

ÇEŞİTLİ SERVİKAL PATOLOJİYE SAHİP KADINLARDA HUMAN PAPİLLOMAVİRUS (HPV) PREVALANSI VE FİLOGENETİK ANALİZİ

Gülçin Alp AVCI^{1,2}, Güleendam BOZDAYI¹, Çağatay TAŞKIRAN³, Seçil ÖZKAN⁴, M. Anıl ONAN³

¹ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

² Hitit Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Mikrobiyoloji, Çorum

³ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Ankara

⁴ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, çeşitli servikal patolojiye sahip hastalarda gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ve DNA dizi analizi ile HPV tiplerinin sıklığının belirlenmesi ve filogenetik analizinin yapılması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntemler: Çalışmaya Ocak-Ekim 2010 tarihleri arasında kolposkopi önerilen 77 adet hastaya ait servikal sürüntü örneği dahil edilmiştir. HPV DNA ve HPV tip 16 DNA' sını L1 bölgesi hedef alınarak gerçek zamanlı PCR ile belirlenmiştir. MY09/11 ürünlerinin amplifikasyonları gerçek zamanlı PCR ile GP5+/GP6+ primerleri, siyanin-5 işaretli HPV DNA ve HPV tip 16 DNA spesifik problemleri kullanılarak yapılmıştır. Dizi analizinde GP5+/GP6+ primerleri kullanılmıştır. Filogenetik analiz, Kimura'nın iki parametre yöntemi ile yapılmıştır. İstatistiksel analizinde ise Pearson'nun ki-kare ve odds ratio testlerinden yararlanılmıştır.

Sonuç: Toplam 77 servikal örneğin 47 (prevalans %61)'si HPV DNA pozitif tespit edildi. Yetmiş yedi örneğin %52'si HPV 16; %4'ü HPV tip 16 ve tip 11; %1'i HPV tip 16 ve tip 6; ve %4'ü tiplendirilemeyen HPV DNA belirlenirken, %39'un da HPV'ye rastlanmadı. İnsan papillomavirus pozitif bulunan bireylerin yaşları 34-56 arasında olup, en fazla pozitiflik %80,0 oranı ile 31-40 yaşları arasında belirlenmiştir. İnsan papillomavirus pozitifliğinin 41-50 yaşları arasında %52,2'e düştüğü, ancak 51-60 yaşları arasında tekrar %83,3'e yükselerek ikinci bir pik yaptığı görüldü. Ayrıca, 20 ASC-H'nin %60,0'ında; 36 ASC-US'un %63,8'inde; 9 HSIL'nin %100'ünde ve 12 LSIL'nin %25'inde HPV DNA pozitif olarak belirlendi. **Yorum:** Hastanemizde serviks kanseri ve prekanseröz lezyonları olan kadınlarda HPV genotip dağılımının araştırılması önemlidir. Gelişen teknolojik yöntemler kullanılarak İnsan papillomavirusunun erken tanısı, prekanseröz lezyonların invaziv kanser haline dönüşmesini önlemek için anahtar rol oynamaktadır.

Anahtar kelimeler: DNA dizi analizi, filogenetik analiz, gerçek zamanlı PCR, insan papillomavirus, serviks kanseri

Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, (J Turk Soc Obstet Gynecol), 2013; Cilt: 10, Sayı: 3, Sayfa: 151-9

PHYLOGENETIC ANALYSIS AND PREVALENCE OF HUMAN PAPILLOMAVİRUS (HPV) IN WOMEN WITH SEVERAL CERVICAL PATHOLOGIES

SUMMARY

Objective: To determinate the prevalence of HPV types in patients with cervical cancers in our legion by Real time PCR and DNA sequence analysis and to make phylogenetic analysis was aimed in this study.

Material and methods: From January to October 2010, cervical swap samples of 77 patients directed to colposcopy were included in the study. HPV DNA and HPV type 16 were detected by Real Time polymerase chain reaction using

Yazışma adresi: Yard. Doç. Dr. Gülçin Alp Avcı, Hitit Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu 19030 Çorum

Tel.: (0506) 856 01 28

e-posta: alp.gulcin@yahoo.com

Alındığı tarih:12.03.2013, revizyon sonrası alınma: 08.05.2013, kabul tarihi: 09.05.2013, online yayın tarihi: 11.05.2013

the L1 region. Real Time PCR amplifications of MY09/11 products were done by GP5+/GP6+ primers and Cyanine-5 labeled HPV DNA and HPV type 16 specific probe. HPV types determinate by GP5+/GP6+. Phylogenetic analysis of sequences was calculated by Kimura's two parameters method. Statistically analyses were by using Pearson chi-square and odss ratio tests.

Results: Forty seven samples (prevalence; 61%) of total seventy seven cervical samples detected as HPV DNA positive. While HPV type 16; 52%, HPV type 16+11; 4%, HPV type 16+6; 1% and non-typing HPV DNA 4% of seventy seven samples determining, 39% of samples observed as negative HPV. Participated in the study population, HPV DNA positive individuals are among 34-56 years. Most HPV DNA positivity rate of 80.0% was between the ages of 31-40. 52.2% of HPV DNA positivity between the ages of 41-50 to fall, but again, 83.3% between the ages of 51-60 to a second peak was determined that increased. 60.0% of 20 ASC-H cases, 63.8% of 36 ASC-US cases, 100% 9 of HSIL cases and 25.0% of 12 LSIL cases were positive for HPV DNA.

Conclusion: The investigation of the distribution of HPV genotypes in women with cervical cancer and precancerous lesions in our region is important. Early diagnosis of HPV by using improved technological assays, play a key role to prevent the turn precancerous lesions into invasive cancers.

Key word: cancer of cervix, DNA sequence analysis, human papillomavirus, phylogenetic analysis, real time PCR

Journal of Turkish Society of Obstetrics and Gynecology, (J Turk Soc Obstet Gynecol), 2013; Vol: 10, Issue: 3, Pages: 151- 9

GİRİŞ

İnsan papillomavirüsü (HPV) bütün dünyada serviks kanserinin primer etiyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir. HPV genital bölge dışında da prekanseröz lezyonlara sebep olmaktadır⁽¹⁾. İnsan papillomavirus küçük, çift sarmallı bir DNA virüsü olup, deriyi ve mukozal epitelyal yüzeyleri enfekte etmektedir⁽²⁾. Günümüzde yaklaşık olarak 200'den fazla HPV tipi tanımlanmıştır⁽³⁾. Bu tiplerin sınıflandırılması; tür orijini ve DNA hibridasyonu ile tespit edilen viral genomlar arasındaki homolojinin derecesine bağlıdır⁽⁴⁾. HPV sadece serviks kanserinde değil aynı zamanda deri ve faringeal kanserler ve diğer malignensilerle özellikle vulvar, vaginal, penil ve anal kanserlerden de sorumlu olduğu gösterilmiştir⁽⁵⁾. Yaklaşık 40 HPV tipinin, genital mukoza enfeksiyonuna sebep olduğu bilinmektedir ve kanserojen potansiyeline göre sınıflandırılmaktadır⁽⁶⁾.

Serviks kanseri, meme kanserinden sonra dünyada en sık görülen ikinci kanser türüdür. Her yıl tanı konan 500 binin üzerinde yeni olguya karşın 275 bin hasta hayatını kaybetmektedir. Olguların %80'i ise gelişmekte olan ülkelerde izlenmektedir⁽⁷⁾. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı verilerine göre; 1996'da 623 tane serviks kanseri saptanmış olup, tüm kadın kanserleri arasında 7. sırada iken, 2002 yılında bu sayı 708'e çıkmış, ancak tüm kadın kanserleri arasında 10. sıraya gerilemiştir. 2003 yılı verilerinde ise, serviks kanseri sayısı 763'e çıkarken tüm kadın kanserleri arasında da

9. sıraya yükselmiştir⁽⁸⁾. Genelde yüksek dereceli lezyonlar, düşük dereceli lezyonlardan gelişse de, bir kısım olguda direkt olarak yüksek dereceli lezyon şeklinde görülmektedir. Genital sistemin HPV enfeksiyonu düşük dereceli lezyon olarak başlayıp kansere kadar devam edebilmektedir⁽⁹⁾.

Bu çalışmada, çeşitli servikal patolojiye sahip hastalarda gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve DNA dizi analizi ile HPV tiplerinin sıklığının belirlenmesi ve filogenetik analizinin yapılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

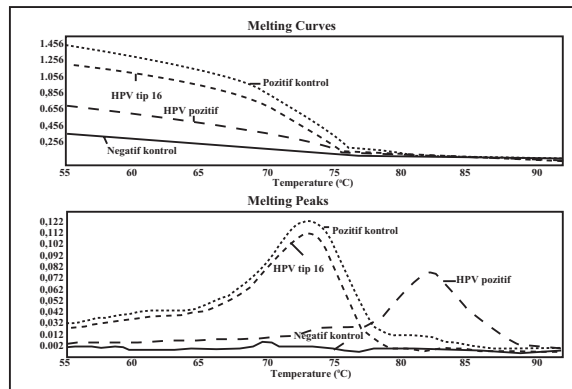
Örnekler: Çalışmaya Ocak-Ekim 2010 tarihleri arasında hastanemizde kolposkopi önerilen 77 hastanın servikal sürüntü örneği dahil edildi. Bu çalışma için yerel etik kurul onayı (Gazi Üniversitesi Etik Kurulu; karar no. 23.02.2009/108) alınmıştır. Ayrıca örnekleme sırasında çalışmaya katılan hastalardan çalışma ve yapılacak işlemler açısından onam alınmıştır. Kolposkopi sırasında servikal sürüntü örneği alınan bireylere ait yaş, çocuk sayısı, gebelik sayısı, sigara, oral kontraseptif ve rahim içi araç (RIA) kullanımı gibi demografik bilgiler Tablo I'de yer almaktadır. Örneklerin sitolojik incelemesi, modifiye Bethesda sistemine göre yapıldı⁽¹⁰⁾.

Tablo 1: Serviks örneği alınan hastaların sigara, OKS ve RIA kullanımı ile HPV pozitifliği

	HPV pozitif (n:47)	Yüzde (%)	HPV negatif (n:30)	Yüzde (%)
Sigara kullanımı				
Evet (n:25)	15	%60,0	10	%40,0
Hayır (n:52)	32	%61,5	20	%38,5
ki-kare:0,23	p= 0,6306		OR:0,79 (0,27-2,28)	
OKS kullanımı				
Evet (n:5)	2	%40,0	3	%60,0
Hayır (72)	45	%62,5	27	%37,5
ki-kare:0,31	p= 0,5882		OR:0,60 (0,06-4,78)	
RIA kullanımı				
Evet (n:13)	8	%61,5	5	%38,5
Hayır (n:64)	39	%61,0	25	%39,0
ki-kare:0,58	p= 0,4477		OR:1,60 (0,41-6,41)	

Nükleik asit saflaştırılması ve gerçek zamanlı

PCR uygulaması: Servikal sürüntü örneklerinde nükleik asit saflaştırması Heliosis^(r) viral DNA ekstraksiyon kit (Metis Biyoteknoloji, Türkiye) kullanılarak üreticinin önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Saflaştırılan nükleik asit daha sonra steril distile su içerisinde -86°C saklanmıştır. Servikal sürüntü örneklerinde HPV enfeksiyonu ve HPV tip 16'nın belirlenmesi için gerçek zamanlı PCR yöntemine dayalı ticari bir sistem (HeliosisTM Human papillomavirus (HPV) LC PCR kit, Metis Biyoteknoloji, Türkiye) kullanıldı. PTC-200 Thermal cyclers (MJ Research, ABD) cihazında tamamlanan ilk amplifikasyonu takiben ürünler, LightCyclerTM 2.0 (Roche Diagnostics, Almanya) gerçek zamanlı PCR cihazında ikinci amplifikasyonu yapıldı. Analiz sonucunda, HPV tip 16 için 69,5°C ve 78,5°C arası pikler, diğer HPV tipleri için ise; 80±2°C'deki pikler değerlendirildi (Şekil 1). Çalışmada MY09 (5'CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'), MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'), GP5 (5'-TTTGTACTGTGGTAGATAC-3') ve GP6 (5'-GAAAAATAAACTGTAAATCA-3') primerleri ile siyanin-5 işaretli HPV DNA ve HPV tip 16 DNA spesifik problar kullanıldı.



Şekil 1: HPV tip 16, HPV 16 dışındaki tipler, pozitif ve negatif kontroller.

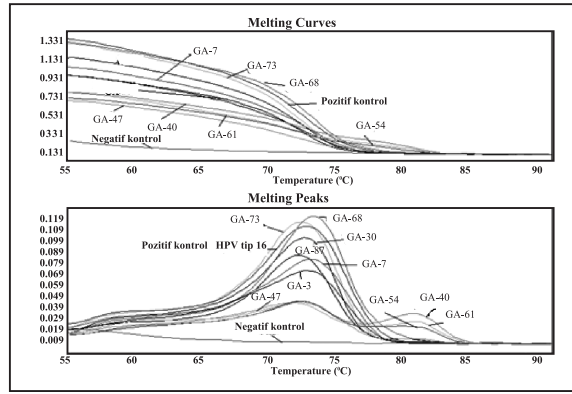
Dizi analizi ve filogenetik analiz:

PCR uygulaması sonunda elde edilen ürünler jel görüntüleme sisteminde (UVITEC Cambridge, England) görüntülenerek dizi analizi için en iyi bant oluşturan örnekler belirlendi. HPV tiplerine ait dizilerin belirlenmesinde, Big Dye Terminator Cycle Squencing (Applied Biosystems, ABD) kit, GP5+/GP6+ primerleri ve ABI Prism^(r) 3100XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazı kullanılmıştır. Diziler arasındaki genetik farklılık, Kimura'nın iki parametre yöntemi (K2P) ile hesaplanmıştır⁽¹¹⁾. Dizilerin birbiri ile yakınlıkları hesaplandıktan sonra MEGA 4.0.2 programı ile dizilere ait filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

İstatistik: İstatistiksel değerlendirmede; veriler sayı ve yüzdelerle sunulmuştur. Gruplar arası HPV pozitifliği ve HPV tip 16 pozitifliği yönünden karşılaştırmalarda ki-kare testi kullanılmıştır. Ayrıca bazı tablolarda OR (%95 güven aralığı) hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık p=0,05 düzeyinde yorumlanmıştır.

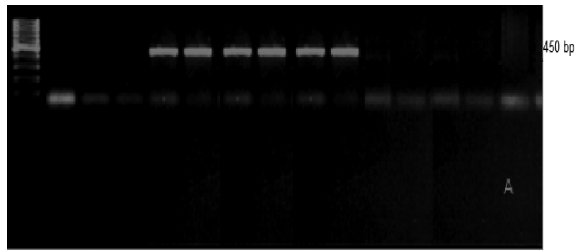
BULGULAR

Gerçek zamanlı PCR sonucunda, toplam 77 servikal örneğin 47 (prevalansı %61)'si pozitif tespit edildi. Bu örneklerin 40 (%52)'sini HPV tip 16 ve 7 (%9)'sini miks olarak belirlendi. Böylece toplam 47 (%61) adet HPV DNA pozitifliği elde edilirken, %39'un da HPV'ye rastlanmadı (Şekil 2).



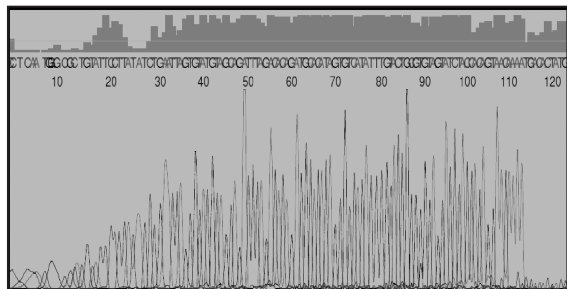
Şekil 2: HPV tip 16 ve HPV 16 dışındaki diğer tiplerin belirlenmesi.

Yapılan PCR uygulaması sonrasında elektroforez ile dizi analizi için en iyi bant oluşturan örneklerin seçimi yapılmıştır (Şekil 3).



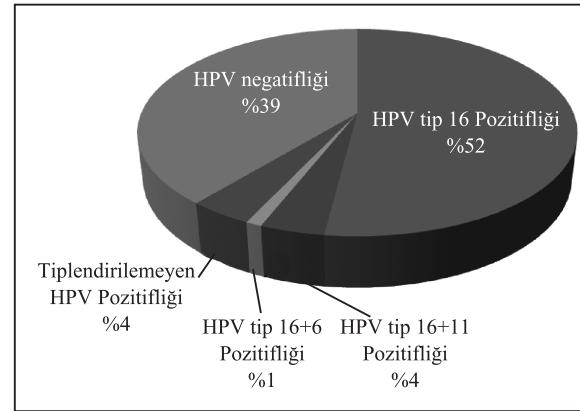
Şekil 3: MY09/11 primerleri ile 450 bp'lik L1 gen bölgesinin belirlenmesi.

Gerçek zamanlı PCR'da HPV tip 16 dışında diğer tiplerin de olduğu tespit edilen 5 serviks örneğinin DNA dizisi araştırıldı. Bu örneklerden GA-22, GA-25, GA-69 ve GA-77 olarak adlandırılanlarda tipler gözlenirken bir serviks örneğinin tipi belirlenemedi. DNA dizi analizi sonucunda bu örneklerden GA-22, GA-25, GA-77'de HPV tip 16 dışında HPV tip 11'in var olduğu gözlenirken, GA-69 olarak adlandırılan örnekte ise HPV tip 16 dışında HPV tip 6 tespit edildi. Şekil 4'de HPV tip 11'i içeren örneklerden birinin dizisi verilmiştir.



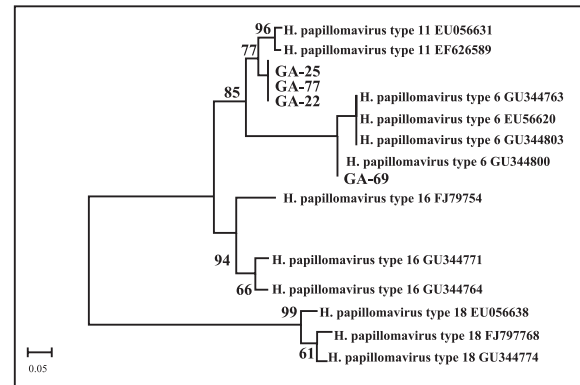
Şekil 4: Genetik analiz cihazında elde edilen bir kromatogram örneği (HPV tip 11).

Tiplendirme sonuçlarına göre, 77 örneğin %52'si HPV 16, %4'ü HPV tip 16 ve tip 11, %1'i HPV tip 16 ve tip 6, ve %4'ü tiplendirilemeyen HPV DNA olarak belirlendi.



Şekil 5: Servikal örneklerde gerçek zamanlı PCR sonuçları.

Elde edilen dizilerin filogenetik analizi Kimura'nın iki parametre (K2P) yöntemi ile yapıldı. Analiz sonucunda MEGA 4.0.2 programı ile filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil 4.). Filogenetik analiz sonucuna göre tiplerin birbirine yakınlığı belirlenmektedir. Buna göre GA-22, GA-25 ve GA-77 olarak adlandırılan tiplerin HPV tip 11'e ile GA-69 olarak adlandırılan tipin HPV tip 6'ya olan benzerliği Şekil 6'te verilmiştir.

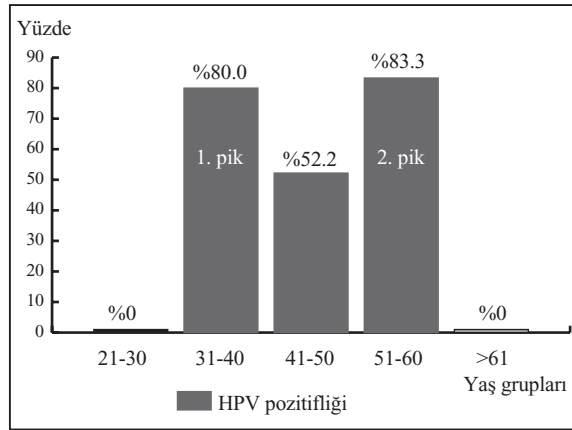


Şekil 6: HPV tiplerinin filogenetik ağaçtaki yeri. GA-22, GA-25 ve GA-77 olarak adlandırılan tiplerin HPV tip 11'e ile GA-69 olarak adlandırılan tipin HPV tip 6'ya yakınlığı görülmektedir. Ölçek çubuğu diziler arasındaki mesafeyi göstermektedir.

Hastaların sigara ve OKS kullanımına göre, HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Ancak RIA kullanımına göre HPV pozitifliğine bakıldığında RIA kullananlarda istatistiksel olarak anlamlılık tespit edildi ($p<0,05$). Bu durum HPV pozitifliğinin RIA kullananlarda 1,60 kat daha fazla görülmesinden kaynaklanmaktadır (Tablo I).

Değerlendirilmeye alınan hastaların 6 (%7,8)'sı 21-30, 25 (%32,5)'i 31-40, 23 (%29,8)'ü, 18 (%23,4)'i 51-60 ve 5 (%6,5)'i 61 yaş ve üzeri olan yaş grubunda yer almaktadır. Çalışmaya katılan popülasyonun yaşları ortalama 45 ± 24 olup, HPV pozitif bulunan bireylerin yaşları 34-56 arasındadır. HPV DNA pozitifliği tespit edilen hastaların hepsi 30 yaşın üstündedir. En fazla HPV DNA pozitifliği %80,0 oranı ile 31-40 yaşları arasında belirlendi. HPV pozitifliğinin 41-50 yaşları arasında %52,2'e düştüğü, ancak 51-60 yaşları arasında tekrar %83,3'e yükselerek ikinci bir pik yaptığı tespit edildi (Şekil 7).

Yaş gruplarına göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$; ki-kare: 18,14; $p = 0,0011$). Oluşan fark, 21-30 ile 61 ve üzeri yaş gruplarında HPV pozitif hasta bulunmamasından kaynaklanmaktadır.

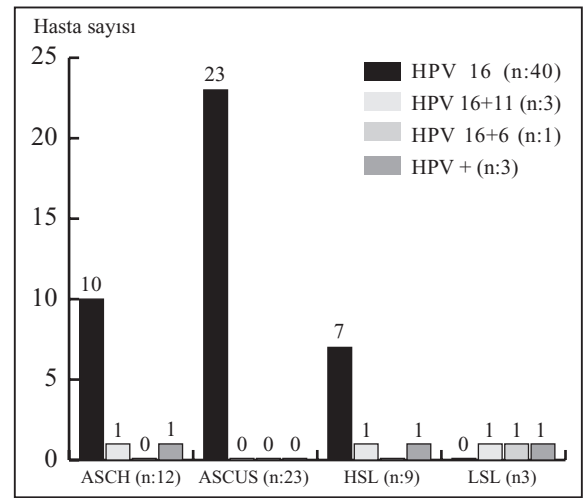


Şekil 7: Serviks örneği alınan hastaların yaş gruplarına göre HPV pozitifliği.

Serviks örneği alınan hastalarda çocuk ve gebelik sayılarına göre HPV pozitifliği incelendiğinde; hem çocuk sayısı hem de gebelik sayısında artışla birlikte HPV pozitiflik oranında bir yükselme tespit edildi. Özellikle çocuk sayısı (canlı doğum sayısı) 2-4 arasında olanlarda %71,4 oranında; gebelik sayısında da yine 2-4 arasında olanlarda %68,0; 4'den fazla gebelik durumu olanlarda %64,5 oranında bir pozitiflik elde edildi. Çocuk ve gebelik sayısına göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0,05$).

Çalışmamızda, kolposkopi uygulanan hastaların patoloji değerleri incelendiğinde, 20 ASC-H olgusunun 12 (%60,0)'sinde; 36 ASC-US olgusunun 23 (%63,8)'ünde; 9 HSIL olgusunun 9 (%100)'unda ve 12 LSIL olgusunun 3 (%25,0)'ünde HPV DNA pozitif olarak

belirlendi. Patoloji verilerine göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p < 0,05$). Bu fark HSIL olgularını içeren grubun tamamının HPV pozitif olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, hastaların patoloji verileri ile HPV tipleri birlikte değerlendirildi. Buna göre; 12 HPV pozitif ASC-H olgusunun 10'u HPV tip 16, 1'i HPV tip 16/tip 11 ve 1'i HPV DNA pozitif; 23 HPV pozitif ASC-US olgusunun 23'ü HPV tip 16 pozitif; 9 HPV pozitif HSIL olgusunun 7'si HPV tip 16, 1'i HPV tip 16/tip 11 ve 1'i HPV DNA pozitif; 3 HPV pozitif LSIL olgusunun 1'i HPV tip 16/tip 11, 1'i HPV tip 16/tip 6 ve 1'i HPV DNA pozitif olarak tespit edildi (Şekil 8).



Şekil 8: Serviks örneği alınan hastaların patoloji verilerine göre HPV tiplerinin pozitifliği.

TARTIŞMA

İnsan papillomavirusü (HPV), cinsel yolla bulaşan, seksüel olarak aktif yetişkinlerde ve adölesanlarda görülen en yaygın enfeksiyonlardan biridir⁽¹¹⁾. Özellikle gelişmiş ülkelerde, cinsel yönden aktif kadın ve erkeklerin %50'sinden fazlasının, yaşamlarının bir döneminde HPV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. HPV ile enfekte olan kadınların %90'ında, enfeksiyon sıklıkla kendini sınırlar. Buna karşın geriye kalan %10'luk dilimde yer alan enfekte kadınların skuamöz epitelinde yıllar içinde devam eden değişimler sonucunda prekanseröz veya kanseröz lezyonlar geliştirir⁽¹²⁾.

HPV tespitinde serolojik tanı yöntemleri etkili olmadığından ve halen kültürü yapılamadığından moleküler esaslı tanı yöntemlerinden biri olan PCR yöntemi günümüzde altın standart olarak değerlendiril-

mektedir^(13,14). Çalışmamızda, gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanılmıştır. HPV tiplendirilmesinde oluşturdukları lezyonlar önemlidir. HPV tiplerinin özellikle onkogenik risk taşıması onların düşük ve yüksek riskli olarak tiplendirilmelerini sağlamaktadır⁽¹⁵⁾. Servikal kanserde en çok bulunan yüksek riskli HPV tipi %50-55 oranı ile HPV tip 16 olup, ikinci sırada ise HPV tip 18'in %10-15'lik bir oran ile görülmektedir^(13,16). Bu nedenle çalışmamızda, tedavi açısından oldukça önemli olan ileri lezyonlardan ve kanserden birincil olarak sorumlu olduğunu düşündüğümüz yüksek riskli HPV tipi olarak bilinen, HPV tip 16'nın ayrımı esas alınmıştır. Ülkemizde son yıllarda tip tayinin de yapılan benzer çalışmalar incelendiğinde, Yavuzer ve arkadaşları (2009) nested PCR ile yaptıkları çalışmada 50 olgunun 35 tanesinde HPV DNA varlığı gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmadaki HPV tiplendirilmesine göre, en sık rastlanan 3 HPV tipi sırasıyla, HPV 6/11 (%42,9), HPV 16 (%22,9) ve HPV 18 (%14,3) olarak belirlenmiştir⁽¹⁷⁾. Altun ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışmada, toplam 460 servikal sitoloji örneğini 20-68 yaş arası kadınlardan toplanmışlardır. HPV DNA tespiti için MY09/11 ve GP5+/6+ primerleri ile PCR testi sonucunda, 460 örneğin 24 (%5,2)'ünü HPV DNA için pozitif bulmuşlardır. Ayrıca HPV DNA pozitif örnekler HPVpU-1M/pU-2R ve HPVpU-31B/pU-2R primerleri ile sırasıyla yüksek riskli (HR; high risk) ve düşük riskli (LR; low risk) tipler olarak da tanımlanmışlardır. HPV DNA pozitif 24 kadından 14'ün de (%3) tek ve ya multiple enfeksiyon şeklinde HR HPV tipi ve 10'un da (%2,2) ise tek başına LR HPV pozitifliği tespit etmişlerdir⁽¹⁸⁾. Şahiner ve arkadaşları (2012) iki farklı yöntemle servikal sürüntü örneklerinde HPV DNA varlığını araştırdıkları çalışmalarında 356 servikal sürüntü örneği dahil edilmiştir. Çalışmada her iki yöntemden en az biri ile HPV DNA pozitiflik oranı %30,9 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada HPV tip 16 sıklığı % 33,7 olarak tespit edilmiştir⁽¹⁹⁾. Dünyada yapılan çalışmalar incelendiğinde, verilerin daha farklı olduğu görülmektedir. Dunne ve arkadaşlarının (2007), Amerika'da 2003-2004 yılında yaptıkları çalışmada, 14-59 yaşları arasında olan 1921 kadında HPV sıklığını PGMY09/11 primerlerini kullanarak, gerçek zamanlı PCR yöntemi ile araştırmış ve HPV pozitifliğini %26,8 olarak saptamışlardır⁽²⁰⁾. Awadhi ve arkadaşlarının (2011) çalışmasında 3011 servikal sürüntü örneği incelenmiş ve gerçek zamanlı PCR ile HPV DNA

pozitiflik oranı %2,4 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada 21 farklı HPV genotipi gösterilmiştir⁽²¹⁾. Bizim çalışmamızda ise, şüpheli kolposkopi hastalarının servikal sürüntü örneklerinde HPV DNA pozitifliği gerçek zamanlı PCR ile araştırıldı ve %61,0 oranında pozitiflik tespit edildi. Ayrıca yaptığımız çalışmada 47 HPV pozitif bireyin %52'sinde HPV tip 16, %4'ünde HPV tip 16+11; % 1'inde HPV tip 16+6 ve %4'ünde tiplendirilemeyen HPV DNA'ları tespit edilmiştir. Servikal örneklerde HPV tip 16 dışında HPV tip 11 ve HPV tip 6'nın varlığı, malign olmayan HPV tiplerinin de servikal bölgede bulunabileceğini göstermiştir.

Servikal kanserde HPV prevalansı ve risk faktörlerinin ilişkilendirildiği çalışmalar gözden geçirildiğinde, risk faktörleri arasında en çok bahse geçen konular yaş, sigara, OKS ve RIA kullanımı olarak gözlenmektedir. Bu konularda en çok yaş ile HPV prevalansı üzerinde durulmakta olup, servikal neoplaziler en fazla 20'li yaşların sonlarına doğru ortaya çıkmakta olduğu belirtilmektedir. Karsinoma in situ yaklaşık olarak 35 yaşlarında görülürken, invaziv kanserler ise sıklıkla 55-60 yaşları arasında görülmektedir⁽²²⁾. Yapılan araştırmalar değerlendirildiğinde, servikal kanserli hastaların ortalama tanı alma yaşı 51 olarak saptanmaktadır. İnsan papillomavirus ile birliktelikte yaşam boyu iki pik bulunmakta olup, ilk piki 30-40, ikinci piki ise 50-60 yaş civarında tapmaktadır. Çalışılan birçok popülasyonda HPV enfeksiyonlarının yaş ile ilişkili olduğu belirlenmiştir⁽²³⁾. Yaşın artması ile azalan enfeksiyonun nedeni HPV'ye maruz kalmanın azlığı, enfeksiyonun sınırlı doğası veya enfeksiyonun tekrarı neticesinde oluşan direnç ile açıklanmaktadır. Batmaz ve arkadaşlarının (2009) normal ve anormal servikal smear saptanan kadınlardaki HPV DNA pozitifliğini belirledikleri çalışmalarında anormal servikal sitolojide 17-30 yaş grubunda en düşük (%12,7) düzeyde iken 31-45 yaş grubunda en yüksek (%52,4) seviyede ve 45 yaş üzerinde yine bir azalma (%34,9) tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada normal servikal sitolojiye sahip kadınlarda 17-30 yaş grubunda %19,4; 31-45 yaş grubunda ise %64,5 ve 45 yaş üzerinde yine bir azalma şeklinde HPV pozitifliği (%16,1) gösterilmiştir⁽²²⁾. Bizim çalışmamız literatürler ile uyumlu olup ilk pik 31-40 yaşları arasında ortaya çıkarken, ikinci pik 51-60 yaşları arasında görülmekte olup, yaş gruplarına göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). Ayrıca, çalışmamız-

da en fazla HPV DNA pozitifliğinin %80,0 oranı ile 31-40 yaşları arasında olduğu görüldü. HPV pozitifliğinin 41-50 yaşları arasında %52,2'e düştüğü, ancak 51-60 yaşları arasında tekrar %83,3'e yükselerek ikinci bir pik yaptığı belirlendi. Yaş gruplarına göre istatistiksel olarak fark saptanması, 21-30 yaş grubu ile 61 yaş ve üzeri gruplarda HPV pozitif hasta bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Ülkemizde ve yurt dışında yapılan benzer çalışmalar incelendiğinde, ülkemizdeki yaş ve HPV arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda benzer sonuçlar görülürken yurt dışında yapılan çalışmalarda farklılıklar görülmektedir. Bunun en temel nedeni, seksüel alışkanlıkların toplumun sosyokültürel, ekonomik ve değer yargılarına bağlı olarak yaş gruplarında farklılık göstermesidir.

Uluslararası kanser araştırmaları ajansının (IARC) çalışmaları incelendiğinde, hayatın herhangi bir döneminde sigara içmiş olmanın riski 2 kat arttırdığı görülmektedir. Sigaranın içilme miktarı ise risk oranlarını artırmaktadır. HPV pozitif hastalarda yüksek dereceli lezyon saptanma oranlarının 1,9-2,3 kat fazla olması araştırmacıları sigara içiminin özellikle persistans yönünden önemli bir faktör olduğu sonucuna götürmektedir⁽²⁴⁾. Ayrıca oral kontraseptiflerle yapılan çalışmalarda da farklı sonuçlar saptanmıştır. Bazı çalışmalarda risk bulunurken bazılarında anlamlı bir fark olmadığı belirtilmiştir. Son dönemde yayınlanan geniş hasta sayılı önemli bazı yayınlarda ise konunun önemi belirtilmektedir. IARCH çalışmalarında da oral kontraseptif (OKS) kullanımı ile serviks kanseri arasında bir ilişki saptanmıştır (OR, 1.47; %95 CI 1.02-2.12). Bu çalışma grubu tarafından, 5 yıldan az kullanımın riski arttırmadığı ancak 5-9 yıl kullanımın riski 2.72 kat (%95 CI 1.36-5.46), 10 yıl ve üzeri kullanımın ise riski 4.48 kat (%95 CI 2.24-9.36) arttırdığı tespit edilmiştir.⁽²⁴⁾ Yapılan başka bir çalışmada ise HPV DNA pozitifliği ile OKS veya sigara kullanımının istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı belirtilmiştir⁽²²⁾.

Uluslararası servikal kanser epidemiyolojik çalışmalarını yürüten grup (ICESCC) tarafından yapılan araştırmalarda, gebelik sayısı arttıkça serviks kanseri riskinin de doğru orantılı olarak arttığı bildirilmiştir⁽²⁵⁾. Channa ve arkadaşlarının (2012) gebelerlerde HPV varlığının tespiti amacı ile yaptıkları çalışmada toplam 102 örnek kullanılmış olup, bunlardan % 50' si kontrol grubu oluşturmaktadır. Çalışma sonucunda gebelerde %19,6 gebe olmayanlarda ise %17,6 oranında HPV

DNA varlığı belirlenmiştir.⁽²⁶⁾ Rachel ve arkadaşlarının (2012) 25-65 yaş arası kadınlarda PCR yöntemi aracılığıyla yüksek riskli HPV ile ilişkili risk faktörlerini inceledikleri çalışmalarında toplam 518 kadında yüksek riskli HPV prevalansı %35,9 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada 298 gebenin 105'inde HPV pozitif olup, bunlarında 42'sinde yüksek riskli HPV tespiti yapılmıştır. Gebe olmayan 2210 kadının 81'inde HPV pozitifliği görülmüş olup, bunlarında 35'inde yüksek riskli HPV varlığı belirlenmiştir⁽²⁷⁾. Bizim çalışmamızda ise, hem çocuk sayısı hem de gebelik sayısında artışla birlikte HPV pozitiflik oranında bir yükselme tespit edilmiştir. Özellikle çocuk sayısı 2-4 arasında olanlarda %71,4 oranında; gebelik sayısında da yine 2-4 arasında olanlarda %68,0 ve 4'den fazla gebelik durumu olanlarda %64,5 oranında bir pozitiflik elde edilmiştir. Çocuk ve gebelik sayısına göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Elde edilen bu veriler literatürler ile uyumlu olup, gebelik sayısı ile HPV enfeksiyonunun görülme sıklığı arasında doğru orantılı bir ilişkinin varlığı tespit edilmiştir.

Genital sistemin HPV enfeksiyonu; düşük dereceli lezyon olarak başlayıp, kansere kadar devam edebilmektedir.⁽²⁸⁾ Ülkemizde yapılan çalışmalara baktığımızda, Ergünay ve arkadaşlarının (2007) çalışmasında sıvı bazlı sitoloji ile 14'ünde ASC-US, 3'ünde ASC-H, 7'sinde LSIL, 5' inde HSIL, 4'ünde LSIL+ şüpheli HSIL, 1'inde AGUS, 1'inde de atipik hücrelere tam tanı almamış toplam 35 hasta ile yaptıkları çalışmada %80 oranında (28 hasta) HPV DNA tespit edilmiştir. Bunların 22'sinde ise yüksek riskli HPV tipleri (16, 18, 31, 33, 45, 56 ve 59) saptanmıştır⁽²⁹⁾. Batmaz ve ark. (2009) çalışmasındaki oranlar ise, ASCUS da %34,8, ASC-H de %66,6, LSIL da ise HPV pozitifliği % 31,2 şeklinde tespit edilmiştir⁽²²⁾. Yurt dışında yapılan çalışmalar incelendiğinde, Castle ve arkadaşları (2006), HPV tip 16'nın etken olduğu, ASCUS veya LSIL lezyonlarının 2 yıl içinde CIN III veya kansere dönüşme riski olduğunu ve bu riskin, HPV tip 16 dışındaki diğer tiplerle kıyaslandığında 5 kat fazla olduğunu bildirmişlerdir⁽³⁰⁾. ICESCC tarafından yapılan araştırmalarda (2006), tüm anormal sitolojik sonuçlar değerlendirildiğinde HPV pozitifliği % 35,4 ike, normal sitolojik sonuçlarda bu oran %44,3 olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada ASCUS da HPV pozitifliği %63, ASC-H de %86 olarak bildirilmiştir⁽²⁵⁾. Bizim çalışmamızda, kolposkopi

uygulanan hastaların sürüntü örnekleri sitolojik olarak incelendiğinde, 20 ASC-H olgusunun 12 (%60,0)'sinde; 36 ASC-US olgusunun 23 (%63,8)'ünde; 9 HSIL olgusunun 9 (%100)'unda ve 12 LSIL olgusunun 3 (%25,0)'ünde HPV DNA pozitif olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu fark HSIL olgularını içeren grubun tamamının HPV pozitif olmasından kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak, serviks kanseri etiyolojisinde majör etken olarak kabul edilen HPV tanısı günümüzde oldukça önem taşımaktadır. Serviks kanseri, diğer kanser türlerinden "önlenebilir" bir kanser çeşidi olması ile ayrılmaktadır. Bu nedenle HPV ile ilişkili enfeksiyonlarda tarama, erken teşhis ve erken tedavi önem kazanmaktadır. Çalışmamızda elde edilen tüm bu veriler dahilinde, gerçek zamanlı PCR yöntemi ile pozitif bulunan hastaların, belli bir algoritma dahilinde takiplerinin yapılması ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda hastaların yönlendirilmesi önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Shope RE, Hurst EW. Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. *J Exp Med* 1933; 58: 607- 24.
2. Singer A, Ho L, Terry G, Kwie TS. Association of human papillomavirus with cervical cancer and precancer, In: A Mindel (eds), *Genital Warts Human Papillomavirus Infection*. Edward Arnold, London. 1995; 105- 29.
3. Münger K, Baldwin A, Edwards KM et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 78 (21): 11451- 60.
4. Howley PM. The molecular biology of papillomavirus transformation. *Am J Pathol* 1983; 113 (3): 414- 21.
5. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244- 65.
6. Anna-Barbara Moscicki. Impact of HPV infection in adolescent populations. *J Adoles Health* 37; 2005; 3- 9.
7. Hamont DW, Bekkers RLM, Massuger LFAG, Melchers WJG. Detection of management and follow-up of pre- malignant lesions and the role for human papillomavirus. *Rev Med Virol* 2008; 18: 117- 32.
8. Özgül N. Türkiye'de serviks kanserinin durumu ve servikal kanser tarama çalışmaları. <http://ukdk.org/pdf/kitap/30.pdf> [Erisim Tarihi: 01.02.2010].
9. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* 2006; 116: 1167- 73.
10. Solomon D, Davey D, Kurman R et al. Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287: 2114- 9.
11. Yarkın F, Vardar MA. HPV immunolojisi ve natürel enfeksiyonlar. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* 2009; 2 (1): 43- 7.
12. Yazıcı F, Çelik Ç. HPV ve ekstrasjenital organ kansinmaları. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* 2009; 2 (1): 29- 33.
13. Maria TS, Paola L, Elvira B et al. Comparison of the digene hc2 assay and the roche amplicor Human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk hvp genotypes in cervical samples. *J Clin Micro* 2006; 44: 2141- 6.
14. Borysiewicz LK, Fiander A, Nimako M, et al. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 1996; 347: 1523- 7.
15. Erkmen E, Şimsek M, Sapmaz E ve ark. Bölgemizdeki serviks kanseri vakalarında HPV 16 ve 18 genomlarının PCR yöntemi ile araştırılması. *Jinekolojik Onkolojik Derg* 2002; 5: 75- 9.
16. Lorincz AT. Screening for cervical cancer: new alternatives and research. *Salud Publica Mex* 2003; 45 (3): 376- 87.
17. Yavuzer D, Karadayı N, Erdağı A, Salepci T, Baloğlu H, Dabak R. Serviks kanseri ve prekanseröz lezyonlarında PCR ile HPV tiplemeşi. *Kartal Eğitim Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 2009; 20(1): 1- 6.
18. Altun Z, Yarkın F, Vardar MA, Uğuz A. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran kadınlarda genital human papillomavirus enfeksiyon prevalansı. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2011; 31(2): 307- 14.
19. Şahiner F, Gümrall R, Şener K, Yiğit N, Dede M, Yapar M, Kubar A. Servikal sürüntü örneklerinde iki farklı yöntemle HPV DNA varlığının araştırılması: MY09/11 Konsensus PCR ve Tipe özgül gerçek zamanlı PCR. *Mikrobiol Bul* 2012; 46(4): 624- 36.
20. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007; 297: 813- 9.
21. Al-Awadhi R, Chehadeh W and Kapila K. Prevalence of Human Papillomavirus Among Women With Normal Cervical Cytology in Kuwait. *Med J Virol* 2011; 83: 453- 60.
22. Batmaz G, Çetin A, Dane C, Görgeç H, Dane B. Normal ve anormal servikal smear saptanan kadınlarda HPV DNA pozitifliği. *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi* 2009; 1: 10- 14
23. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32: 16- 24.

24. International Agency for Research on Cancer. IARC Handbooks of Cancer Prevention. Cervix Cancer Screening. Lyon: IARC Press, 2005.
25. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006; 119 (5): 1108- 24.
26. Schmeink CE, Melchers WJG, Hendriks JCM, et al. Human Papillomavirus Detection in Pregnant Women: A Prospective Matched Cohort Study. *J of Women's Health* 2012; 21(12): 1295- 01.
27. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, et al. Prevalence and Risk Factors for Oncogenic Human Papillomavirus Infections in High-Risk Mid-Adult Women. *Sexually Transmitted Diseases* 2012; 39 (11): 848- 56.
28. Köse F, Turan T. Servikal kanser tümörogenezi ve HPV. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* 2009; 2 (1): 13- 8.
29. Ergünay K, Mısırlıoğlu M, Pınar F, Tuncer ZS, Tuncer S, Ustaçelebi S. Human papillomavirus DNA in cervical samples with cytological abnormalities and typing of the virus. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41 (2): 219- 6.
30. Castle PE, Sadorra M, Garcia F, Holladay EB, Kornegay J. Pilot Study of a Commercialized Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Assay: Comparison of HPV Risk Group to Cytology and Histology. *J Clin Micro* 2006; 3915- 17.