

TC
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

778483

MENOPOZ ÖNCESİ VE SONRASI SAĞLIKLI VE SERVİKS KANSERLİ
KADINLARDA İNSAN PAPİLLOMAVİRUS (HPV) DNA'SININ
ARAŞTIRILMASI VE GENOTİPLENDİRİLMESİ

T-118483

Aylin ATEŞ

Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı
Prof.Dr.Yusuf ÖZBAL

TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Kayseri
Nisan 2002

TC
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MENOPOZ ÖNCESİ VE SONRASI SAĞLIKLI VE SERVİKS KANSERLİ
KADINLARDA İNSAN PAPİLLOMAVİRUS (HPV) DNA'SININ
ARAŞTIRILMASI VE GENOTİPLENDİRİLMESİ**

Aylin ATEŞ

Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı
Prof.Dr.Yusuf ÖZBAL

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
01-11-08 nolu proje ile desteklenmiştir.

Kayseri
Nisan2002

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Mikrobiyoloji** Anabilim
Dalı **Yüksek Lisans Programı**
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma,
aşağıdaki jüri tarafından

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08/05/2002

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
JURİ BAŞKANI
Prof.Dr. Yusuf ÖZBAL

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
ÜYE

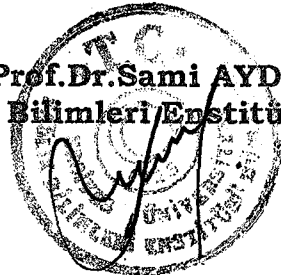
Prof.Dr. A. Bülent SÜMERKAN

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
ÜYE

Yrd.Doç.Dr.Selma GÖKAHMETOĞLU

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof.Dr.Sami AYDOĞAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



ÖZET

Menapoz Öncesi ve Sonrası Sağlıklı ve Serviks Kanserli Kadınlarda Papillomavirus (HPV) DNA'sının Araştırılması ve Genotiplendirilmesi

İnsan papillomavirüs (HPV) tiplerinin bazıları, kadınlarda yaygın olarak görülen servikal kanserin etiyopatogenezinden sorumlu tutulmaktadır. Kayseri'de 152'si menopoz öncesi ve 24'ü menopoz sonrası sağlıklı kadın ve 4'ü serviks kanserli kadın olmak üzere toplam 180 kişiden alınan endoservikal örneklerde "hybrid capture" hibridizasyon yöntemi ile HPV DNA'sı araştırıldı. Menapoz öncesi 152 kadının 7'sinde (%4.6), menopoz sonrası 24 kadının 2'inde (%8.3) ve serviks kanserli 4 kadının 4 (%100)'ünde HPV DNA pozitif bulundu. HPV DNA pozitif olan 4 serviks kanserli olgunun parafin bloklara alınan servikal biyopsi örneklerinde PCR yöntemi ile orta ve yüksek risk grubu HPV genotipleri (HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, ve 56) yönünden araştırıldı ve dört örneğin hepsinde HPV genotip 16 bulundu.

Bu çalışmada; serviks kanserli hastalarda, menopoz öncesi/sonrası sağlıklı kadınlara kıyasla daha yüksek oranda HPV DNA pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$) ve HPV DNA belirlenmesi ve genotiplendirilmesinin klinik ve epidemiyolojik açıdan önemi vurgulandı.

Anahtar Kelimeler: Papillomavirüs, Human papillomavirüsünün genotiplendirilmesi, HPV genotip 16/18

SUMMARY

Investigation of HPV DNA and Their Genotyping in Premenopause and Postmenopause Healty Women and Patients with Cervical Cancer

Some of human papillomavirus (HPV) types are held responsible for the pathogenesis of cervical cancer commonly seen in women. HPV DNA's were investigated using the method of "hybrid capture" hybridization in endocervical samples from 180 subjects in Kayseri, 152 premenopause and 24 postmenopause healty women and 4 patients with cervical cancer. HPV DNA was found positive in 7 (4.6 %) of the 152 premenopause and in 2 (8.3 %) of the 24 postmenopause healty women and in all (100 %) of the 4 patients with cervical cancer. Cervical biopsy samples taken in paraffin blocks from 4 patients with positive HPV DNA were investigated using PCR for genotypes of medium and high risk of HPV genotype groups (HPV genotype 16, 18, 31, 33, 35, 45 51,52 and 56) and HPV genotype 16 was found in all 4 samples.

In this study, greater HPV DNA positivity was found in patient with cervical cancer than in healty women in premenopause and postmenopause period and which was found statistically significant ($p<0.05$) and the clinical and epidemiological importance of determining HPV DNA and their genotyping was stressed.

Key Words: Papillomavirus, Human papillomavirus genotyping, HPV genotype 16/18

TEŐEKKÜR

Bu tezi gerçekleŐtirmemde her tŸrlŸ yardımlarını esirgemeyen tez danıŐmanım, Erciyes Ÿniversitesi Tıp FakŸltesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Yusuf ŖZBAL'a, HPV genotiplendirme çalışmalarında destek veren Sayın Prof. Dr. Ŗemsettin USTAÇELEBİ'ye, çalıŐmamı yŸnlendiren Sayın Yrd.Doç.Dr. Selma GŖKAHMETOĐLU'na ve Ŗrnekleerin alınmasında yardımcı olan Sayın Ŗđr.GŖr.Dr. BŸlent ŖZELİK'e sonsuz teŐekkŸrlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Papilloma Virüs'nün Tarihçesi.....	2
2.2. Viral Özellikleri.....	2
2.3. Sınıflandırılması.....	4
2.4. Patogenez ve İmmünite.....	5
2.5. Klinik Görünümler.....	8
2.6. Laboratuvar Tanısı.....	13
2.7. Epidemiyoloji.....	16
2.8. Tedavi ve Korunma.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Örneklerin Toplanması.....	20
3.2. İnsan Papillomavirüs (HPV) DNA'sının Belirlenmesi.....	20
3.1.1. Testin Prensipleri.....	21
3.1.2. Testin Uygulanması.....	22
3.3. İnsan Papillomavirüs Genotiplendirilmesi.....	23
3.4. İstatistiksel Analiz.....	25
4. BULGULAR.....	26
4.1 HPV DNA Bulguları.....	27
4.2 HPV Genotip Bulguları.....	27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	28
6. KAYNAKLAR.....	33
ÖZGEÇMİŞ.....	41

KISALTMALAR VE SİMGELER

CIN	: Servikal intraepitelyal neoplazi
dATP	: Deoksi adenin tri fosfat
dCTP	: Deoksi sitozin tri fosfat
dGTP	: Deoksi guanin tri fosfat
dNTP	: Deoksi nükleotid tri fosfat
dTTP	: Deoksi timin tri fosfat
E	: Erken genler
EDTa	: Ethylenediaminetetraaceticacid
EV	: Epidermodysplasia verruciformis
FISH	: Filter <i>in situ</i> hibridizasyonu
HPV	: Human Papillamavirüs
KCl	: Potasyum klorür
L	: Geç genler
NaCl	: Sodyum klorür
NM	: Nanometre
MgCl ₂	: Mağnezyum klorür
ORF	: Open Reading Frame
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PRB	: Retinoblastoma protein
RLU	: Bağlı ışık birimi
SCC	: Squamous cell carcinom
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Taq	: Thermus aquaticus
UV	: Ultraviyole

TABLO LİSTESİ

Sayfa no

- Tablo 1** :İnsan papillomavirüslerinin oluşturdukları hastalıklar.....8
- Tablo 2** :Menapoz öncesi ve sonrası sağlıklı ve serviks kanserli kadınlardan alınan endoservikal örneklerde HPV DNA bulunma oranları.....27

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Papillomavirüsleri, konakçı türüne özgül DNA virüsleridir. İnsanlar da dahil, pek çok hayvan türü ve kuşlarda papillom veya siğillere neden olurlar (1,2). İnsan papillomavirüsleri (HPV) cinsel temasla bulaşan virüslerin başında yer almaktadır. HPV'nin yüksek risk genotiplerinden HPV16 ve HPV18'in vajina, vulva, anüs, penis ve serviksin squamöz kaynaklı karsinom oluşumunda önemli rol oynadığı yapılan moleküler ve epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir (3).

Bu çalışmada; HPV tiplerinin özellikle serviks kanserli kadınlarda sıklıkla bulunması ve yaygın olarak görülen servikal kanserin etiyopatogenezinden sorumlu tutulması nedeniyle (4), HPV tiplerini erken safhada saptayabilen duyarlı ve özgül bir moleküler tanı testi olan hibridizasyon yöntemi ile Kayseri'de menapoz öncesi ve sonrası sağlıklı ve serviks kanserli kadınlarda HPV DNA'sının araştırılması ve genotiplerinin belirlenmesi amaçlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. HPV'NİN TARİHÇESİ

İnsan siğillerinin viral türü, Ciuffo tarafından 1920'li yıllarda, siğil doku ekstrelerinin süzüntü sıvısıyla geçebileceği kanıtlanmıştır (1). Deri siğillerinde viral etiyoloji olabileceği bu yüzyıl başında ortaya atılmış ve 1930'larda tavşan papillomavirusları ile yapılan çalışmalar, ilk memeli tümör virüs deneyleri olmuştur. Ancak kanser virüslerinin hücre kültürlerinde üretilmemesi nedeniyle, 1970'lerde moleküler klonlama tekniklerinin kullanıma girmesine kadar papillomavirüslerle yapılan çalışmalar yavaş ilerlemiştir (5).

2.2. HPV'NİN VİRAL ÖZELLİKLERİ

İnsan papilloma virusleri 50-55 nm (nanometre) büyüklüğünde zarfsız virüslerdir. Çift iplikli çembersel DNA'sı, 72 kapsomerli ikozahedral simetriye sahip bir kapsid ile çevrilidir. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemede, bu kapsomerlerden 60'ının ikozahedral yapının eş kenar

üçgen yüzlerinde ve 12'sininde köşelerde yer aldığı gösterilmiştir (6). Viriyon iki kapsit proteini içerir (7). Majör kapsid proteini 55 kilo dalton (kDa) molekül ağırlığında olup viriyon ağırlığının % 80'nini oluşturur ve minör kapsid proteini ise 70 kDa'dır ve bunlar sırasıyla viral genom üzerinde bulunan L1 ve L2 bölgelerinden sentez edilirler. Majör kapsid proteini HPV cinsine özgü (bütün HPV tipleri için ortak) anijeniteye sahiptir (6). Viral genom 7.900-8.000 baz çifti uzunluğundadır ve guanin+sitozin oranı hemen hemen bütün HPV tiplerinde %42'dir (2,6). Birçok papillomavirüsün genomu klonlanmış ve yaklaşık %20'sinin tam nükleik asit dizisi çıkarılmıştır (6). Viral DNA hücresel histonlarla birlikte kromatin benzeri yapılar oluşturmaktadır. Viral proteinleri kodlayan bütün dizinler (ORF : open reading frame) tek bir DNA sarmalı üzerindedir ve bütün papillomavirüslerinde genetik organizasyon aynıdır. Viral genomun üç farklı bölgeye sahip olduğu gösterilmiştir. Bunlar; URR (upstream regulatory region), transkripsiyonu ve replikasyonu düzenleyici bölge, DNA replikasyonu ve hücre transformasyonu için gerekli proteinleri kodlayan erken genlerin (E1-E7) bulunduğu bölge ve majör/minör kapsit proteinlerini kodlayan iki geç genin (L1-L2) bulunduğu bölgedir (2,8).

Papillomavirüsleri standart hücre kültürlerinde üretilememelerine rağmen genomları iyi bilinmektedir. Küçük sirküler dsDNA genom klonlamaya çok yatkındır ve dizilim analizi, tanı problemlerinin hazırlanması ve papillomavirüslerin karsinojen olarak muhtemel rollerinin araştırılması için yeterli miktarda genetik materyal mevcuttur. Sığır papillomavirüs tip 1 (BPV-1) DNA'sı interferon gibi ürünlerin üretiminde ökaryotik klonlama vektörü olarak kullanılmaktadır (7).

2.3. PAPİLLOMAVİRÜSLERİN SINIFLANDIRILMASI

Tür ve doku tropizm özelliği gösteren papillomavirüsler daha önceleri farklı mukozal ve dermal bölgelere olan eğilimlerine göre sınıflandırılmakta iken, bugün DNA homolojisi göz önüne alınarak orijin aldıkları türe (insan, sığır vs.) ve aynı tür içindeki genetik ilişki derecesine göre sınıflandırılmaktadır (9).

Doğada yaygın olarak bulunan papillomavirüsler, *papovaviridae* ailesinin papillomavirus genusunda yer almaktadır. Papovaviridae ailesinde polyomavirus genusunda bulunmaktadır. Papovavirüs terimi bu ailedeki virus gruplarının ilk iki harflerinin birleşmesi ile oluşmaktadır. Papillomavirüsler, polyomavirüsler ile fiziksel ve kimyasal olarak ortak özellikleri paylaşmasına karşılık temel biyolojik özellikleri ve genomik organizasyonu farklıdır (1,3,6). İnsan papillomavirüslerinin hücre kültürlerinde üretilmeleri zor olduğundan nötralizasyon testleri geliştirilememiş ve bundan dolayı sınıflandırma, genomundaki farklılıklar üstüne temellendirilmiştir. Bu nedenle tipler serotip yerine "genotip" olarak adlandırılmakta ve tip sayısı hızla artmaktadır (2,6,10).

Bugüne kadar 70 farklı HPV tiplendirilmiştir (9). Bilinen tiplerinden yaklaşık 20 kadarı genital mukozayı etkilemektedir. HPV genotip sınıflandırmasında esas DNA dizi homolojisidir. Yeni tanımlanan HPV eğer bilinen diğer tiplerle %90'dan daha homoloji gösterirse yeni tip olarak sınıflandırılır. Ayrıca HPV tipleri kanser gelişimi ile ilgili olarak üç sınıfta gruplandırılmaktadır. Bunlardan tip 16, 18, 45 ve 56 yüksek derecede displazi ve servikal kanser oluşumu ile ilişkili olmaları nedeniyle yüksek risk tipleri olarak bilinirler. Bunlardan başka tip 31, 33, 35, 51, 52 ve 58 orta ve tip 6, 11, 42, 43 ve 44 düşük risk tipleri olarak sınıflandırılır (11-13).

Yeni tanımlanan 6 HPV ise henüz tiplendirilememiştir. Yüksek derecede tür ve doku tropizm özelliği gösteren ve farklı mukozal ve dermal bölgelere eğilimi olan insan papillomavirüsleri bu özelliklerine dayanarak; genital HPV'ler, Epidermodysplasia verruciformis (EV) ile ilişkili olan HPV'ler, ungula ile ilişki olan HPV'ler ve kutanöz HPV'ler olmak üzere 4 gruba toplanmıştır. Ancak, klinik tablolar ile HPV tiplerinin DNA homolojileri arasında ilişki yoktur (6,14).

2.4. PATOGENEZ VE İMMÜNİTE

Papillomavirüsler sadece konakçı türüne özgül değil doku tropizminde de son derece kısıtlanmışlardır. Genel olarak, bu virüsler iki grup içinde değerlendirilebilirler: kutanöz tip (deriyi tutanlar) ve mukozal tip (genital kanalı, bazen solunum kanalını, oral boşluğu veya konjonktivayı tutanlar). Papillomavirüsler deri ve mukoz membranların skuamöz epitel hücrelerini infekte eder ve replike olarak epitelyal proliferasyona yol açarlar. Sınırlı ve intakt bazal membrana sahip olan bu lokalize hiperplaziye "verruka veya papillom" adı verilir. Papillomların genellikle infekte bir bazal hücrenin monoklonal çoğalması sonucu meydana geldiği düşünülmektedir (6,15).

Virüs deriyi bir sıyrık aracılığıyla geçer ve bazal hücre katmanını infekte eder. İki yıla varan bir inkübasyona sonucu siğiller oluşur (2). Nispeten farklılaşmamış üreme safhasında olan bu hücrelerde, sadece erken genler transkribe olur ve sınırlı bir DNA replikasyonu sonucunda genom bir nükleer plazmid olarak korunur. Erken proteinler bazal hücrelerin proliferasyonunu stimüle eder ve birkaç aylık inkübasyon periyodundan sonra ortaya çıkan hiperplazi, kalınlaşma ve genellikle kabarık papillomlara yol açar. Kapsit proteinleri ve virionlar sadece epitelin dış katmanlarındaki terminal olarak farklılaşmış keratinositlerde üretilir. Bu hücreler normal olarak keratin üretmekte ancak bölünmemektedir.

Hiperkaratozis deri sigillerinin dikkat çekici bir özelliğidir. Sigiller genellikle senkronize bir şekilde ve bir kaç yıl içinde kaybolma eğilimindedir. Bu ani gerileme antikor titresi tarafından gerçekleştirilmez ve genellikle T hücreleri tarafından yürütülen immün yanıtı atfedilmektedir. Ancak, bu yanıtı neyin tetiklediği veya niye bu kadar geç geliştiği bilinmemektedir (2,16,17).

Genital organların dış yüzeyinde HPV tarafından indüklenen papillomlar temelde yukarıda tanımlananlara benzemesine rağmen servikal lezyonlar bazı önemli farklılıklara sahiptir. Burada virüs, cinsel birleşme sırasında skuamokolumnar sınırın yakınındaki üremekte olan hücrelerin bulunduğu bölgeye minör bir sıyrıktan girer. Ortalama 3 aylık bir inkübasyon periyodundan sonra düzgün yüzeyle bir kondilom gelişir. Bazı HPV tiplerinin infeksiyonu yıllar süren bir süreçte gelişir ve bu sırada değişik aşamalı bir servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) ve invaziv skuamöz karsinom görülür. HPV genomu yıllar boyu entegre olmamış nükleer epizom şeklinde persistan kalabilir. Bu durum sadece lezyon içindeki hücrelerde değil aynı zamanda histolojik olarak normal mukoz membranlarda ve periferdeki hücrelerde de söz konusudur. Buna karşın, servikal karsinomlar HPV genomunu saçır. En yaygın olarak da HPV tip 16, 18, 31, 33, ve 35 viral genomu, konakçı hücre kromozomuna rastgele bölgelerde entegre olmuş tam uzunlukta olmayan kopyalar şeklinde bulunmaktadır.(2,15,18)

Onkogenik yönleriyle de geniş çapta incelenmiş olan HPV'ler özellikle mukozal papillomavirüsler başta olmak üzere hem benign hem de malign tümörlerde gösterilmiştir. Epidemiyolojik olarak HPV tip 16 ve 18'in servikal displazi ve kanserle yakın ilişkisinin saptanmasının yanı sıra *in vitro* olarak hücre kültürlerinde transformasyon kapasiteleri gösterilmiştir (19). Özellikle tip 16 ve 18'in E6 ve E7 gen ürünleri bugün HPV onkoproteinleri olarak adlandırılmaktadır. Bu proteinlerin hücre

replikasyonunu baskılayan proteinlere (tumor suppressor protein) bağlandığı gösterilmiştir ve bu yolla hücre üreme ve proliferasyonunu stimüle ederek kanser patogenezinde rol oynadıkları ortaya atılmıştır. HPV onkoproteinlerinden E6, P53'e E7 ise pRB(retinoblastoma protein)'ye bağlanır (18). Bu hücrel tümör süpresor proteinlerinin inaktif hale gelmesi kanser patogenezinde HPV' nin muhtemel rolü üzerinde öne sürülen bir hipotezdir (6).

HPV standart hücre kültürlerinde üretilmediği için, karsinogenezin mekanizması konusundaki bilgiler temel olarak moleküler klonlama ile elde edilmiş HPV DNA'sıyla transfekte hücrelerin *in vitro* transformasyonundan veya timusu olmayan veya transjenik farelerden edinilmiştir (2). Yüksek riskli HPV tip 16 ve 18'in onkojenitesi E6 ve E7 onkogenlerine atfedilmektedir. Bu genler, bütün servikal karsinomların %90'ından fazlasında bulunan integre ve defektif HPV DNA'sından açıklanmakta ve normal hücrel tümör baskılayıcı gen ürünlerine bağlanan proteinleri şifrelemektedirler. Malignansın tam olarak ortaya çıkması konakçı DNA'sının istikrarsızlığının ortaya çıkardığı hücrel onkogen aktivasyonunun da sonucu olabilir (2,6,7).

HPV enfeksiyonlarında iyileşmede hücrel immünite önemlidir. Bu nedenle immün sistemi normal olan kişilerde, HPV enfeksiyonları zaman içinde kendiliğinden iyileşebilmektedir. Diğer taraftan, immün sistemi primer veya sekonder nedenlerle bozulmuş hastalarda siğil, vulva ve serviks karsinomları gibi HPV enfeksiyonları daha sık görülmelerinin yanı sıra, klinik olarak daha ağır gidişli olmaktadır (7).

2.5. KLİNİK GÖRÜNÜMLER

Papillomavirüsleri insanlarda çok çeşitli siğillere neden olmaktadır (2). Bunlardan genital siğiller (kondiloma aküminatum) cinsel ilişki ile bulaşan hastalıklar arasında önemli bir yer almaktadır (6). HPV-kanser ilişkisi çok önemli bir boyutudur (Tablo 1).

Tablo 1. İnsan Papillomavirüslerin oluşturdukları Hastalıklar

Bölge	Klinik Sunum	Tipler ^a
Genital Kanal	Condyloma acuminatum	6, 11, 42, 43, 44, 45 ve diğerleri
	Genital kanserler	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56
Solunum Kanalı	Respiratuvar papillomlar	6, 11
Ağız	Fokal epitelial hiperplazi	13, 32
	Oral papillomlar	6, 7, 11, 16, 32
Deri	Plantar siğiller	1, 2, 4
	Siğil	2, 4 ve diğerleri
	Yassı siğil	3, 10, 28, 41
	Kasap siğili	7
	EV ^b	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 20 19, 25, 36, 46, 47

^a Koyu olanlar yaygın tiplerdir

^b Epidremodysplasia verruciformis'teki malignan değişikliklerde, şimdiye kadar en fazla tip 5 ve 8, daha az olarak da 17, 20 ve 47 sorumlu tutulmaktadır.

HPV. İnfeksiyonları ile vulva, serviks, penis ve anüsün premalin ve malin hastalıkları arasında kuvvetli bir ilişki bulunmaktadır (7). HPV infeksiyonlarının klinik belirtileri geniş bir spektruma sahiptir; infeksiyonlar bazen semptomsuz ve benign seyrederken, zaman zaman da tekrarlayıcı ve tedaviye direnç gösteren, sürekli proliferasyon ile giden bir tablo göstermektedir. Bunlardan bazıları kansere dönüşebilir. Değişken klinik tablo, virüs tipine (Örneğin HPV 16 ve 18 invazif karsinom ile ilişkilidir), lezyon lokalizasyonuna (respiratuvar papillomatozis gibi),

bireyin immünolojik durumuna (gebeler ve immün yetmezliği olanlarda daha ağır tablo) ve epitelin doğasına bağlıdır (6).

Genital İnfeksiyonlar

Genital bölge infeksiyonlarından 5 ana HPV tipi (HPV tip 6, 11, 16,18 ve 31) sorumludur. Genital bölge infeksiyonlarında genellikle birden fazla bölge tutulur ve bu hastaların %50'sinde farklı HPV tiplerine rastlanabilmektedir. İnfekte kadın hastaların partnerlerinin %65'inde aynı HPV tipi izole edilebilir (7,8,20). HPV bulaştıktan sonra 2-6 aylık bir kuluçka devresini takiben genital bölgede ve/veya anüs etrafında sayıları ve büyüklükleri değişken siğillerin oluşmasıyla belirti verir. Belirtiler bireysel özelliklerden oldukça etkilenir ve özellikle erkeklerde infeksiyon tümüyle belirtisiz seyredebilir. Kadınlarda da belirtisiz seyredebilir, ancak "belirtisiz" seyreden bu durumlarda kolposkopi yapılarak servikte çok ufak çaplı kitleler saptanır. Özellikle kadınlarda bazı durumlarda vajina-anüs arası bölgeyi, anüsü ya da vajinayı tümüyle dolduran karnıbahar görünümlü dev kitlelere de rastlamak mümkündür. Oral-genital seks uygulamalarında ağız mukozasında da lezyonlar ortaya çıkabilir (6,7). Genital sistem HPV infeksiyonunun prevalansı oldukça yüksektir ve alt genital sistem malignansileri, özellikle servikal kanserle ilişkisi saptanmıştır. İnfekte anneden intrapartum HPV geçişi ile çocukta solunum yolu papillomu gelişebileceği gösterilmiştir (6).

Genital kanalın pek çok infeksiyonu subkliniktir. Birkaçı önemli klinik tablolara yol açar. Dış genital yüzeylerde, perineumda, vajinal iç yüzeyde, peniste ve anüste bulunan büyük, nemli ve saplı yumuşak papillomlar, **condyloma acuminatum**, anogenital warts ve exophytic warts gibi isimlerle anılmaktadır. Bunlar çoğunlukla HPV tip 6 ve 11 tarafından meydana getirilmektedir (7,19). Bu tiplerle oluşan lezyonlar

malign kalabilir (6). Servikte ise tip 6 ve 11 tarafından oluşturulan düz siğiller (flat wart) ise **condyloma planum** olarak isimlendirilmektedir (2).

Genital organların HPV infeksiyonları cinsel yolla bulaşan hastalıklar arasında önemli bir yer almaktadır. Kadın genital sisteminin genellikle tip 16 ve 18 serviks kanserinin etyolojisinde rol aldığı epidemiyolojik ve moleküler biyolojik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Serviksin bütün kanserlerinin %90'dan fazlası HPV DNA'sına sahiptir ve bu DNA genellikle tip 16 veya 18'e aittir. Aynı tipler vulva, vajina, penis veya anüs karsinomlarıylada ilişkili bulunmuştur. Servikal kanser lezyonuna öncülük eden, displazi veya servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) ve primer kondiloma lezyonlarının çoğuna bu tipler neden olmaktadır (6,19, 20).

Displazilerde %50-70 oranında kendiliğinden iyileşme kaydedilmiştir. Kansere gidişte HPV varlığının yanı sıra servikal kanser etyopatogenezinde tanımlanan diğer risk faktörlerinin (*Herpes simplex virus*, *cytomegalovirus* ve paraziter infeksiyon, onkojen ekspresyonu, sigara, diyet ve immün sistemde değişiklik, cinsel aktivite özellikleri) bu süreci etkilediği öne sürülmektedir (6,7). Servikal kansere gidiş genellikle hafif displazi CIN I (atipik hücreler epitelin 1/3 alt kısmını kaplar), orta displazi CIN II (atipik hücreler epitelin alttan 2/3'lük kısmını kaplar), ileri derece displazi CIN III şeklinde ilerler, daha sonra yaygın displazi ve karsinoma *in situ* gelişir. Bu sürecin süresi hakkında çelişkili raporlarla birlikte HPV tipinin de etkili olduğu ve 20 yıla kadar uzadığı bildirilmektedir (19, 21). Tedavi edilmeyen karsinoma *in situ* (CIN III)'nun yaklaşık %30 oranında invazif karsinoma gelişir (19).

Respiratuar Papillomatöz

Genellikle çocuklarda bazan genç yetişkinlerde, çok nadir olarak genital HPV tipleri solunum kanalını da infekte edebilmekte ve larinkste lezyonlar oluşturmaktadır. Bu genital tiplerce neden olunan papillomlar bazen konjonktivada da gözlenmektedir. Larengeal papillomalar larenksin en iyi huylu epitelyal tümörüdür. Ancak solunum yolu tıkanmasına neden oldukları için çocukluk çağının en tehlikeli tümörlerindedir (6).

Oral İnfeksiyonlar

Ağız kavitesinin en sık görülen benign epitelyal tümörü tekli oral papillomlardır ve her yaş grubunda görülebilir. Yüzeyleri düzensiz papiller görünümdeki bu solid tümörler cerrahi müdahale sonrası nadiren tekrar oluşabilir (6).

HPV tip 13 ve 32 ağızda çoğul nodüler lezyonlar yapmakta ve özellikle eskimolarda, Güney ve Orta Amerika yerlilerinde yaygındır. Tip 6, 11 ve 16'nın oluşturduğu oral papillomlar ise cinsel olarak bulaştırılmaktadır. Dudaklardaki yaygın siğiller genellikle HPV tip 2 tarafından oluşturulmaktadır. Oral karsinomların küçük bir kısmında HPV-16 DNA'sı bulunmuştur (7,8).

Deri Siğilleri

Okul çocuklarının ve genç yetişkinlerin yaklaşık %10'unun derilerinde siğillere rastlanmıştır ve bu siğiller bir bireyden diğerine temas ile (örneğin; sportif faaliyetler sırasında vücut teması) geçebilmektedir (6,22). Siğiller genellikle iki yıl içinde geriler (22). El ve diz gibi bölgelerde bulunan yaygın siğiller (common warts) sürtünmeye maruz kalır ve sert yüzeyle kalkık papillomlar şeklindedir. Bu lezyonlar genellikle HPV tip 2 veya 4 tarafından meydana getirilirler (2). Tip 7 ise kasap siğili adı verilen, etle uğraşanlarda görülen ve mesleki bir hastalık olan siğillerin etkenidir

(2,23). Düz siğiller (flat warts) basit siğil olarak da adlandırılır ve küçük, düz yüzeyle ve daha çok sayıda bulunurlar. Bunlara daha çok gençlerin kol, yüz ve dizlerinde rastlanır ve tip 3 ve tip 10 tarafından oluşturulur (2,6,23). Plantar siğiller ağırlı derin endofitik siğillerdir ve topuk ve tabanın ağırlığa maruz kalan bölgelerinde bulunur. Palmar siğillerde bunlara benzer ve genellikle tip 1 majör etiyolojik ajandır (2). Yüzme havuzu gibi ortamlarda özellikle plantar verruka geçişi olabilmektedir. Deri insan papillomavirüsleri oldukça benign ve kendiliğinden iyileşen papillom oluştururlar ancak nadiren, “epidemodisplasia verruciformis” gibi az rastlanan derinin skuamoz kanserine ilerleme gösterebilir (6).

Epidermodysplasia verruciformis otozomal resesif kalıtsal hücresele immun yetmezliğı bulunanlarda rastlanan tam olarak tanımlanmamış nadir bir şeklidir. Çocuklukta kazanılan ve ömür boyu devam eden infeksiyon, deri üzerinde geniş biçimde yayılan çok sayıda siğillerle karakterizedir (2, 24-26). Lezyonlar, normal çocuklardaki gibi çoğunlukla tip 3 ve 10 tarafından oluşturulan düz siğiller ve kırmızı-kahverengi maküler soyulan lekeler olmak üzere iki türdür. Bu hastalarda 20 HPV (HPV tip 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20 ve 25 gibi) tipinden her hangi biri izole edilebilir (2, 25, 27). Bütün epidermodysplasia verruciformis hastalarının yaklaşık 1/3'ünde, yıllar içinde, skuamoz hücre karsinomu (squamous cell carcinom: SCC) ortaya çıkmaktadır. Bu durumda, derinin güneş ışığına maruz kalan bölgelerinde, bir veya daha fazla maküler lezyonlar gözlenmektedir. Dolayısıyla, güneş ışığının malignantlığın ortaya çıkışında kiritik bir kofaktör olarak görev yaptığı ifade edilmektedir. Tümörler genellikle HPV tip 5, 8 ve 14 genomunu taşımaktadır ve genellikle yavaş büyüyen *in situ* karsinom özelliğindedir. Bunlar, metastaz yapan invaziv SCC'de olabilirler (2, 6). Böbrek transplantasyonu yapılan kronik olarak immun sistemi baskılanmış hastaların bir kısmında ve immün sistemi yetkin bireylerin derilerinin güneşe maruz kalan

bölgelerindeki SCC'lerde HPV 5 ve 8 DNA' sıda bulunmuştur. Ancak, etiyolojik bir ilişki henüz kurulamamıştır (2).

2.6. LABORATUVAR TANISI

Klinik olarak, dış genital yüzeylede bulunan deri siğillerin ve condyloma acuminata'nın tanısında bir güçlkle karşılaşılmaz. Ancak, malignantlik ihtimali varsa histolojik inceleme gerekmektedir. Kolposkopi ile görüntülenen servikal kondilomlar genellikle düz yüzeyle olduğundan servikal intraepitelial displaziden ayırt edilemezler (2, 7).

HPV enfeksiyonun muhtemel tanısı mikroskopik olarak histolojik muayenede koikilositozun gösterilmesi ile konabilir. Alınan örneklerde bulunabilecek papillomavirüsü ortak antijenin araştırılmasında genellikle peroksidaz-antiperoksidaz immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanılmakta ve örneklerin yaklaşık yarısında bu antijen bulunmaktadır. Viral enfeksiyon varlığını gösteren karakteristik sitolojik değişikliklerin Papanicolau boyası ile saptanması servikovajinal hücrelerde tarama amacı ile kullanılmaktadır (6, 7, 21).

Papillomavirüs partikülünün antijenik özellikleri tümüyle bilinmemektedir. Bununla birlikte, viral partiküllerin deterjanlar veya indirgeyen maddelerle denatüre edilmesiyle, majör kapsid proteinlerin ortasındaki genusa özgül antijenik determinanlar elde edilebilmektedir. Bu antijen genusa özgül olduğu için, gruptaki bütün üyelerle çapraz reaksiyon verir. Papillomavirüslerinin bu ortak grup antijenine karşı hazırlanan antiserumlar HPV enfeksiyonlarının immünohistokimyasal tanısında kullanılmaktadır (7).

İnsan papilloma virüsleri son zamanlarda hücre kültürlerinde üretilmelerine rağmen, papillomavirüs infeksiyonlarının laboratuvar tanısında virüs izolasyonu uygun bir yaklaşım değildir. Hücre kültürleri keratinosit farklılaşmasını artırmak için forbol esteri TPA ile muamele edilmiş infekte deri parçasının yüzer biçimde kültürleriyle gerçekleştirilmektedir. Viral replikasyona sadece tam olarak farklılaşmış ve üremeyen skuamöz epitel hücrelerinde, virionlar ve kapsit proteinlerini, deri siğillerinin sadece dış keratinize katmanlarında göstermek mümkündür. Ancak, HPV genomu bazal hücrelerde yıllarca persistan kalabilir. Bu durumda DNA iyi huylu papillom veya premalignant servikal displazilerde epizom olarak veya kanser hücrelerinde integre bir halde kalır ve daimidir. Dolayısıyla, HPV infeksiyonu ihtimalini tanıda kaçırmamak ve tümör oluşumunu daha erken safhada belirlemek için filter *in situ* hibridizasyon (FISH), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), hybrid capture sistem, HPV profil testleri gibi çeşitli moleküler biyolojik yöntemler geliştirilmiştir (28). Nükleik asit hibridizasyon yöntemleri, hali hazırda başta kondiloma ve servikal karsinom olmak üzere rutin ve araştırmalarda uygulanmaktadır (2, 7, 10).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Düşük sayıdaki genom kopyasını bulmada en duyarlı metod olarak bilinen PCR amplifikasyonu ile, bilinen tüm mukozal HPV genotipleri belirlenmektedir. Klinik olarak HPV infeksiyonu tanısında önemli olan nokta subklinik ve latent infeksiyon ayrımının yapılabilmesidir. (2, 29) ancak çok az miktarda HPV DNA'sının saptanmasının klinik tablo ile ilişkisi henüz bilinmemektedir. PCR pozitifliği, infeksiyondan ziyade doku yüzey kontaminasyonuna da bağlı olabilir. Klinik tablo ile uyumlu viral DNA miktarının belirlenmesi ve PCR amplifikasyonu dikkatle yorumlanması gerekmektedir (2, 29). Geçirilmiş veya geçirilmekte olan HPV infeksiyonunu göstermede güvenilir serolojik bir test olmaması ve

virus izolasyonunun yapılamaması nedeniyle, kesin tanı HPV DNA' sının örnekte gösterilmesine dayanmaktadır (21).

DNA hibridizasyon teknikleri

DNA hibridizasyon teknikleri arasında “dot blot”, “slot blot”, “FISH”, *in situ* hibridizasyon gibi moleküler yöntemler yer almaktadır. Dot blot hibridizasyon yöntemi hızlı olmasına rağmen 10,000 HPV DNA kopyasının daha azını belirleyememektedir. Bu alanda Southern-blot hibridizasyon, dot blot hibridizasyona yakın duyarlılığı, virus genomunun genetik yapısı ve konak hücredeki durumu hakkında verdiği bilgiler nedeniyle altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu metot yüksek duyarlılık ve özgüllükte olup bir hücredeki tek bir HPV genomu kopyasını belirleme kapasitesine sahiptir Ancak, laboratuvar işlemlerinin ağırlığı, fazla miktarda doku gerektirmesi ve tesbit edilerek saklanmış doku örneklerinde DNA'nın kırılma olasılığı nedenleriyle rutin taramalarda uygulanması uygun değildir. *In situ* hibridizasyon yöntemi de jinekolojik örnekleri taramak amacıyla uygulanmaktadır. Bu yöntem ile infekte hücrelerin belirlenebilmesi için hücre başına 50-200 HPV kopyası gerektirmektedir. Servikal sürüntüler, frozen kesitler ve hatta formalin ile tesbit edilmiş kesitler lam üzerinde bu metotla çalışılmaktadır. Bu metodun da duyarlılığı düşüktür. Ancak, tümörün veya epidermisin belirli katmanlarındaki viral genomun topoğrafik lokalizasyonunu otoradyografi ile ortaya çıkarma avantajına haizdir (2, 3, 6, 10, 30-32). Hibridizasyon yöntemlerinden hybrid capture sistemi, PCR'a göre özgüllüğü nisbeten azdır, fakat en yaygın anogenital HPV tiplerinden 14'ünü belirleyebilmektedir (33).

2.7. EPİDEMİYOLOJİ

HPV'ler, fiziksel ve kimyasal ajanlarla inaktivasyona dirençlidirler ve bu nedenle kontamine olmuş yüzeyler ve eşyalarla geçiş mümkündür. Bazal hücrelerin infeksiyöz virüsle karşılaşmasının seksüel temas veya deri abrazyonu gibi epitelin minor travmaya maruz kalması ile olduğu düşünülmektedir. İnfekte anneden çocuğa intrapartum geçiş ve çocukta solunum yolu papillom oluşumu da gösterilmiştir (6).

Lezyon lokalizasyonu, infeksiyöz virüs partikül miktarı, travmanın şiddeti, HPV tipi ve bireyin bağışıklık durumu HPV'nin geçişini etkileyen faktörlerdir. Hücresel immünitesi baskılanmış kişiler HPV infeksiyonuna duyarlıdırlar. Örneğin, HPV infeksiyonu immün sistemi baskılayıcı tedavi alan hastalarda normal popülasyona kıyasla daha fazla görülmektedir (6).

Deri HPV enfeksiyonlarının 3 tipi toplumda çok yaygın olarak görülmektedir. Kısaca siğil adı verilen adi deri siğilleri, daha çok okul çağındaki çocuklar arasında, %4-20 oranında görülmekte ve deri siğillerinin %71'ini oluşturmaktadır. Planter siğilde ise deri siğillerinin %34'ünü oluştururlar ve daha çok adolesan ve genç erişkinlerde saptanırlar. Çocuk tipi veya diğer adıyla düz siğiller, deri siğilleri içinde %4 oranında görülürler (7).

Deri siğillerinin bulaşması temel olarak okul çağındaki çocuklarda sıyrıklardan direkt temasla geçmektedir. Bu temastan sonra kaşıma yoluyla (otoinokülasyon) yayılım gerçekleşmektedir. Çocuk ve genç yetişkinlerde %10'lara varan insidanda verrukalar görülür (plantar), erişkinlerde daha nadir saptanması kazanılmış immüniteye bağlı olabilir (2, 6). Plantar siğiller, halka açık yüzme havuzları veya tuvaletlerin ıslak zeminlerinden kolayca bulaşmaktadır (2).

Genital siğiller, cinsel ilişki ile bulaşıp, seksüel yaşamı aktif bireylerde görülmektedir. Anogenital ve servikal lezyonlarda farklı HPV tipleri gösterilmesine rağmen eşler arasında aynı tiplerin varlığı gösterilmiştir. Kondilomlu eşler ile cinsel ilişkide bulunanların yaklaşık 2/3'ünde anogenital siğil gelişmektedir. (6, 8, 10). Çocuklardaki anogenital siğiller, nongenital lezyonlara temas ile gelişmekte ve kondiloma aküminatumu olan puberte öncesi dönemdeki çocukların çoğunda HPV-6 ve HPV-11, %7'sinde de HPV-1 ve HPV-2 tipleri saptanmaktadır (8, 34).

Serviks karsinoması ABD'de her yıl 4900 ölüm ile sonuçlanan yaklaşık 15700 yeni olgu ile kadınlarda kötü huylu ikinci en yaygın kanserdir. Servikal kanser hücrelerinin %90' ından fazlası, başta HPV 16, 18 ve 31 tipler olmak üzere, HPV DNA'sı ile birlikte HPV mRNA'sı da içermektedirler (8, 35). Bu ilişki epidemiyolojik olarak da belirgindir. Örneğin servikal sitolojisi normal olup da HPV DNA'sı pozitif bulunan kadınların 2 yıl sonra %28'inde servikal neoplaziler saptanmasına karşın, HPV DNA'sı negatif olanlarda bu oran %3 kadardır. Aynı şekilde HPV tip 16 ve 18 DNA'sı içeren kadınlarda servikal neoplazi gelişme riski, HPV DNA' sı içermeyenlere göre 11 kat daha fazla bulunmuştur (8).

Oral ve respiratuar papillomatozların bazıları da cinsel orijinli olabilir. Ancak, genç çocuklarda bu infeksiyonların çoğunun infekte doğum kanalından bebeğin geçişi sırasında kazanıldığı varsayılmaktadır. Bu yolla bulaşmanın etkinliği düşüktür. Bu kaniya servikal infeksiyonun yüksek sıklığına karşın laringeal papillomatozun nadirliği göz önünde bulundurularak varılmaktadır. Bu düşüncüyü destekleyen en güçlü kanıt, solunum yolları papillomları ve anogenital siğillerde aynı HPV tiplerinin (HPV 6 ve 11) saptanmasıdır .Diğer taraftan, sezaryen ile alınan bebeklerde de larinks papillomlarının görülmesi, virüsün *in utero* da bulaşabileceğini göstermektedir (2, 8).

2.8. TEDAVİ VE KORUNMA

Günümüzde infeksiyöz lezyonlarla temas etmeme dışında etkili bir korunma yöntemi bulunmamaktadır. Kondom gibi araçların korunmada bir miktar olumlu katkısı vardır. Cinsel eşlerin birlikte muayene ve sağaltımları, düşünüldüğü kadar etkin değildir. Ancak HPV'nin bulaştırıcılığı o kadar yüksektir ki, şüpheli ilişkilerde kondom kullanımı bile yetersiz kalmaktadır. Kadınların her yıl pap sürüntüsü aldirmaları, yangısal reaksiyon ile birlikte hücresel değişiklikler görülmesi halinde sürüntünün 3 ay sonra tekrarı ve yine sitopatolojik bozukluklar devam ediyorsa jinekolojik belirti ve bulguların çok iyi bir şekilde değerlendirilmesi yerindedir (13).

HPV enfeksiyonunun tedavisinde temel prensip, nüksleri en aza indirmek için kitlelerin mümkün olduğunca temizlenmesidir. Bu amaçla virüslere etkili ilaçlar kullanılarak lokal tedavi ve büyük lezyonların koterizasyon yoluyla yakılması şeklinde tedavi uygulanır (7).

Deri siğilleri kendiliğinden iyileşmekte, geleneksel tedavi yöntemleri olarak krioterapi, yakıcı ajanların uygulanması (podofilin, triklorasetik asit v.s.), DNA inhibitörlerinin kullanımı (5-florourasil gibi) ve cerrahi müdahaleler yer almaktadır. Bu yöntemlerin uygulanması ile kür oranı %90'ı geçmesine rağmen HPV'ler latent olarak kalabilir ve tekrarlayabilirler (2, 6, 8).

Refrakter genital siğillerin tedavisinde parenteral veya lezyon içine interferon uygulanması başarılı bulunmuştur. Solunum yolu papillomlarında interferonun sınırlı faydası görülmüştür, bunların tek tedavisi cerrahidir (6, 13). Laringeal papillomlarda lazer, dış genital yüzeyindeki siğillerde kriyoterapi ve podofilin (Etki mekanizması tam bilinmeyen podofilinin %10'luk solüsyonu) uygulanmaktadır. Podomotoksin, podofilinden daha etkilidir. Laringeal papillomlar, dış

genital siğilleri ve servikal displaziler lazer veya diatermi ile ortadan kaldırılabılır. İnvaziv karsinomlarda, cerrahi müdahale gerekmektedir. Lezyon içine enjekte edilen alfa/beta interferon, genital veya laringeal papillomların geçici olarak gerilemesinde etkin olabilmektedir (7, 8).

HPV infeksiyonlarında immünizasyon çalışmaları (özellikle sığır papillomaviruslarında) yoğun bir şekilde devam etmektedir (12). Hayvan çalışmalarında rekombinant proteinler (HPV 16 L1 ve L2 genleri kontrolünde sentezlenen kapsit) kullanılarak geliştirilen aşılar da korunma elde edilmiştir. HPV 16 E6/E7 genlerini içeren benzer aşı rekombinantları insanlarda uygulanmaktadır. Bu çalışmaların beklentisi rekombinant aşı virüslerinin sitotoksik T hücresi yanıtını artırmasıdır. Rekombinant virüsleri, eğer servikal intraepitelial neoplazi veya invaziv karsinoma hücrelerinin yüzeyinde sunulan E6/E7 peptidlerini hali hazırda tanıyıp cevap hazırlayan sitotoksik T hücresi yanıtlarına booster etkileri söz konusu olursa, bu rekombinant aşıları tedavi amaçlı olarak da kullanmak mümkün olabilecektir. İmmünpatogenezin de aydınlatılması ile birlikte gelecekte etkin bir aşı bulunması mümkün gözükmektedir (2, 6, 36, 37, 38)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.ÖRNEĞİN TOPLANMASI

Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine başvuran menapoz öncesi 152 ve menapozlu 24 sağlıklı ve serviks kanserli 4 kadından alınan endoservikal örnekler, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji laboratuvarına taşıma besiyeri içinde gönderildi. Bu örnekler çalışılıncaya kadar -20°C'de prezervatifsiz olarak muhafaza edildi.

3.2. İNSAN PAPİLLOM VİRÜS (HPV) DNA'SININ BELİRLENMESİ

Hastalardan alınan endoservikal örneklerde kalitatif olarak HPV DNA'sının belirlenmesi için bir hibridizasyon yöntem olan Hybrid capture sistemi (Digene) uygulandı. Örnekler orta ve yüksek risk grubu HPV genotipleri (HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, ve 56) yönünden araştırıldı.

Hybrid capture sistem kitlerinin içeriği:

- DNA içeren negatif kontrol
- 10 pg/ml HPV 16 DNA ve taşıyıcı DNA içeren pozitif kontrol
- Denatürasyon solusyonu (dilüe NaOH) ve indikatör boya
- Prob dilüenti
- HPV 16/18/31/33/35/45/51/52/56 RNA probu
- Detection reagent 1: Alkalen fosfataz ile bağlı anti-RNA:DNA
- Detection reagent 2: LumiPhos 530
- Yıkama solüsyonu
- Hibridizasyon tüpü
- Anti-RNA:DNA ile kaplı tüpler

3.2.1. Testin Prensibi

Servikal örneklerde, düşük risk grubu (HPV tip 6,11, 42, 43, 44) ve orta/yüksek risk grubu (HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56) HPV genotiplerin DNA'larının belirlenmesinde kullanılan hybrid capture sistemi, kemilüminesan tespit yöntemini kullanan moleküler hibridizasyon yöntemidir. Bu sistem, örnekteki hedef DNA ile buna özgül RNA probunun oluşturduğu RNA:DNA hibridi, anti-RNA:DNA hibridi antikoru ile kaplanmış tüpün yüzeyinde tesbit edilir. İmmobilize edilen hibrit, daha sonra alkalen fosfataza bağlanmış anti-hibrit antikoru ile reaksiyona girer ve kemilüminesan substrat ile tesbit edilir. Substrat, bağlı alkalen fosfataz tarafından parçalandıkça ışık yayılır ve bu ışık luminometre ile RLU (bağlı ışık birimi) cinsinden ölçülür. Yayılan ışığın yoğunluğu örnekteki hedef DNA'nın miktarı ile doğru orantılıdır.

3.2.2. Testin uygulanması

• HPV DNA Denatürasyonu

Kit ve toplama tüplerine alınan servikal sürüntü örnekleri oda ısısına gelene kadar bekletildi. Hastadan alınan örnekler, pozitif ve negatif kontrol örnekleri numaralandırılarak bir süpöreye dizildi. Örnek ve kontrollerin herbirinin homojen hale gelmesi için karıştırıcıda karıştırıldı.

Negatif kontrole 1 mL, pozitif ve servikal sürüntü örneklerine 500 µL olmak üzere "denaturation reagent" eklendi. Tüplerin kapakları kapatıldı ve hafifce karıştırıldı. Bütün tüplerin renkleri mor renge dönüşmesi izlendi. Denatüre olan karışım $65\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda 45 dakika inkübe edildi.

• HPV DNA:Prop RNA Hibridizasyonu

Pozitif ve negatif kontroller için 3'er adet olmak üzere hibridizasyon tüpleri hazırlandı. Hazırlanan hibridizasyon tüplerine "repetör" pipeti kullanarak 50 µL HPV RNA prob kokteylinden eklendi. Örnek ve kontrollerden hazırlanan denatüre HPV DNA'dan 150 µL alınarak hazırlanan hibridizasyon tüplerine eklendi. HPV DNA: prop RNA hibridi oluşturularak sarı renk oluşumu gözlemlendi. Çalkalayıcı ile 1100 rpm'de 3 ± 2 dakika çalkalandı. $65\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda bir saat inkübe edildi.

Hibridizasyon tüplerinin içeriğinin (HPV DNA: prop RNA hibridi) tümü (250 µL) anti-RNA:DNA ile kaplı yakalama tüplerine sırasıyla aktarıldı ve tüplerin ağzı parafilmle kapatıldı. Çalkalayıcı ile 1100 rpm/dakika oda ısısında 60 ± 5 dakika çalkalandı. Tüplerin içi boşaltıldı ve 1-2 dakika kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kurutulması sağlandı.

- **Hibridlerin ölçümü**

Her bir yakalama tüpüne 250 µl “deteksiyon solusyonu 1: alkalen fosfataz ile bağlı anti-RNA:DNA” dağıtıldı. Tüplerin ağzı parafilm ile kapatılarak oda ısısında 30±3 dakika inkübe edildikten sonra tüplerin içeriği boşaltıldı. Tüpler yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı ve tüplerin kuruması sağlandı. Bu tüplere 250 µL substrat “deteksiyon solusyonu 2: LumiPhos 530” dağıtıldı. Tüplerin ağzı parafilm ile kapatılarak karanlık ortamda oda ısısında 30±3 dakika inkübe edildi. Kontroller ve hasta tüplerinin altı temiz bir gazlı bezle silinerek luminometre cihazında (Ledard 50i, Gen-probe) okutuldu ve RLU cinsinden değerlendirildi.

3.3. İNSAN PAPİLLOM VİRÜSLERİNİN GENOTİPLENDİRİLMESİ

Serviks kanserli olguların serviksinden alınan 5 mm genişliğindeki biyopsi örnekleri, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında parafin bloklara alındı. Genotiplendirme Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapıldı.

DNA saflaştırılması: Örnekler, 0.1 mg/mL proteinaz K içeren lizis solusyonu (150 mM NaCl, 25 mM Etylen ediamine tetraaceticacid EDTA, 10 mM Tris HCl pH 8.0, %0.5 Sodyum dodesil sülfat, SDS) içinde 1 saat 60°C’de, takiben 5 gün 37°C’de inkübasyonla deparafinize edildi. Fenol-kloroform yöntemi ile DNA saflaştırıldıktan sonra sodyum asetatlı saf etanolde -20 °C’de bir gece çöktürüldü. DNA çökeleği kurutulduktan sonra 50 µL steril iyonsuz (tri distile) su ile süspanse edildi (39). Bu süspansiyondan 5 µL DNA amplifikasyonda kullanıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR): İnsan papillomavirüsleri için bir çok primer tanımlanmış ve bunların özgül olarak HPV DNA ampfikasyonu yaptığı gösterilmiştir. Bu çalışmada kullanılan primerler HPV 16 ve 18 genomunun L1 bölgesinden (majör viral kapsid proteini kodlayan bölge) seçilmiştir. HPV 16 primer seti (5'-TGCTAGTGCTTATGCAGCAA-3', 5'- ATTTACTGCAACATTGGGTA-3') 152 baz çifti (base pair, bp), HPV 18 primer seti (5'-AAGGATGCTGCACCGGCTGA-3', 5'-ACGCACACGCTTGGCAGGT -3') 216 bp uzunluğunda segmentleri amplifiye etmektedir. Pozitif kontroller sırasıyla 1-2 HPV 16, 600 HPV 16 ve 10-50 HPV 18 genom kopyası içeren SiHa, Caski ve HeLa 53 hücreleri kullanıldı. Her amplifikasyon işlemine negatif kontrol olarak DNA içermeyen reaksiyon karışımı da dahil edildi.

Amplifikasyonlar; 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂, bir birinden 200 µM olmak üzere dNTP: Deoksi nükleotid tri fosfat (dATP: deoksi adenin tri fosfat, dCTP: deoksi sitozin tri fosfat, dGTP: deoksi guanin tri fosfat ve dTTP: deoksi timin tri fosfat), 50'şer pmol HPV 16 ile HPV 18 primer (Primerler: Diagnostic SSDZ, Molecular Biology Section, Delft, The Netherlands'den temin edilmiştir) ve 2 ünite taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimeraz enzimi (Promega) içeren karışımın 100 µL'sine saflaştırılmış DNA örneğinden 5 µL eklenerek gerçekleştirildi. Amplifikasyonlar "thermalcyler" (Cetus 480) içinde, 95°C'de 5 dakika denatürasyonu takiben 50 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika ve 95 °C'de 1 dakika basamaklarından oluşan 40 döngü ve son olarak 5 dakika 72°C'de tutularak gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürününden 10 µL, 5 µL orange G boyası ile karıştırılıp etidyum bromid içeren %2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra ultraviyole (UV) transiluminatör altında HPV 16 için 152, HPV 18 için 216 bp büyüklüğüne denk gelen band aranarak analiz edildi (39).

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizlerde 'SPSS (Statistical Package for Social Siences) 9.0 paket programında ki-kare (beklenen sayılar 5'ten küçük ise Fischer exactly X^2) testi kullanıldı.



4. BULGULAR

4.1. HPV DNA BULGULARI

Kayseri'de menapoz öncesi 152 ve sonrası 24 sağlıklı ve 4 serviks kanserli olmak üzere toplam 180 kadından alınan endoservikal örneklerde, HPV DNA "Hybrid Capture" hibridizasyon yöntemiyle araştırıldı. Alınan endoservikal örnekler yüksek risk HPV genotipleri (HPV tip16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56) yönünden incelendi.

Toplam 180 örneğin 13'ünde HPV DNA pozitif bulundu. Bulgular Tablo 2'de özetlendi.

Tablo 2. Menapoz öncesi ve sonrası sağlıklı ve serviks kanserli kadınlardan alınan endoservikal örneklerde HPV DNA bulunma oranları

		HPV DNA negatif	HPV DNA pozitif
		Sayı	Sayı
Sağlıklı kadınlar	(n:176)	167	9
Menapoz öncesi	(n:152)	145	7
Menapoz sonrası	(n:24)	22	2
Servikskanserli kadınlar	(n:4)	0	4
Toplam	(n:180)	167	13

*Menapoz öncesi sağlıklı görünen olgular ile menopoz sonrası sağlıklı görünen olgularda HPV DNA bulunma oranları arasındaki istatistiksel analiz: $p>0.05$
Menapoz öncesi/sonrası sağlıklı görünen olgular ile serviks kanserli hastalarda HPV DNA bulunma oranları arasındaki istatistiksel analiz: $p<0.05$*

Menapoz öncesi 152 sağlıklı görünen kadından alınan örneklerin 7'sinde (%4.6), menopoz sonrası sağlıklı görünen 24 kadından alınan örneklerin 2'sinde (%8.3) ve serviks kanserli 4 hastadan alınan örneklerin hepsinde (%100) HPV DNA pozitif bulundu. Menapoz öncesi ve sonrasında HPV DNA bulunma oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Sağlıklı görünen 176 olgunun 9'unda, serviks kanserli 4 hastanın hepsinde HPV DNA pozitif bulundu. Menapoz öncesi/sonrası sağlıklı görünen olgular ile serviks kanserli hastalarda HPV DNA bulunma oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı idi ($p<0.05$).

4.2. HPV GENOTİP BULGULARI

Serviks kanserli 4 olgudan parafin bloklara alınan servikal biyopsi örneklerinde, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalında, PCR yöntemi ile orta ve yüksek risk grubu HPV genotiplendirilmesi yapıldı. Serviks kanserli hastaların hepsinde (4 olgunun dördünde) HPV genotip 16 bulundu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Genital organların HPV infeksiyonları cinsel yolla bulaşan hastalıklar arasında önemli bir yer almaktadır. HPV'ler kadınlarda görülen servikal kanserin etiyopatogenezinde sorumlu olabileceği ilk defa zur Hausen (19) tarafından ileri sürülmüş ve daha sonra servikal kanserle ilişkili 20 farklı genital HPV tipi bildirilmiştir. Genital HPV infeksiyonları, özellikle HPV genotip 16 ve 18'in sebep olduğu infeksiyonlar servikal kanser patogenezinde en önemli risk faktörü olup kadınlar için major sağlık problemi olarak kabul edilmektedir. Serviks kanserlerinin %90'dan fazlasında HPV DNA bulunmakta ve bu DNA'ların genellikle HPV genotip 16 veya 18'ya ait olduğu bildirilmektedir (40, 41).

Kansere gidişte HPV varlığının yanı sıra servikal kanser etyopatogenezinde tanımlanan diğer bir çok kofaktörün de etkili olduğu düşünülmektedir. Bu kofaktörler arasında *Herpes simplex virus*, *Cytomegalovirus* ve *Chlamydia trachomatis* gibi venerial yolla geçen infeksiyöz ajanlar, sigara kullanımı, diyet ve immün sistemde değişiklik, cinsel aktivitenin başlangıç yaşı ve sıklığı ile eş sayısı, sosyoekonomik şartlar, yaş, beslenme gibi risk faktörlerinin yer aldığı bildirilmektedir (40, 42, 43, 44).

HPV enfeksiyonları sadece %30'u klinik olarak tanınabilir ve genellikle genital siğiller şeklinde görülürken, %70'i subklinik olarak seyretmektedir (45). HPV enfeksiyonlarının tanısında HPV'nin hücre kültüründe üretilmemesi, duyarlılık ve özgülüğü yüksek serolojik testlerin bulunmaması nedeniyle DNA hibridizasyon yöntemleri uygulanmaktadır (46).

ABD'de 15-50 yaş grubu içinde her yıl, her 100 kişiden birinin genital HPV ile ilişkili bir hastalığa yakalandığı bildirilmekte ve yaklaşık olarak 40 milyon kişinin HPV taşıdığı tahmin edilmektedir. Yalnız 1999 yılında rutin muayene gelen 466 hastanın 106 (%22.7)'sında ve 130 kolposkopi kliniğinden alınan örneklerin 90 (%69.2)'inde HPV DNA pozitif bulunmuştur (47). Ratman ve ark. (48) 2000 yılında 2098 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada 227 (%10.8) hastada, DeBritton ve ark. (49) Panama'da 196 servikal kanserli hastanın 144 (%81)'ünde HPV DNA'nın pozitif bulunduğunu göstermişlerdir. Tachezy ve ark.'da (50) Czech'li kadınlarda yaptıkları çalışmalarında 389 kadının 171 (%44)'inde HPV DNA pozitif bulmuşlardır.

Santos ve ark.(51) Peru'da, servikal kanserli 198 kadında (173'ü squamous hücreli karsinom, 25'i ise adenokarsinoma/ adenosquamous karsinom) ve 196 kişilik kontrol grubunda yaptıkları çalışmalarında, squamous hücreli karsinomlu hastaların 165'inde(%95.3), adenokarsinoma/adenosquamous karsinomlu hastaların 23'ünde (%92.0) ve kontrol grubunun ise 35'inde (%17.7) HPV DNA pozitif bulunmuşlardır. Zielinski ve ark. (52) 57 servikal kanserli kadının 37'sinde (%65), 114 kontrol grubununun 7'sinde (%6) yüksek risk grubu HPV genotiplerine ait DNA pozitifliğini göstermişlerdir.

Polat ve ark (53) 1996 yılında ülkemizde yaptıkları çalışmalarında servikal kanserli 22 hastanın 12 (%54.5)'sinde ve kontrol grubu olarak seçtikleri servisitli 74 hastanın 16 (%21.6)'sında HPV DNA pozitif bulmuşlardır. Ağaçfidan ve ark (54) 2000 yılında yaptıkları çalışmalarında pap smear testi atipik olarak değerlendirilen ve yaşları 20 ile 50 arasında değişen 181 kadında HPV araştırılmış ve 28 (%15.5)'inde HPV DNA pozitif bulmuşlardır.

Çalışmamızda ise menapoz öncesi sağlıklı 152, menapoz sonrası sağlıklı 24, serviks kanserli 4 olmak üzere toplam 180 kadında HPV DNA araştırıldı ve menapoz öncesi sağlıklı kadınların 7 (%4.6)'sinde, menapoz sonrası sağlıklı kadınların 2 (%8.3)'sinde ve serviks kanserli hastaların 4 (%100)'ünde HPV DNA pozitif bulundu. Menapoz öncesi ve sonrasında HPV DNA bulunma oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Menapoz öncesi ve sonrası sağlıklı görünen olgular ile serviks kanserli hastalarda HPV DNA bulunma oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$). Santos ve ark (51), Ruud ve ark. (55), Labropoulou ve ark. (56) Chen ve ark. (57)'lerinin servikal kanserli hastalarda HPV DNA bulguları çalışmamızda servikal kanserli hastalarda elde edilen HPV DNA bulguları ile uyumlu bulundu.

Zielinski ve ark (52)'nin kontrol grubu olarak aldıkları rutin muayeneye gelen kadınların endoservikal örneklerinde HPV DNA bulunma oranları ile çalışmamızdaki sağlıklı görünen kadınların endoservikal örneklerinde HPV DNA bulunma oranları arasında paralellik görüldü.

Ruud ve ark. (55) serviks kanserli 159 Rus kadının hepsinde (%100) HPV DNA pozitif ve 103 (%64.8)'de HPV genotip 16, 17 (%10.7)'sinde HPV genotip 18 ve 13 (%8.2)'ünde HPV genotip 45 genomunu bulmuşlar ve 6 (%3.8) hastada ise genotipi belirleyememişlerdir. Labropoulou ve ark. (56) Yunan'lı kadınlarda, yüksek dereceli intraepitelyal lezyondan 50 biyopsi örneğin 44 (%88)'ünde ve 14 servikal kanserli biyopsi örneğin 13 (%92.8)'de HPV DNA pozitif bulmuşlardır. Bu 44 örneğin 16 (%36)'sında HPV genotip 16, 5 (%12)'inde HPV genotip 18, 4 (%6)'ünde HPV genotip 31, 4 (%6) HPV genotip 33, 3 (%4)'sinde HPV genotip 51 olarak belirlenmiş ve 12 (%24)'sinde ise HPV genotipi belirlenememiştir. Chen ve ark. (57) Avusturalya'da yaptıkları çalışmalarında 186 servikal kanserli kadının 171'inde (% 91.9) HPV DNA pozitifliği bulmuşlar ve 100'ünde (%53.8) HPV genotip 16, 32'sinde (%17.2) HPV genotip 18 ve 39'unda (%21) diğer yüksek risk HPV (HPV genotip 31, 33, 35, 45, 51, 52 ve 56) tiplerini bulmuşlardır. Kristian ve ark.(58) Norveç'te 133 servikal kanserli biyopsi örneğinin 91 (%68)'inde HPV (bunların 70'inde HPV genotip 16 ve 19 'unda ise HPV tip 18) pozitif bulmuşlardır.

Zhang ve ark (59) 43 kanserli kadından 30 (%69.7)'unda, 28 servisit olgusundan 7 (%25)'sinde ve 30 sağlıklı kontrol olgusundan 5 (%16.6)'inde HPV genotip 16'nın varlığını göstermişlerdir. Hsu ve ark (60) Taiwan'da 50 servikal kanserli hasta biyopsi örneğinin 37 (%74)'sinde HPV DNA pozitifliği bulunurken, 20 (%40)'sinde HPV genotip 16 ve 12 (%24)'sinde HPV genotip 18 saptamışlardır. Shen ve ark. (61) 78 servikal kanserli

hastanın 52 (%66.7)'sinde HPV DNA ve bu olguların 31 (%39.7)'inde HPV genotip 16 bulmuşlardır.

Polat ve ark (53)'nın 1996 yılında yaptıkları çalışmalarında servikal kanserli 22 hastanın 12(%54.5)'sinde HPV DNA ve bunların 4'ün HPV genotip 16 ve kontrol grubu olarak seçtikleri servisitli 74 hastanın 16(%21.6)'sında HPV DNA ve bunların 13'ünde HPV genotipi 16 olarak belirlemişlerdir. Tuncer ve ark.(39)'ları 1996 yılında yaptıkları çalışmalarında 119 biyopsi örneğinde HPV 16 ve 18 genomun varlığını araştırmışlar ve bu 119 servikal biyopsi örneklerin 45(%37.8)'inde HPV 16, 11(%9.2)'inde HPV 18 genomu saptamışlardır.

Çalışmamızda ise serviks kanserli 4 olgunun hepsinde (%100) HPV genotip 16 bulunmuştur. Ülkemizde ve yurt dışında servikal kanserli hastalarda ve kontrol grubunda yapılan HPV genotip çalışmalarında elde edilen bulgular, çalışmamızda elde edilen bulguları desteklemektedir (39, 53, 59, 60, 61).

Sonuç olarak, klinik jinekolojide önemli viral infeksiyon etkenlerinden biri olan HPV tipleri ile kadınlarda yaygın olarak görülen serviks kanseri arasında kuvvetli bir ilişki olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada servikal sürüntülerde pap smear testine ek olarak daha özgün ve güvenli bir test olan "hybrid capture" sistemi ile HPV DNA ve PCR ile HPV genotiplerinin belirlenmesi klinik ve epidemiyolojik açıdan önemli olduğu belirlendi.

6. KAYNAKLAR

- 1- Howley P.M. Papillomavirinae: The Viruses and their replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M.(eds) (3th ed). Fields Virology. 1996, pp 2045-2076.
- 2-Doymaz M. Z. Papovaviridae. Medikal viroloji kitabında. Nobel tıp kitapevleri, İstanbul 1994, ss 294-304.
- 3-Kiviat NB., Koutsky LA. Human Papillomavirus. In: Murray PR,Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC,Yolken RH, eds. Manuel of Clinical Microbiology. ASM, Washington DC,1995, pp 1082-1089.
- 4-Güney, A.İ., İnce, Ü., Küllü, S., Pekin, S. ve Çırakoğlu, B. Detection and Typing of Human Papillomavirus in cervical Specimens of Turkish Women. Eur. J. Gynaec. Oncol. 1997; 18(6), pp 546-550.
- 5-Zur Hausen H, Meinhof W. Scheiber W. Bomk.amm GW. i Attempts to detect to detect virus-spesific DNA sequences in human tumors 1. Nucleic acid hydridization with complementary RNA of human wart virus. Int J Cancer 1974; 13: 650.

6-Tuncer S. İnsan Papillomavirüsleri. Ustaçelebi Ş. (ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji kitabında. Güneş Kitapevi, Ankara 1999, ss 797-802.

7- Ustaçelebi Ş. Papillomavirusları ve İnsan siğilleri. Topçu W A, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları kitabında. Nobel Kitabevleri. 1996, ss 759-61.

8-Serter D. Papovavirüsler. Virüs, Riketsiya ve Klamidya hastalıkları kitabında. Nobel tıp kitabevleri, İstanbul 1997, ss 211-219.

9-De Villiers E-M. Human pathogenic papillomavirus types:An uptade. Curr Topics in Microbiol and Immunol 1994; 186:1-12.

10-McCance DJ. Papillomaviruses. In: Zuckerman AJ., Banatvala JE., Pattison JR. eds.Principles and Practice of Clinical Virology (3th ed). 1995, pp 621-633.

11-Ustaçelebi Ş. İnsan papilloma virüsleri ve servikal intraepitelyal neoplazi. XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi bildiri kitabı, ss 140-141, 2000, Antalya.

12-Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction for the detection of genital human papillomaviruses. Cancer Cells. 1989; 7: 209.

13-Eron U, Judson F, Tucker S, et al. Interferon therapy for condylomata acuminata. N Engl J Med. 1986; 315: 1059.

14-Olson C. Animal papillomas:Historical perspectives. In: NP salzman, PM Howley (eds). The Papillomavirus. New York: Plenum Press,1987; 2: 39-46.

15-Crum CP . Barber S, Roche JK. Pathobiology of papillomavirus related cervical diseases. Clin Microbiol Rev. 1991; 4: 270.

- 16-** Buescema J, Shah K, Hsu S, Rosenshein N, Woodruff JD. Genetic investigation of the cellular origin of vulvovaginal condylomata acuminata. In: Steinberg B, Brandsma J, Taichman L, eds. Cancer cells papillomaviruses. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1987; 5:245-247.
- 17-** Friedman JM, Fialkow PJ. Viral "tumorigenesis" in man: cell markers in condylomata acuminata. *Int J Cancer* 1976; 17:57-61.
- 18-** Wemes BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990; 248: 76.
- 19-** Zur Hausen H. The role of papillomaviruses in anogenital cancer. *Scand J Infect Dis* 1990:(Suppl) 69: 107.
- 20-** Koutsky La, Galloway DA, Holmes KK. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev.* 1988; 10: 122-162.
- 21-** Schiffmann MH. Epidemiology of cervical human papillomavirus infections. *Curr Topics in Microbiol Immunol* 1994; 186: 55-81.
- 22-** Bunney M. Viral warts: Their biology and treatment, 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1992.
- 23-** Croissant O, Breitburd F, Orth G. Specificity of cytopathic effect of cutaneous human papillomaviruses. *Clin Dermatol* 1985; 3: 43-55.
- 24-** Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K. Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer Res* 1972; 32: 583-589.
- 25-** Jablonska S, Majewski S. Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. In: zur Hausen H (eds). Human pathogenic papillomaviruses. Heidelberg: Springer Verlag, 1994, pp 157-175.

- 26-**Orth G. Epidermodysplasia verruciformis. In: Salzman NP, Howley PM (eds). The papovaviridae. New York: Plenum press, 1987, 2:199-243.
- 27-**Majewski S, Jablonska S. Epidermodysplasia verruciformis as a model of human papillomavirus-induced genetic cancers: the role of local immunosurveillance. *Am J Med Sci* 1992;304:174-9.
- 28-**Terry G, Ho L, Szarewski A, Ve Luzick J. Semiautomated detection of Human papillomavirus DNA of high and low oncogenic potential in cervical smears. *Clin. Chemistry* 1997; 40 (10):1890-92.
- 29-**Syrjanen S and Syrjanen K. Human papillomavirus infections of the genital tract: Clinical significance and diagnosis by polymerase chain reaction. In: Becker Y and Darai G (eds) (first ed). *Diagnosis of Human Viruses by polymerase chain reaction*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1992, pp185.
- 30-**Arbeit JM, Münger K, Howley PM, Hanahan D. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-HPV 16 transgenic mice. *J Virol* 1994; 68: 4358-4368.
- 31-**Gupta JW, Saito K, Saito A, Fu YS, Shah KV. Human papillomaviruses and the pathogenesis of cervical neoplasia: a study by *in situ* hybridization. *Cancer* 1989; 64: 2104-10.
- 32-**Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Human Pathol* 1992; 23:117-28.
- 33-**Lorincz AT, Reid R, Jensen AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus Infection of the cervix: Relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstetrics and Gynecology*, 1992; 79(3): 328-37.

34-de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. In: zur Hausen H (ed). Human pathogenic papillomaviruses. Heidelberg: Springer Verlag, 1994; 1-12.

35-Meyers C, Frattini GM, Hudson JB, Laimins LA. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. Science 1992; 257: 971-973.

36-Snijders PFJ, van den Brule AJC, Schrijnemakers HFJ. Et al. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. J Gen Virol 1990; 71:173-181.

37-Altmann A, Jochmus- Kudielka I, Frank R, et al. Definition of immunogenic determinants of the human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7. Eur J Cancer 1992; 28: 325-33.

38-Stauss HJ, Davies H, Sadovnikova E, et al. Induction of cytotoxic T lymphocytes peptides *in vitro*: identification of candidate T-cell epitopes in human papillomavirus. Proc Natl Acad Sci, 1992; 89:7871-75.

39- Tuncer S, Ustaçelebi Ş. Servikal biyopsi örneklerinde insan papillomavirüsleri tip 16 ve 18'in polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. Flora 1996;1:40-4.

40-Crook T, Farthing A. Human papillomavirus and cervical cancer. Br J Hosp Med, 1993; 49(2): 131-2.

41-Chen TM, Chen CA, Wu CC, Huang SC, Chang CF, Hsieh CY: The genotypes and prognostic significance of human papillomaviruses in cervical cancer. Int J Cancer, 1994; 57:181-4.

42-Herrington CS: Human papillomaviruses and cervical neoplasia. Interaction of HPV with other factors. J Clin Pathol 1995; 48(1): 1-6.

- 43-** Davidson M, Schnitzer PG, Balkow LR, et al. The prevalence of cervical infection with human papillomaviruses and cervical dysplasia in Alaska Native women. *J Infect Dis* 1994; 169:792-800.
- 44-** Melkert PWJ, Hopman E, Vanden Brule AJ, et al. Prevalence of HPV in cytologically normal cervical smears as determined by the polymerase chain reaction, is age dependent. *Int J Cancer* 1993; 53(6): 919-23.
- 45-** Lowy DR, Kirnbauer R, Schiller JT: Genital human papillomavirus infection. *Proc Nat Acad Sci*. 1994; 91(7): 2436-40.
- 46-** Villiers EM. Laboratory techniques in the investigation of human papillomavirus infection. *Genitourin Med*, 1993; 68:50-4.
- 47-** Didier R, Catherine G, Xavier B, et al. Genital Human papillomavirus infection among women recruited for routine cervical cancer screening or for colposcopy determined by hybrid capture II and polymerase chain reaction. *Diagnostic Molecular Pathol*. 1999; 8(3): 157-64.
- 48-** Ratnam S, Franco E, Ferenczy A. Human Papillomavirus testing for primary screening of cervical cancer precursors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers, Prevention*. 2000; 9: 945-51.
- 49-** DeBritton RC, Hildesheim A, DeLao SL, Brinton LA, Sathya P, Reeves WC: Human papillomavirus and other influences on survival from cervical cancer in Panama. *Obstet Gynecol* 1993; 81(1): 19-24.
- 50-** Tachezy R., Hamíková E., Hájek T, et al. Human papillomavirus genotype spectrum in Czech women: Correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV-16, 18, and 33 virus-like particles. *J. Med. Virol*. 1999;58(4): 378-86.
- 51-** Santos C, Munoz N, Klug S, et al. HPV types and cofactors causing cervical cancer in Peru. *Br J Cancer* 2001;85(7):966-71.

52-Zielinski G. D., Snijders P. J. F., Rozendaal L,et al. HPV presence precedes abnormal cytology in women developing cervical cancer and signals false negative smears. Br. J Cancer. 2001; 85(3):398-404.

53- Polat H, Yarkın F, Vardar MA, Serin MS, Köksal F. Servikal kanserli kadınlarda HPV infeksiyonları ve diğer risk faktörlerinin saptanması. Çukurova Üniv. Tıp Fak.yayınları, 1996.

54- Ağaçfıdan A, Önel M, Önel D, Yıldırım E, Berkman S. Servikal örneklerde HPV DNA'nın nükleik asid hibridizasyon yöntemi ile saptanması. XXIX. Tuk Mikrobiyoloji Kongresi bildiri kitabı, ss 374, 2000, Antalya.

55- Ruud C. P. A. van Muyden, Bram W. A. ter Harmsel, Frank M.M. Detection and typing of human papillomavirus in cervical carcinomas in Russian women A prognostic study. Cancer.1999; 85(9): 2011-16.

56- Labropoulou V., Diakomanolis E.,Dailianas S. Genital papillomavirus in Greek women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. J. Med. Virol.1996; 48(1): 80-7.

57-Chen S, O'Sullivan H, Tabrizi SN, Fairley CK, Quinn MA, Garland SM. Prevalence and genotyping of HPV in cervical cancer among Australian women. J Gynaecol Obstet 1999; 67(3):163.

58- Kristiansen E, Jenkins A, Holm R. Coexistence of episomal and integrated HPV 16 DNA in squamous cell carcinoma of the cervix. Clin Pathol, 1994; 47:253-6.

59- Zhang W, Liu Y, Jin Y, et al. Detection of the HPV 16 E6 transforming gene by PCR in tissue samples from formal cervix and from cervix with precancerous lesions and carcinomas. Chin Med Sci J, 1993; 8(3): 139-42.

60- Hsu WP, Ho ES, Yang CH, Lee YM, Chang CM, Liu WT. Prognostic significance of human papillomavirus detected with polymerase chain reaction in cervical cancer. *Chung-Hua-I-Hsuenh-Tsa-Chih-Taipei* 1993;51(2):97-102.

61- Shen CY, Ho MS, Chang SF, et al. High rate of concurrent genital infections with human cytomegalovirus and human papillomaviruses in Panama. *Obstet Gynecol*, 1993; 81(1): 19-24.



ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında K.Maraş'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Mersin'de bitirdikten sonra 1993 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği'ne başladı. Buradan mezun olduktan sonra 1998 yılında Mersin Üniversitesinde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 1999 yılında Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Öğrenimine başladı.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**