormonal contraception and post-menopausal hormonal therapy. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; 1999.
72. Hannaford PC, Selvaraj S, Elliott AM, Angus V, Iversen L, Lee AJ. Cancer risk among users of oral contraceptives: cohort data from the Royal College of General Practitioner's oral contraception study. *BMJ* 2007 Sep 29;335(7621):651.
73. Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 2003 Apr 5;361(9364):1159-67.
74. Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human

papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002 Mar 30;359(9312):1085-92.

75. Morales P, Roco M, Vigil P. Human cervical mucus: relationship between biochemical characteristics and ability to allow migration of spermatozoa. *Hum Reprod* 1993 Jan;8(1):78-83.

76. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Moccia R, Zhan Q, Toribara N, Ho SB, et al. MUC4 and MUC5B transcripts are the prevalent mucin messenger ribonucleic acids of the human endocervix. *Biol Reprod* 1999 Jan;60(1):58-64.

77. Hafez ESE. The cervix and sperm transport. *Human Reproduction: Conception and Contraception*. 2 ed. Hagerstown: Harper and Row; 1980. p. 221 - 52.

78. Cohen MS, Britigan BE, French M, Bean K. Preliminary observations on lactoferrin secretion in human vaginal mucus: variation during the menstrual cycle, evidence of hormonal regulation, and implications for infection with *Neisseria gonorrhoeae*. *Am J Obstet Gynecol* 1987 Nov;157(5):1122-5.

79. Rivera R, Yacobson I, Grimes D. The mechanism of action of hormonal contraceptives and intrauterine contraceptive devices. *Am J Obstet Gynecol* 1999 Nov;181(5 Pt 1):1263-9.

80. Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites: an immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 2004 Jul;122(1):61-9.

81. Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci* 2001 Oct 1;6:D1192-206.
82. Chauhan SC, Kumar D, Jaggi M. Mucins in ovarian cancer diagnosis and therapy. *J Ovarian Res* 2009;2:21.
83. Zhao S, Hayasaka T, Osakabe M, Kato N, Nakahara K, Kurachi H, et al. Mucin expression in nonneoplastic and neoplastic glandular epithelia of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 2003 Oct;22(4):393-7.
84. Lloyd KO, Yin BW, Tempst P, Erdjument-Bromage H. MUC-6 mucin is a major component of "blood group substance" from human ovarian cyst fluid. *Biochim Biophys Acta* 2000 May 1;1474(3):410-4.
85. Gipson IK, Moccia R, Spurr-Michaud S, Argueso P, Gargiulo AR, Hill JA, 3rd, et al. The Amount of MUC5B mucin in cervical mucus peaks at midcycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Feb;86(2):594-600.
86. Baker AC, Eltoum I, Curry RO, Stockard CR, Manne U, Grizzle WE, et al. Mucinous expression in benign and neoplastic glandular lesions of the uterine cervix. *Arch Pathol Lab Med* 2006 Oct;130(10):1510-5.
87. Riethdorf L, O'Connell JT, Riethdorf S, Cviko A, Crum CP. Differential expression of MUC2 and MUC5AC in benign and malignant glandular lesions of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2000 Oct;437(4):365-71.