

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SERVİKAL DİSPLAZİLERDE FARKLI HPV
SUBTİPLERİNİN E6/E7 GEN EKSPRESYONU ANALİZİ

UZMANLIK TEZİ

Dr.Barış ÇIPLAK
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ercan YILMAZ

MALATYA – 2015

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SERVİKAL DİSPLAZİLERDE FARKLI HPV
SUBTİPLERİNİN E6/E7 GEN EKSPRESYONU ANALİZİ

UZMANLIK TEZİ

Dr.Barış ÇIPLAK

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ercan YILMAZ

MALATYA – 2015

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TEŞEKKÜR	iv
TABLolar LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
KISALTMALAR	ix
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	11
2.1. SERVİKS	11
2.1.1.Embriyolojisi	11
2.1.2. Anatomi	12
2.1.3.Histoloji	13
2.1.4.Transformasyon Zonu	15
2.1.5.Sitoloji	18
2.2. SERVİKAL DİSPLAZİLERDE SİTOLOJİ	19
2.2.1. Servikovajinal Sitolojisi	21
2.2.2. Bethesda Sistemi	23
2.2.3. Servikovajinal Sitolojinin Yorumlanması	25
2.2.4. Anormal Sitolojiler	25
2.2.4.1. Atipik Skuamöz Hücreler (ASC-US / ASC-H)	26
2.2.4.2. Düşük Dereceli Skuamöz İntreepitelyal Lezyon (LSIL)	27
2.2.4.3. Yüksek Dereceli Skuamöz İntreepitelyal Lezyon (HSIL).....	28
2.2.4.4. İnvaziv Skuamöz Hücreli Karsinom.....	28
2.2.4.5. Atipik Glandüler Hücreler/Adenokarsinoma In Situ (AGC/AIS)	29
2.2.4.6. İnvaziv Adenokarsinom.....	30

2.3. ANORMAL SİTOLOJİNİN YÖNETİMİ	31
2.3.1. Yetersiz Sitoloji Yönetimi	31
2.3.2. Paps Smearinde EC/TZ Komponenti Görülme Yen Kadınlara Yaklaşım	33
2.3.3. Sitoloji Negatif / HPV Pozitif Olgu Yönetimi	34
2.3.4. Anormal Servikal Tarama Testi Olan Kadınlara Yaklaşım	37
2.3.4.1. ASC-US Yönetimi	37
2.3.4.2. ASC-H Yönetimi	41
2.3.4.3. LSIL Yönetimi	42
2.3.4.4. HSIL Yönetimi	44
2.3.4.5. AGC Yönetimi	46
2.4. HPV	49
2.4.1. Düşük Riskli HPV Tipleri	54
2.4.2. Yüksek Riskli HPV Tipleri	55
2.4.3. Düşük ve Yüksek Riskli HPV Tiplerinin Fonksiyonel Farklılıkları	56
2.4.4. HPV Enfeksiyonun Doğal Seyri	59
2.4.5. HPV'nin Yaşam Döngüsü	60
2.4.5.1. Viral Giriş	61
2.4.5.2. ÜrÜktif Viral Enfeksiyon	62
2.4.5.3. Konak Savunması	63
2.4.6. Servikal İntraepitel Neoplazilerin Oluşumu ve Seyri	64
2.4.6.1. Persistan HPV Enfeksiyonlarının Progresyonu	66
2.4.6.2. İnvazyona İlerleyiş	68
2.5. SERVİKAL LEZYONLARIN TANI YÖNTEMLERİ	70
2.5.1. Paps Smear	72
2.5.2. Sıvı Bazlı Teknikler (Thin Prep)	75
2.5.3. Komputerize Teknikler	75
2.5.4. Asetik Asit Testi (Via/Viam)	76
2.5.5. Spektroskopi	76
2.5.6. Spekuloskopi	77
2.5.7. Servikografi	77
2.5.8. Kolposkopi	77
2.5.9. Polarprobe	83
2.5.10. HPV Testleri	83
3. MATERYAL VE METOD	89

3.1. SERVİKAL BİYOPSİ ÖRNEKLERİNİN ÇALIŞILMASI	90
3.2. HPV DNA TESPİT EDİLMESİ VE HPV TİPLERİNİN BELİRLENMESİ	90
3.3. HPV POZİTİF ÖRNEKLERDE E6/E7 GEN EKSPRESYONUN TESPİT EDİLMESİ.....	92
3.4 İSTATİKSEL ANALİZ	95
4.BULGULAR.....	96
5.TARTIŞMA.....	105
6. SONUÇ	113
7. ÖZET	114
8. SUMMARY	115
9. KAYNAKLAR	116



TEŞEKKÜR

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim süresince bana her alanda destek olan, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım benim için her zaman yeri ayrı olan başta değerli tez danışmanım Doç. Dr. Ercan YILMAZ 'a

Eğitimim sürecinde tüm bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve eğitimimde katkıda bulunan başta bölüm başkanımız Doç.Dr. Abdullah KARAER ve Yrd.Doç.Dr.Ebru İnci COŞKUN olmak üzere bölümümüzün diğer tüm öğretim üyelerine,

Tüm tez çalışması sürecinde bana desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Barış OTLU ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi Moleküler Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tüm çalışanlarına

Tüm asistan arkadaşlarıma,

Tüm Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı bünyesinde çalışan hemşire, intörn doktor ve personellere,

Bütün ihtisas sürem boyunca beni manevi olarak destekleyen ve her koşulda yanımda yer alan sevgili eşim Dr. Sibel ÇIPLAK'a, biricik oğlum Utkan Ali ÇIPLAK'a ve yenidoğan güzel kızım Elis Vera ÇIPLAK'a

Sahip olduğum her şeyde payları olan ve yaşamımın her döneminde benden desteklerini esirgemeyip bu günlere gelmemi sağlayan sevgili ANNEM, BABAM ve KIZKARDEŞİME

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1. Servikal kanser taraması metodlarının gelişimi	3
Tablo 1.2. Bethesda sisteminin oluşturulmasından 21. yüzyıla kadar servikal kanserin önlenmesi (16).	7
Tablo 2.1. Smear Sonuçlarının Sitolojik Ve Histolojik Sınıflandırması	22
Tablo 2.2. Servikovajinal Anomaliler İçin Bethesda Sistem Klasifikasyonu (2001).....	24
Tablo 2.3. HPV Gen Fonksiyonları (202).....	51
Tablo 2.4. Genital Sistem ve Diğer Mukozal HPV Klinik İlişkisi (212).....	53
Tablo 2.5. Regresyon, Perzistans Ve Progresyon Oranları (278).....	67
Tablo 2.6. Servikal Kanser Tarama Programları	71
Tablo 2.7. Kolposkopi Terminolojisi.....	81
Tablo 3.1 Amplifikasyon Kontrolü İçin Gerekli Karışım.....	91
Tablo 3.2 Rotor - Gene Talimatnamesi Sıcaklık Ayarları	91
Tablo 4.1 Anormal Smear Sonucu Olan Hastaların Demografik Özellikleri	97
Tablo 4.2 Anormal Smear Sonuçlarının Dağılımı	98
Tablo 4.3 HPV DNA Pozitif Olguların Tip Dağılımı.....	99
Tablo 4.4 Anormal Smear Sonucuna Göre HPV DNA Pozitiflik Oranları	99
Tablo 4.5 Anormal Smear Sonucuna Göre HPV DNA(+) Tip Dağılımı.....	100
Tablo 4.6 HPV DNA Pozitif Hastalarda HPV E6/E7 mRNA Dağılımı.....	101
Tablo 4.7 HPV DNA Tip-16 Pozitif Olgulardaki Servikal Biyopsi Sonuçları.....	101
Tablo 4.8 ASCUS Olan Olgularda Servikal Biyopsi Sonuçları	102
Tablo 4.9 ASCH Olan Olgularda Servikal Biyopsi Sonuçları.....	102
Tablo 4.10 LGSİL Olan Olgularda Servikal Biyopsi Sonuçları	102
Tablo 4.11 HGSİL Olan Olgularda Servikal Biyopsi Sonuçları	103
Tablo 4.12. Servikal Biyopsi Sonuçlarının HPV DNA Sonuçları.....	103
Tablo 4.13. Servikal Biyopsi Sonuçlarını Normal - Anormal Olarak Sınıfladığımızda HPV DNA sonuçları	103
Tablo 4.14. Servikal Biyopsi Sonuçlarının E6/E7 mRNA Sonuçları	103

Tablo 4.15. Servikal Biyopsi Sonuçlarını Normal-Anormal Olarak Sınıfladığımızda HPV DNA Sonuçları	104
Tablo 4.16. HPV DNA ve HPV mRNA İkiside Pozitif Olan Grupların CİN3 Yönünden Karşılaştırması	104
Tablo 4.17 HPV DNA ve E6/E7 mRNA apraz Tablosu	104



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 HPV yaşam döngüsü	9
Şekil 2.1 Kadın Genital Sistem Anatomisi	13
Şekil 2.2. Skuamoz Epitel.....	14
Şekil 2.3 Skuamo Kolumnar Bileşke Skuamöz Metaplazinin Histolojisi	16
Şekil 2.4 Normal Servikal Hücreler.....	18
Şekil 2.5. Servikal Karsinogenez (77)	20
Şekil 2.6. Serviksteki Epitelyal Değişiklikler	21
Şekil 2.7. Normal - Anormal Sitolojiler	25
Şekil 2.8. LSIL.....	27
Şekil 2.9. HSIL	28
Şekil 2.10. Skuamöz Hücreli Karsinom.....	29
Şekil 2.11. Yetersiz Sitoloji Yönetimi	33
Şekil 2.12.30 Yaş ve Üzeri Hr-HPV(+)/Cyto(-) Olgu Yönetimi.....	36
Şekil 2.13. ASC-US Sitoloji yönetimi	38
Şekil 2.14. 21-24 yaş ASC-US ve LSIL Sitoloji yönetimi	41
Şekil 2.15. ASC-H Sitoloji yönetimi	42
Şekil 2.16. LSIL Sitoloji yönetimi.....	43
Şekil 2.17. Gebelerde LSIL Sitoloji yönetimi	44
Şekil 2.18. HSIL Sitoloji Yönetimi	45
Şekil 2.19. Gebelikte HSIL ve ASC-H Sitoloji Yönetimi	46
Şekil 2.20. AGC Sitoloji yönetimi-1	48
Şekil 2.21. AGC Sitoloji yönetimi-2	48
Şekil 2.22. HPV Elektron Mikroskopisi Görüntüsü	49
Şekil 2.23. HPV Genomunun organizasyonu	50
Şekil 2.24. HPV Filogenetik Ağacı	54
Şekil 2.25. E6 ve p53'nin Karsinogeneze Etkisi	58
Şekil 2.26. E7 ve pRB'nin Karsinogeneze Etkisi	59
Şekil 2.27. HPV Enfeksiyonu Seyri.....	62

Şekil 2.28. HPV nin Oluşturduğu Servikal Lezyonlar (16).....	65
Şekil 2.29. CIN Oluşumu.....	67
Şekil 3.1 Nuclisens EasyQ Genetic Analyzer Cihazı Çalışma Rakının Şematik Görünümü (S= Örnek).	92
Şekil 3.2 E6/E7 onkoprotein çalışma prosedürü (Biomerieux, Fransa)	95
Şekil 4.1. HPV DNA Pozitiflik ve Negatiflik Oranı.....	98



KISALTMALAR

ACOG	: American College of Obstetricians and Gynecologists
ASCCP	: The American Society for Colposcopy and Cervical Pathology
AGC/AGUS	: Atypical Glandular Cells
AİS	: Adenocarcinoma İn Situ
ALTS	: ASCUS-LSIL Triage Study
ASC-H	: Atypical Squamous Cells- Cannot Exclude HSİL
ASC-US	: Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance
CİN	: Cervical İntraepithelial Neoplasia
CİS	: Karsinoma İn Situ
Cyto(-)/HPV(+)	: Sitoloji negatif/HPV DNA Pozitif
DBH	: Southern Blot Hibridizasyon
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
E	: Early (Erken bölge)(E1, E2, E4, E5, E6,E7 vb.)
ECC	: Endoservikal Küretaj
EC/TZ	: Endoservikal Kanal/Transformasyon Zonu
ELİSA	: Enzyme Linked İmmunosorbent Assay
FISH	: Filter İn Situ Hibridizasyon
FDA	: Food and Drug Administration
HC2	: Hybrid Capture2
HPV	: Human Papilloma Virus
hr HPV	: High Risk Human Papilloma Virus- Yüksek Riskli HPV
HSİL(HGSİL)	: High Grade Cervical İntraepithelial Lesion
IARC	: İnternational Agency for Researc on Cancer
lr HPV	: Low Risk Human Papilloma Virus- Düşük Riskli HPV
ISH	: İn Situ Hibridizasyon
KETEM	: Kanser Erken Teşhis Tedavi ve Eğitim Merkezi
L	: Late (Geç bölge) (L1,L2 vb.)

LBC	: Liquid Based Cytology-Sıvı Bazlı Sitoloji
LCR	: Long Control Region - Uzun Kontrol Bölgesi
LiPA	: Line Probe Assay
LSIL(LGSİL)	: Low Grade Cervical Intraepithelial Lesion
mRNA	: Messenger RNA
NASBA	: Nucleic Acid Sequence Based Amplification
NCCN	: National Comprehensive Cancer Network
NCI	: National Cancer Institute
NOS	: Not Otherwise Specified
OKS	: Oral Kontraseptif
ORF	: Open Reading Frame - Açık Okuma Bölgesi
PAPS	: Papanicolau
PBS	: Phosphate Buffer Solution
P/C	: Probe Küretaj
PCR (PZR)	: Polymerase Chain Reaction
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pRb	: Retinoblastoma Geni
p53	: Tümör Süpresör Geni
RRP	: Tekrarlayan Solunum Papillomatozu
SBH	: Dot Blot Hibridizasyon
SKB	: Squamo Kolumnar Bileşke-Squamo Columnar Junction
SPSS	: Statistical Package For Social Sciences
TBS	: The Bethesda System
TS-PCR	: Type Specific-PCR
URR	: Upstream Regulatory Region
WHO	: World Health Organization

1.GİRİŞ

Servikal kanserler ilk olarak M.Ö.400'lü yıllarda Hipokrat tarafından tariflenmiştir. 1942 yılında, İtalya'nın Verona şehrinde Rigoni-Stern, rahibelerde servikal kanserin nadir olarak görüldüğünü gözlemledi. Servikal kanserin fahişeler arasında sık görülen bir hastalık olduğu ve bu nedenle servikal kanser gelişiminde koital aktiviteyle ilişkili olabileceğini düşündü (1). Fakat bu durumu o dönemin tıbbi teorilerine uygun olarak 'sinirsel irritabilite' den kaynaklandığını şeklinde yorumladı. 1950 de Quebec te rahibelere jinekolojik bakım hizmeti veren bir klinisyen Rigono-Stern'in gözlemlerini doğrulayacak şekilde bu özel kadın grubunda hiç servikal kanser olmadığını farketti (2). Bu saptama, servikal karsinogenezele ilişkili olabilecek cinsel yolla bulaşabilecek bir hastalığın olabileceği sonucuna varıldı. 1960 lı yılların sonlarına doğru invazif servikal kansere neden olan hücresel değişikliklerin anlaşılması hususunda önemli ilerlemeler kaydedildi. Ama etken faktör olarak yıllarca en fazla HSV tip2 üzerinde yoğunlaşıldı (3). 1976'da Meisels ve Fortin'in HPV (Human Papilloma Virüs)'nin anormal sitolojik bulgulara yol açtığını ortaya koyan yayınlara rağmen uzunca bir süre HSV üzerinde duruldu (4). 1970 yıllarında zur Hausen'nin servikal kanserlerde muhtemel etkenin HPV olduğu yönündeki tahminleri (5, 6) ve daha sonra onun ekibi tarafından servikal neoplastik lezyonlarda HPV varlığı gösterilmesine (7,8) başlangıçta şüphe ile bakılmasına rağmen, en sonunda servikal kanserlerin hepsinde olmasa da çoğunda etyolojik ajanın HPV olduğunun kabul edilmesini sağladı. Bu önemli keşfi nedeniyle 2008 yılında Harold zur Hausen Nobel Tıp Ödülü'nü aldı.

Servikal kanser taramasında sitolojinin öncü olması nedeniyle önemi büyüktür. (Tablo 1.1) 1926 yılında Aural Babes, servikal kanserin saptanmasında kullanılacak

sitolojik örneklemeyi ortaya koydu. Aynı dönemde, George Papanicolaou vajinal hücreler üzerindeki hormonal etkileri incelerken erken aşamada servikal kanserli hastaların vajen yüzeyinde anormal hücrelerin mevcut olduğunu fark etti (9). Aslında benzer olan bu iki sonuca aynı zamanda varılmasına rağmen Papanicolaou'nun çalışması çok daha fazla kabul gördü. 1941 yılında Papanicolaou ve Traut servikal sitoloji konusundaki ilk bulguları yayımladılar (10). Böylelikle Paps Smear rutin kullanıma girmeye başladı. Servikal sitoloji ile tarama konusunda prospektif randomize bir çalışma yayınlanmamış olmasına rağmen, büyük ölçekli kitlesel tarama programlarının uygulanmaya başlanmasından sonra servikal kanser insidansının azalması, Paps Smear'ın bugüne kadar kanseri önlemek amacıyla kullanılan en başarılı test olarak kabul edilmesine neden olmuştur. Servikal kanser insidansı 3-4 kat azalma sağlanmıştır (11). Servikal kanserlerin önlenmesinde ki bu önemli başarı servikal sitolojik tarama ve kolposkopinin birlikte kullanımı sonucunda saptanan yüksek dereceli lezyonların tedavisi ile olmuştur (12).

Tablo 1.1. Servikal kanser taraması metodlarının gelişimi

1926	Babes (Romanya), servikal kanserin saptanmasında servikal/vajinal sitolojinin kullanımını Papanicolaou'da birkaç ay önce tarif etti (9).
1927	Fischer-Wasels, servikal karsinogenez sürecinde metaplazinin önemini rapor etti (10).
1928	Papanicolaou, servikal kanserli hastalarda vajene dökülen anormal hücrelerle ilgili gözlemlerini sundu (13). Schiller (Almanya), iyot solüsyonunun serviks kanseri taramasında kullanılabileceğini bildirdi (14) Daha sonraları Schiller testi kolposkopi sırasında yardımcı bir uygulama olarak kullanıldı.
1930'lar-1940'lar	Kuzey Amerika'da servikal neoplazilerin primer taramasında ucuz bir yöntem olarak Schiller solüsyonu kullanımı başladı. Avrupa'da ise kolposkopi servikal neoplazilerin primer tarama yöntemi oldu (10).
1941	Papanicolaou ve Traut (Amerika Birleşik Devletleri), servikal sitoloji konusundaki ilk bulguları yayınladı (10).
1943	Papanicolaou ve Traut, servikal neoplazilerin vajene dökülen hücreler yoluyla teşhis edilmesi konusundaki ilk kitabı yayınladı (15). İsviçre ve Avusturya'daki kolposkopistler kolposkopi gereken hastaların saptanması için servikal sitolojiyi kullandı (10).
1944	Avrupa sitolojik taramayla tanıştı (16).
1947	Ayre (Kanada),serviksin sitolojik örnekleme için kullanılacak tahta spatulayı buldu (17).
1949-1954	Servikal kanserin Papanicolaou (Paps) smear kullanarak taranması Amerika Birleşik Devletler'inde kabul görmeye başladı (16).
1950	Glatthar, belirgin "atipik epiteli alt kategorilere ayırdı. Bu kategoriler daha sonraki histolojik olarak CIN 1,2 ve 3 şeklinde adlandırılan lezyonlarla daha uyumlu idi (18).
1954-1955	Dietel, serviksteiki asetik asit beyazı alanların hepsinin premalign potansiyel taşımadığını ortaya koydu (19).
1955	Koss, koilosit'leri tarif etti (20).

Serviksin in vivo muayenesinde Recaimer'in 1800'lü yılların başlarında modern spekulumu keşfiyle başlar. Patolojik spesmenlerin mikroskop altında incelenmeye başlanmasıyla, 1900'lü yılların başından itibaren, düzensiz hücre çoğalması olarak tariflenen kanser kavramını ortaya kondu. Bu mikroskopik incelemeyi ilk yapan Virchow oldu (3). Fakat serviksin lökoplaki şeklinde tanımlanan beyaz lezyonları uzun

bir süre sonra literatürde yer almaya başladı. Bu lezyonların birçoğunun invaziv kansere ilerlediği gözlemlendi (21, 22). Lököplakileri araştırmakla görevlendirilen Hans Hinselman, lököplakinin her zaman prekanseröz veya kanseröz bir durumu işaret ettiği sonucuna vardı, ama daha iyi araştırma yapmak için serviksin büyütülerek incelenmesi gerektiği anladı (23). Bu nedenle serviksin aydınlatılmasına ve büyütülerek incelenmesine imkan verecek bir cihaz tasarlamaya koyuldu böylece ilk kolposkopi cihazı Hans Hinselman tarafından 1924 yılında geliştirildi (22, 24). Bir ışık kaynağının bağlı olduğu Leitz binoküler mikroskopu bir standı monte ederek 3 ila 30 kat arası büyütme yaparak en olası küçük invazif kanseri saptamakta kalmayıp ayrıca normal serviksin, CIS (karsinoma in situ) ve CİN (servikal intraepitelyal neoplazi) özelliklerini tarif etti. Ayrıca dilüe asetik asit kullanılarak servikal mukusu ortamdaki uzaklaştırmaya çalışırken asetik asit beyazını (acetowhite) keşfetti. Morfolojik değişikliklerin ince detaylarını tarif edebilmek ve görsel bulgularla histolojik detayları karşılaştırabilmek Hinselman'ın kolposkopu sayesinde mümkün hale geldi (25). Bu sayede punktasyon ve mozaik patern tarif edildi ve epitelde saptanan histolojik değişikliklerle ilişkilendirildi. Başlıca transformasyon zonunu tuttuğu kabul edilen (24, 26) bu anormal alanlar, matriks karsinom bölgesi şeklinde nitelendirilmiştir (27). Walter Schiller serviksin taraması için Lugol solusyonu denilen iyotlu solusyonu kullanarak neoplastik dokunun renginin değişmediğini gösteren Schiller İyot testi keşfetmiş (14). Paps smear testinin ortaya çıkmasıyla Schiller İyot Testi servikal kanserin primer taramasında kullanım dışı kalmıştır. Ancak daha sonra kolposkopide yardımcı yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Tipik, immatür veya reaktif metaplazi alanları ilk başta basit atipik şeklinde, bugün CİN olarak adlandırılan lezyonlar ise belirgin atipik şeklinde tanımlanmıştır, ama 1950'li yıllara gelene kadar bunların farklı iki antite olduğu anlaşılabilmiştir. Glatthar, belirgin atipik epitel alt kategorilere ayırmıştır (28) ki bu kategoriler yakın zamanda histolojik olarak CİN (1, 2, 3) veya sitolojik olarak LSIL, HSIL şeklinde adlandırılmıştır. CİN lezyonlarının metaplaziden ve benign maturasyon bozukluklardan kolposkopik olarak ayrımı bir sorun olmaya devam etmekte olup CİN'in kolposkopik olarak ayrımının beklenenden daha düşük bir doğrulukla yapılabildiği ortaya çıkar. Aslında yanıltıcı olan altta yatan yüksek dereceli lezyonun taramanın başında bile ileri aşamada olmasıydı. Yani kolposkopi tarihindeki ilk yılları boyunca hakim olan kolposkopinin histolojiyi doğru bir şekilde tahmin edeceği izlenimi doğrudur.

Papanicolaou'nun servikal sitoloji ile ilgili çığır açan çalışmaları ile kolposkopinin keşfi eş zamanlı ortaya çıkmıştır ve başlangıçta hem sitoloji, hemde kolposkopi servikal kanseri erken evrede saptamayı amaçlamışlardır (13, 23). Fakat, kolposkopik görünümle histoloji korele edildiğinde, kolposkopinin en önemli rolünün preinvaziv servikal hastalığı saptama kapasitesi olduğu anlaşılmıştır. Kolposkopinin 1970'li yıllarda serviksteki lezyonların lokalizasyonunu belirlemesi amacıyla kullanılan bir yaklaşım olarak yaygın kabul görmesi, anormal Paps semaer test sonucu olan kadınlara daha akılcı bir yaklaşımda bulunma imkanını birlikte getirdi. 1970'li yılların sonlarında anormal servikal sitolojide zorunlu ve tamamlayıcı bir uygulama olarak büyük kabul gördü. Bundan önce anormal Paps sonucu olanlara yaklaşım tamamen sitolojik anormalliğin derecesine bağlı idi. Bu durum řu sorunları birlikte getirdi; minör servikal anormalliklerin içinde nadiren olsa yüksek dereceli servikal intraepitelyal neoplazi (CİN 2, 3) ve adenokarsinoma in situ (AIS) olabileceği düşünülürken bu oranların daha yüksek olduğu (%10-30) ancak 1980'lerde anlaşılmıştır (29). Hastaların nerilen Paps tekrarını yaptırmamasına veya testin yalancı negatifliğine bağlı olarak bazı kanser vakaları atlanabilmekteydi (30). Ayrıca kanser şpnesi olan yüksek dereceli lezyonlara agresif bir biçimde konizasyon yapılmaktaydı, çünkü körlemesine alınan dört kadran servikal biyopsinin önemli lezyonları nadirde olsa atlayabilmekteydi. Bundan dolayı kolposkopinin yaygın kullanıma girmesinden önce sitolojik anormallikleri olan kadınlara sıklıkla ya yetersiz değerlendirmeye ya da gereksiz agresif tedavilere maruz kalıyorlardı.

Wall Street Journalda 1987 yılında laboratuvar hataları nedeniyle Paps testinin servikal kanserlerin önemli bir kısmını atladığı şeklinde makalelerin yayımlanması büyük tartışmalara yol açtı. Bu makalede o dönemde servikal sitolojik taramanın doğasından kaynaklanan sorunlar ortaya konmuş ve bu sorunlar arasında laboratuvarların yetersiz denetimi, laboratuvar personelinin çok çalıştırılması ve servikal kanserlerin atlanmasına neden olan yalancı negatif Paps test sonuçları vardı (31). Bunun zerine ABD hkmeti 1988 yılında Klinik Laboratuvarı Düzenleme Kanunu adlı kanun çıkartarak sitoloji laboratuvarları ile ilgili düzenlemeleri değiştirdi (32). Buna ek olarak, servikal sitolojik değerlendirmenin subjektif olması nedeniyle sonuçların klas şekilde ifade edildiği Paps test terminolojisinin, riskleri göstermede yetersiz olduğunun anlaşılması zerine National Cancer Institute Bethesda, Maryland'da bir konferans düzenlendi. Bu konferansın genel amacı servikal sitoloji terminolojisini gözden geçirip

yeniden düzenlemektir (Tablo 1.2). Bethesda Sistemi şeklinde adlandırılan yeni terminoloji servikal sitoloji kalsifikasyonunu ve sonuçları raporlama sistemi önemli ölçüde değiştirmiş oldu (33). Koilositik atipi, düşük dereceli atipilerle birlikte, LSIL olarak adlandırılan tek bir anormal kategori içine alındığı gibi normal sınırlar içinde şeklinde rapor edilmeyen, ama aynı zamanda anormal olduğu da rahatlıkla söylenemeyen atipik skuamöz hücreler (ASCUS) olarak adlandırılan ayrı bir kategori içine dahil edildi. Bu minör hücrel değişikliklerin belirsiz bir Paps sınıfı içine konması ve tekrarlayan Paps test sonuçlarının yalancı negatiflik potansiyeli ile ilişkili güvensizlik geleneksel kolposkopik triaj rehberini de değiştirdi (29, 34, 35). Bunun sonucunda ise kolposkopiye refere etme eşiğinin hafif displazi (CIN1) olduğu durumla karşılaştırıldığında hastaların sayısı 3 kat arttı (35). Bunun yanı sıra önemsiz kolposkopik değişikliklerden biyopsi yapılması aşırı histolojik tanılara neden olabilir, çünkü normal metaplastik sürecin varyasyonları ile servikal neoplazinin ayırt edilmesi güç olabilir (36, 37). Sensivitenin artması gereğinden fazla tanı konması da beraberinde getirdiğinden gereksiz tedavi uygulamalarına yol açtı. Bu sorun her ne kadar iyi kolposkopist ve sitolojistler yetiştirilmesi ile giderilmeye çalışılsa da en önemli değişim minör servikal lezyonların remisyona potansiyelinin yüksek olmasının anlaşılması ile tedavinin yerini izlemin almasıdır (38).

1980'li yılların başlarında HPV-DNA testlerinin geliştirilmesi bu öngörünün doğrulanmasına imkan vermiştir (7, 8). Paps test sonucu ASCUS olan hastalarda ara triajda kullanılan HPV testlerinin ortaya çıkmasıyla birlikte bu ikilem kısmende olsa ortadan kalkmıştır. Bu testler sayesinde sitoloji sonucu belirsiz olan hastalarda virüs olup olmadığına bakılarak servikal neoplazi açısından risk altında olmayan HPV negatif hastaların kolposkopiye refere edilmesinin önüne geçilmiştir (16).

Tablo 1.2. Bethesda sisteminin oluşturulmasından 21. yüzyıla kadar servikal kanserin önlenmesi (16).

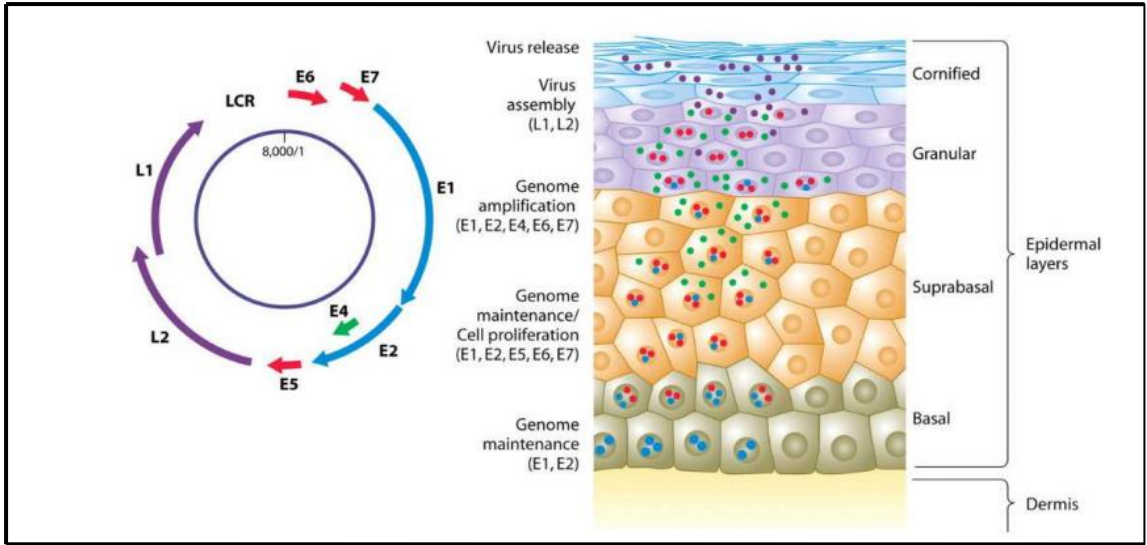
1988	Servikal sitoloji sonuçlarının rapor edilmesinde kullanılan ilk Bethesda sistemi Journal of the Amerikan Medical Association'da yayınlandı Kolposkopi, daha düşük dereceli sitolojik atipisi olan hastaları da kapsayacak şekilde çok daha fazla uygulanmaya başlandı.
1990'lı yıllar	Amerika Birleşik Devletleri'nde daha küçük boyutlu loop'lar kullanarak LEEP yapılması benimsendi ve LEEP işleminin gereğinden çok kullandığı yönünde eleştiriler yapıldı. Majör lezyonlar için daha çok LEEP, minör lezyonlar için ise daha çok kriyoterapinin kullanılmasına karar verildi. Pahalı bir işlem olması ve daha fazla deneyim gerektirmesi nedeniyle, CIN lezyonlarının lazerle tedavisi gözden düştü.
1991	İkinci Bethesda Konferansı'nda servikal sitoloji sonuçlarının rapor edilmesinde kullanılan ilk Bethesda sistemi (TBS) revize edildi.
1995	IARC, servikal kanserlerin büyük kısmında HPV'nin olmazsa olmaz etyolojik faktör olduğunu teyid etti.
1996	Çok sayıda yeni serviks kanseri tarama teknolojisi ortaya çıktı. Bunlar arasında sıvı bazlı sitoloji ve otomatize bilgisayar temelli tarama sistemleri de vardı.
1996'lı yılların sonları	Mali kaynakları sınırlı ülkelerde kullanılabilecek düşük maliyetli servikal kanser tarama modaliteleri yoğun şekilde araştırılmaya başlandı. Bilgisayar temelli dijital görüntüleme sistemleri, geliştirilmiş moleküler HPV problemleri ve normal ve neoplastik dokulardan yayılan ışığın elektromanyetik dalga boyları arasındaki farkın bilgisayarla analizi konularında yoğun çalışmalar yapıldı.
2002	Profilaktik HPV aşısının etkinliğini ortaya koyan ilk çalışma New England Journal of Medicine'da yayınlandı.
2006	Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patoloji Derneği, Anormal Servikal Sitolojilerde ve Servikal Kanser Öncüsü Lezyonlarda Yönetim ile ilgili 2. Konsensus Konferansı'na Bethesda'da ev sahipliği yaptı. Anormal sitoloji ve histolojilerde kanıta dayalı, detaylı yönetim rehberi, ulusal ve uluslar arası kuruluşun katılımıyla, bir konsensus süreci sonrasında revize edildi kapsamı genişletildi.
2006	Dörtlü HPV aşısı, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US Food and Drug Administration) tarafından ruhsat verilen ve Amerikan Aşılama Uygulamaları Danışma Kurulu (US Advisory Commmittee on Immunization Practices) tarafından 9-26 yaş arasındaki bayanlarda rutin kullanımı onaylanan ilk aşı oldu.

Kaynak: Mayeaux, E. J. Thomas Cox, J. Modern Colposcopy, Textbook & Atlas, ASCCP, 2011.

1967 yılında Richart ve Barron servikal karsinogenezin hafif displaziden başlayıp en sonunda invaziv kansere ilerleme şeklinde süreklilik gösteren doğal seyriyle ilgili çalışmalar yayınladılar (39). Bu çalışma sayesinde, displazi ve karsinoma in situ'nun farklı tedaviler gerektirdiği düşüncesi değişmeye başladı. Koss koilositik atipinin sitolojik bulgularını 1955 yılında tanımlamasına rağmen bu sitolojik anormallikte HPV nin rolünün olduğu Meisels ve Fortin tarafından 1976 yılında tespit edilmiştir (4, 20). Neredeyse aynı dönemde Harold zur Housen servikal kanser gelişiminde HPV'nin etken olduğunu ileri sürdü (5, 6). Zur Hausen 1983 yılında

servikal kanserlerde HPV 16 yı izole etmesiyle birlikte bu kanserin etyolojisinde esas etkenin bu virüs olduğu kabul edilmeye başlanmıştır (7, 8). Bu keşiften sonra servikal neoplastik lezyonlarda HPV varlığı gösterilebilmesi, neredeyse tüm servikal kanserlerde etyolojik ajan olarak HPV nin rol oynadığının tespit edilmesine yol açtı. Ayrıca IARC (İnternational Agency for Researc on Cancer) servikal kanserin olmazsa olmaz tek bir etkene bağı olan ilk insan kanseri olduğunu yönünde bildiri yayınladı (40, 41). Servikal kanserin mutlak tek bir viral etkenle (HPV) ilişkili olması bu hastalığın birgün ortadan kaldırılabilceğı yönünde iyimser beklentilerin ortaya çıkmasına neden oldu (40). Bu beklentileri gerçeğe dönüştürme çabaları sonucu HPV aşları geliştirilmeye başlanmıştır (41).

Papilloma virüsler ikozahedral simetrik ve genomu çevreleyen 72 kapsomerli zarfsız DNA virüsleri olup, virüsün dış protein kılıfı, majör ve minör olmak üzere iki protein içermektedir. Virüsün genetik bilgisi ise yaklaşık 8.000 baz çifti içeren halkasal, çift zincirli bir DNA molekülünde kodlanmaktadır (42, 43). Papilloma virüsler küçük boyutlarına rağmen, moleküler yapıları oldukça karmaşık olan virüslerdir⁸. Bu yapı, fonksiyonel olarak erken bölge (early: E), geç bölge (late: L) ve uzun kontrol bölgesi (long control region: LCR) olmak üzere üç bölgeye bölünür. Tüm papilloma virüslerde bu üç bölge iki poliadenilasyon (pA) bölgesi tarafından ayrılmaktadır: Erken pA ve geç pA. Erken bölgede altı ORF (Open reading frame- açık okuma bölgesi) ve geç bölgede iki ORF bulunur. Bütün HPV ORF'leri virüsün sadece bir sarmalı üzerinde yer almaktadır ve sekiz ORF viral hayat siklusundaki gen ekspresyon sırasına göre erken ve geç olarak isimlendirilir. Erken proteinler E1, E2, E4, E5, E6 ve E7 viral replikasyon ve hücre transformasyonunda rol alır (44, 45). Son yıllarda keşfedilen E3 ve E8 de aynı bölgede oluşmakta olup, E2 bölgesinin delesyonu sırasında ortaya çıktığı düşünülmektedir (46, 47). Geç gen bölgesinde ise L1 ve L2 kodlanmaktadır. L1 geni major kapsid proteinini, L2 geni minör kapsid proteinini kodlar. Tüm bu proteinler serviks epitelinde transmembranın uyarılması, hücre siklusunun düzenlenmesi ve transformasyon aktivitesinin denetlenmesi gibi pleotropik fonksiyonlara sahiptir (48). (Şekil 1.1)



Şekil 1.1 HPV yaşam döngüsü

Entegrasyon genom boyunca rastgele meydana gelebilir, ancak genel olarak viral entegrasyon tipik olarak viral E1 ve E2 bölgelerinde meydana gelmektedir (45). Bu genler viral gen ekspresyonu ve replikasyonunu düzenleyen proteinleri kodlamaktadır. E1 proteini viral DNA replikasyonu için önemli olan helikaz aktivitesine sahiptir ve viral replikasyonun başlamasında önemli rol oynayan bir terapötiktir. E2 proteini aynı zamanda iki protein kodlamaktadır; bunlardan biri erken bölgenin transkripsiyonunu baskılar, diğeri ise artırır (46). Servikal kanserin gelişiminde E2 bölgesinde sıklıkla kırılma meydana geldiğinden, HPV DNA entegrasyonu önemlidir. İntegrasyon esnasında E2’de meydana gelen kırılma, E2’nin E6 ve E7 üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırarak, virüsün onkoproteinleri olan E6 ve E7 gen ürünlerinin ekspresyonunda artışa, dolayısıyla da onkogeneze yol açabilir (49). Ancak entegrasyon olmadan da E6 ve E7 genlerinin ekspresyonu gerçekleşebilmektedir (45, 50). Bu nedenle E6 ve E7 onkoproteinleri kanser gelişimi için önemlidir. Bununla birlikte, HPV tiplerinin yüksek risk taşıması, tümör supressör proteini p53 ve retinoblastoma (Rb) ile ilişkili olan E6 ve E7 proteinlerine sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

Bu tez araştırmasının amacı farklı HPV alt tiplerinin yapmış olduğu E6 ve E7 kanser yapıcı protein tespiti ve Servikal displaziler (PAPS anormallikleri) üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Yüksek riskli HPV (hr HPV) subtiplerindeki E6 ve E7 gen ekspresyonunu yapıcı etkilerinin servikal displazi üzerindeki etkilerini araştırmak ve ayrıca bu ekspresyonun servikal displazi şiddeti üzerine etkisini belirlemektir. Beklenen

sonuç ise yüksek riskli HPV sub tiplerinde E6 ve E7 gen ekspresyonunu yapıcı etkilerinin daha fazla görülmesi ve bununda servikal displazi şiddetine etki etmesidir.

Son yıllarda kanser etyopatogenezinde rol oynayan viral faktörler oldukça ilgi çekmekte ve önlenebilir olan bu viral faktörlere ilişkin çeşitli tarama ve tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Özellikle HPV tanı ve tedavisi son yıllarda üzerinde yoğunlukla çalışılan, sürekli değişim ve gelişim içinde olan önemli bir konu olmuştur.



2. GENEL BİLGİLER

Kadın Alt Genital Sisteminin Anatomi ve Histolojisi.

Kadın alt genital sistemi serviks, vajina ve vulvayı içerir.

2.1. SERVİKS

2.1.1.Embriyolojisi

Konsepsiyondan yaklaşık 4 hafta sonra gelişmeye başlar. Testiküler gelişimin olmaması, mülleryan inhibitör maddenin yokluğu ile sonuçlanır. Mülleryan kanallar, ürogenital katlantıların invajinasyonu ile oluşurlar. Bu kanallar, lateralde mezonefroza, kaudalde mezenşime doğru uzanırlar. Yedinci haftada mülleryan kanallar, mezonefrozun anterior ve medialine doğru dönerler, orta hatta birleşirler. Devam eden kaudal büyüme, nihayetinde mülleryan kanalların ürogenital sinüs ile birleşmesiyle sonuçlanır. Solid uç kısım, ürogenital sinüste genişler ve mülleryan tüberkülü oluşturur. Duktuslar arasındaki orta hat septumu kaybolur ve kolumnar epitel ile kaplı tek bir uterovajinal kanal oluşur. Gestasyonun 11. haftasından itibaren çok katlı skuamöz hücreler, kısmen kolumnar hücreler ile yer değiştirmeye başlar ve 16. haftadan itibaren rudimenter bir serviks tanınabilir (51, 52).

Kolumnar ve skuamöz hücrelerin bulunduğu nokta orijinal ya da doğal skuamokolumnar bileşkedir (SKB) (51, 53). Orijinal SKB'nin konumu fetal yaşam boyuca değişiklik gösterir. Gestasyonun 24 - 32. haftaları arasında endoservikal kanal içindedir. Otuz ikinci haftadan sonra vajinaya doğru uzanır, term ile birlikte (40. gebelik haftası) tekrar kanal içine doğru regrese olur (54). Fetal servikste, skuamöz hücrelerin mülleryan kolumnar hücrelerle neden kısmen yer değiştirdiği açık değildir. Skuamöz

hücreler, ürogenital sinüsün kraniyal uzanımından ya da orijinal kolumnar hücrelerin altındaki rezerv hücrelerden köken alabilir (55). Yüksek östrojen düzeylerinin, mülleryan kanalın kaudal uzanımında gecikmeye ve skuamöz hücre gelişiminde bozulmaya neden olabileceği bilinmektedir (56).

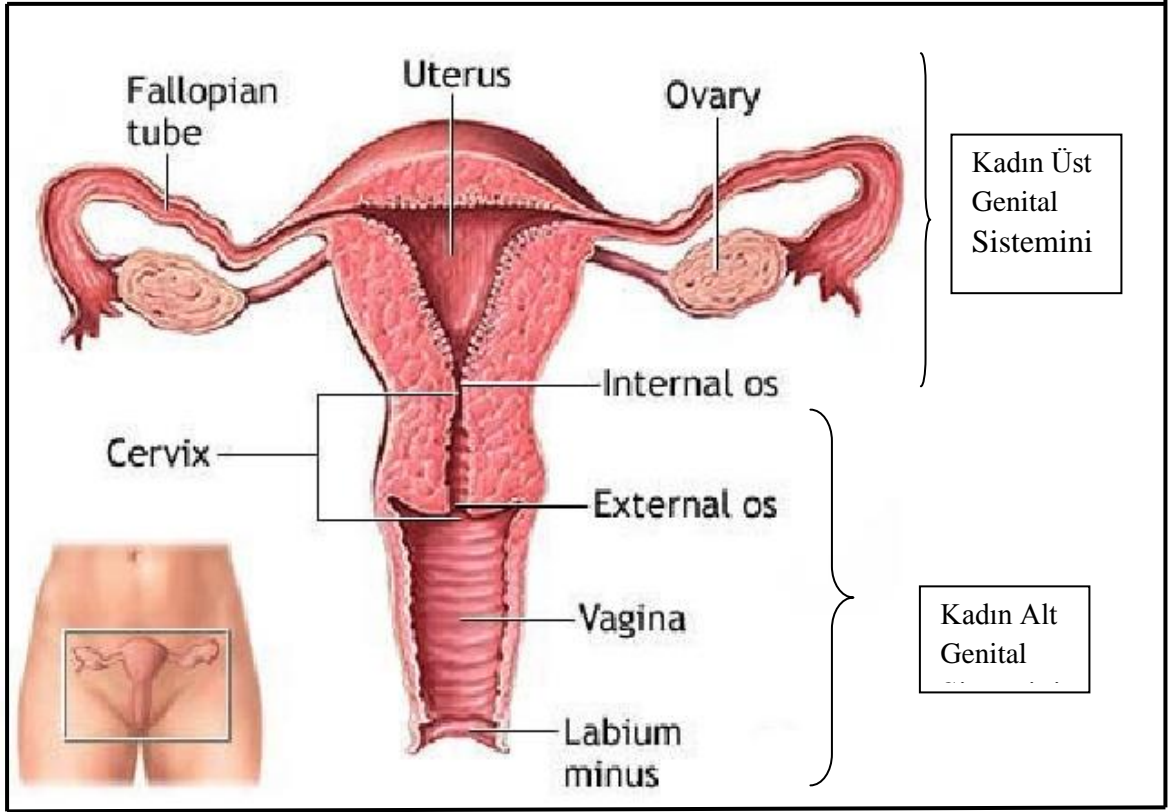
2.1.2. Anatomi

Latince “Serviks” terimi “boyun“ kelimesinden türemiştir. Uterusun inferior uzanımıdır ve iki kısma ayrılır. Alt kısım (porsiyo ya da vajinal serviks) vajinaya uzanır ve spekulum yerleştirildikten sonra görülebilen kısımdır. Üst ya da supravajinal serviks, uterusun vajinaya tutunduğu yerden alt uterin segmente uzanır. (Şekil 2.1) Serviks, vajinada oblik doğrultudadır. Bu nedenle posterior serviks, porsiyonun büyük kısmını ve toplam serviks hacminin yarısını oluşturur (53, 57, 58). Spekulum ile muayenede serviks, yükselmiş bir oval ya da sirküler yapı olarak görünür. Nulliparlarda silindirik serviks, toplam uterus hacminin yaklaşık %50’sini oluşturur (58, 59). Yaklaşık 3 cm uzunluğunda ve 2 cm genişliğindedir. Orta hatta yerleşimli ekstemal servikal os ya da endoservikal kanalın başlangıcı, yuvarlaktır ve 3-5 mm çapındadır.

Serviks, parametrial yumuşak doku, uterosakral ligamentler ve Mackenrodt’un kardinal ligamenti ile desteklenir. Kardinal ligamentler servikal desteğin başlıca ana kaynağını oluştururlar. Broad ligamentinin tabanında, serviksin lateralinden levator ani kasma kadar uzanırlar (57, 58).

Serviksin kanlanması, parametrial yumuşak dokular içinden servikse lateral olarak giren, uterin arterin inen servikovajinal dallan ile sağlanır. Venöz drenajı, arteryel desteğe paraleldir ve yine aynı şekilde, lateral olarak parametrium içinde seyrederek uterin ve hipogastrik venlere olur (59). Serviksin lenfatik drenajı yüzeyel stromal lenfatik aralıktan başlar ve parametrial dokulara doğru uzanır. Bu efferent kanallar paraservikal, obturator, hipogastrik, iliak ve nihayetinde paraaortik lenf nodlarına doğru devam eder (60).

Serviks ve alt vajinanın duyuşal sınırları endoservikal kanal ve derin stromadan başlar. Daha sonra paraservikal, uterosakral pleksus (Frankenhauser gangliyonu) ve pelvik sinirler içinden ikinci, üçüncü ve dördüncü sakral sinir köklerine ulaşırlar (57, 59).



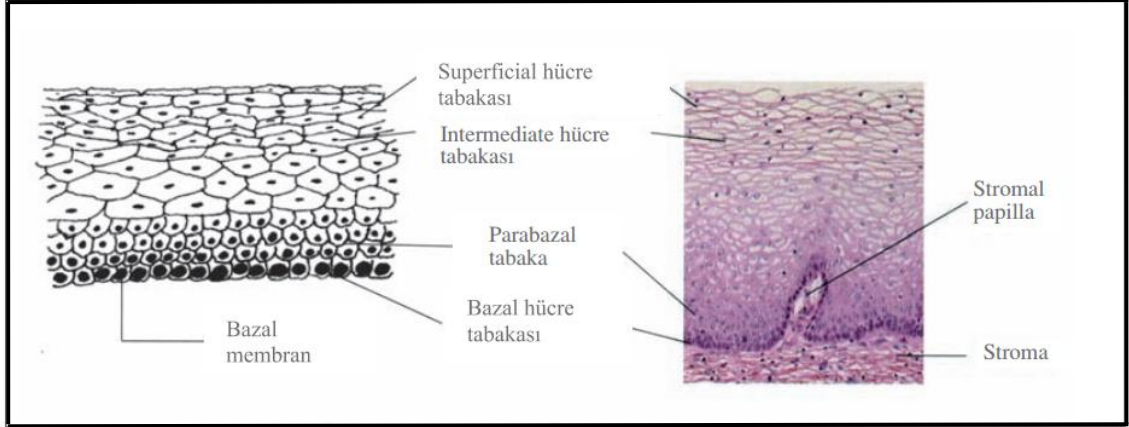
Şekil 2.1 Kadın Genital Sistem Anatomisi

2.1.3.Histoloji

Skuamöz Epitel; Serviksin porsiyö kısmının çoğunluğu çok katlı skuamöz epitel ile kaplıdır. Bu kısım aynı zamanda ektoserviks ya da ekzoserviks olarak da bilinir. Skuamöz hücreler matüre oldukça nükleer materyal miktarı azalırken genel hacimleri artar ve büyürler (53).

Servikal skuamöz hücreler göreceli olarak 4 farklı tabakaya ayrılırlar (Şekil 2.2) (53, 61). Bazal ya da germinal hücre tabakası; geniş, koyu renkli boyanan, yuvarlak-oval şekilli nükleus içeren bir-iki katlı küçük küboidal hücrelerden oluşur. Parabazal ya da sivri uçlu hücre tabakası, geniş, koyu, oval nükleuslu, irregüler polihedral hücrelerden oluşur. Bu hücrelerin çoğunda nukleolus görülebilir. Elektron mikroskopisinde skuamöz diferansiyasyonu gösteren tonofilamentler vardır. Aynı zamanda çok sayıda desmozom (hücre adezyon bölgeleri) da görülür. Intermediate ya da naviküler hücre tabakası, glikojenden zengin, berrak sitoplazmalı, yassılaştırmış hücrelerden oluşur ve skuamöz hücrelerin çoğunluğunu içerir. Nükleuslar küçük, koyu ve yuvarlaktır ve nükleoluslar artık izlenmez. Süperfisiyal ya da stratum korneum

tabakası, küçük piknotik nükleuslu, düz, uzamış hücrelerden oluşur. Kollajen daha çok yüzeysel hücrelerde bulunur.



Şekil 2.2. Skuamöz Epitel

Skuamöz hücrelerin matürasyonunun oldukça değişiklik gösterebilmesinden dolayı sadece bazal ve süperfisiyal hücreler daimi olarak saptanabilirler. Langerhans hücreleri ve az sayıda melanositler skuamöz hücrelerin arasında serpiştirilmiş halde bulunur (53, 57). Skuamöz hücrelerin matürasyonu östrojen bağımlıdır ve 4 gün kadar kısa sürede gerçekleşir.

Premenopoz ve postmenopozal dönemde daha az matür skuamöz hücreler (bazal ve parabazal) baskındır (53, 62). Bu hücreler birçok östrojen ve epidermal büyüme faktörü reseptörü içerirler. Epidermal büyüme faktörü, mitotik aktiviteyi stimüle eder, keratinizasyonu indükler ve skuamöz hücre diferansiasyonunu yönlendirir. Östrojen DNA sentezini stimüle eder ve hücre siklusunu kısaltır (63).

Bir hücre iskeleti, üç tip filamentten (mikrotübüller, intermediate filamentler ve mikrofilamentler) oluşur. Tek biyokimyasal özellikleri olarak çözünmez proteinler olan intermediate filamentler hücre iskeleti matriksinin büyük kısmını oluştururlar. Sitokeratinler, epitelyal hücrelere özgü intermediate filament proteinleridir (64). Bazı araştırmacılar sitokeratinlerdeki değişikliklerin, koloposkopi esnasında asetik asitin kontrast etkisine katkıda bulunduğunu öne sürmektedir (65).

Bazal membran, bazal hücrelerin hemen altında yer alır. Elektron mikroskopisinde genellikle 3 mm kalınlığındadır ve altta yatan servikal stroma ile sınırını oluşturan lamina densa ve bazal hücrelerle sınırını oluşturan lamina lucidayı içerir. Bazal hücreler, bazal membrana tutunmalarını sağlayan ayaksız çıkıntılara sahiptir (62).

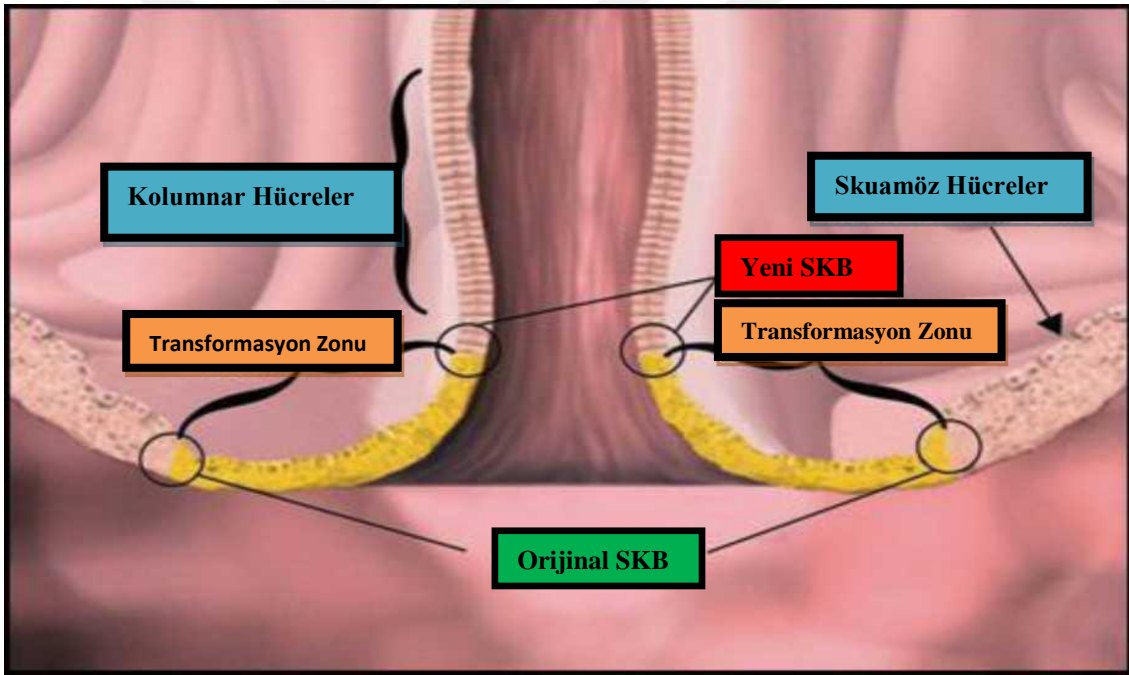
Kolumnar Epitel; Tek tabaka halindeki uzun kolumnar hücreler endoservikal kanalı örterler. Bazı patologlar bu hücreleri glandüler hücreler olarak adlandırır. Yuvarlak ya da oval şekilli, bazal yerleşimli nükleusları bulunur. Çoğunluğu apokrin ve merokrin yol ile mukus (müsin) salgılar. Az sayıda kolumnar hücre silyalıdır ve sperm transportunda rol alabilir (53, 57). Endoservikal hücreler servikal stroma içine yaklaşık 5-8 mm derinliğinde invajine olurlar. Duktal ve asiner yapıların olmaması nedeniyle, teknik olarak bu süreç kript formasyonunu yansıtır. Ancak kesit yüzeylerindeki yuvarlak şekillerinden dolayı, geleneksel olarak, endoservikal gland olarak adlandırılırlar (53). Bir grup dallanan glandın bir araya sıkışması tunnel clusters oluşumuna neden olabilir ve bu durum süperfisiyal yapısal karmaşıklık nedeniyle atipik glandüler hiperplazi ile karıştırılabilir. Bununla birlikte bu kolumnar hücre kümeleri benign karakterdedir. Mikroglandüler hiperplazi bir diğer benign gland proliferasyonu olup, endoservikal hücre tabakalarının birleşerek hücre boşlukları ve gland benzeri yapılar oluşturmasına neden olur. Mitoz yokluğu ve benign nükleer özellikler bu durumun benign yapısını yansıtır. Sıklıkla gebelerde ya da hormonal kontraseptif kullanan genç kadınlarda görülür (53, 57). Servikal stroma, az miktarda düz kas ve elastik lif içeren, fibröz bağ dokusundan oluşur. Kapiller ağlar yüzeyel stromada yer alırlar. Çizgisel damar kıvrımları bu ağlardan dallanır ve skuamöz epitelin bazal ve parabazal tabakalarına uzanır. Endoservikte küçük kapiller kıvrımlar, kolumnar hücrelerin hemen altındadır.

2.1.4.Transformasyon Zonu

Skuamöz Metaplazinin Oluşumu;

Metaplazi terimi, matür bir hücre tipinin farklı bir matür hücre tipine dönüşümü olarak tanımlanır. Bu süreç sıklıkla bir kolumnar hücrenin, çok katlı bir yassı epitel hücreye dönüşümünü içermekle birlikte bir glandüler hücre tipinden farklı bir tipe dönüşüm de görülebilir. Metaplazi, bronş, mide, mesane ve salgı bezleri gibi birçok organda meydana gelebilir. Bununla birlikte servikte görülen metaplazi, servikal intraepitelyal neoplazi ve karsinom gelişim bölgesi olması nedeniyle her zaman büyük ilgi çekmektedir (64). Servikal skuamöz metaplazi alanları tarihsel olarak, erkendiferansiye karsinom ya da üst skuamöz epitelde katlantılar olarak yanlış tanımlanmışlardır (66).

Serviksteki skuamöz metaplaziyi indükleyen faktörler hâlâ iyi anlaşılamamıştır. Çevresel faktörler, mekanik iritasyon, kronik inflamasyon, pH değişiklikleri ya da seks steroid hormon dengesindeki değişiklikler bu durumdan sorumlu olabilir (53). Metaplazi, muhtemelen orijinal skuamo kolumnar bileşke (SKB)'nin porsiyoya ulaşmasıyla ve hassas kolumnar hücrelerin, bakteri ile yüklü asidik vajinal çevreye maruziyeti ile başlar. Kademeli olarak, önce immatür, daha sonra da matür metaplastik skuamöz hücreler kolumnar hücrelerin yerini alır. Bu metaplastik hücreler nihayetinde replike olurlar ve normalde burada bulunan çok katlı yassı hücrelere dönüşürler (53, 57, 58, 67). Bir kadının yaşamı boyunca SKB, en nötral pH içeren servikal mukusa sahip yer olan endoservikal kanal içine doğru geri döner. SKB'nin doğumdaki konumu, orijinal ya da doğal SKB olarak bilinir. Metaplazi indüklenmiş migrasyon sonrası ise yeni SKB ya da basitçe SKB olarak bilinir. Transformasyon zonu ise orijinal ya da doğal SKB ile yeni SKB arasındaki alan olarak tanımlanır (68). (Şekil2.3)



Şekil 2.3 Skuamo Kolumnar Bileşke Skvamöz Metaplazinin Histolojisi

Transformasyonun nasıl oluştuğu yıllarca net olarak anlaşılamamıştır. Skvamöz yer değişiminin mekanizması, skuamöz bazal hücrelerin subkolumnar kalıntıların proliferasyonu ya da yüzeyel servikal stroma içindeki andiferansiye embriyonik artıklardan gelişim olarak tarif edilmiştir (69, 70). Transformasyon zonunun gelişimi

birçok mekanizmayı gerektirebilir. En çok kabul edilen iki mekanizma, daha önceden oluşmuş skuamöz epitelden kaynaklanan yeni skuamöz hücreler ile sürekli epitelizasyon ve subkolumnar rezerv hücrelerden metaplazi gelişimidir.

Başlangıçta, rezerv hücreler yerini alacağı kolumnar hücrelerin hemen altında tek kat bir tabaka olarak görülürler. Zamanla bu basık küboidal hücreler, çok katlı immatür skuamoid metaplastik hücre katmanları şeklinde proliferer olurlar ve kolumnar hücreleri altlarındaki kapiller vasküler destekten uzaklaştırırlar. Bu hücreler sonunda dejenere olup dökülürler ve altta yatan immatür metaplazi açığa çıkar. Skuamöz metaplazideki displastik potansiyelin diğer prediktörleri, metaplastik proliferasyonun derecesi ve metaplastik değişimin oranıdır (58, 73, 74).

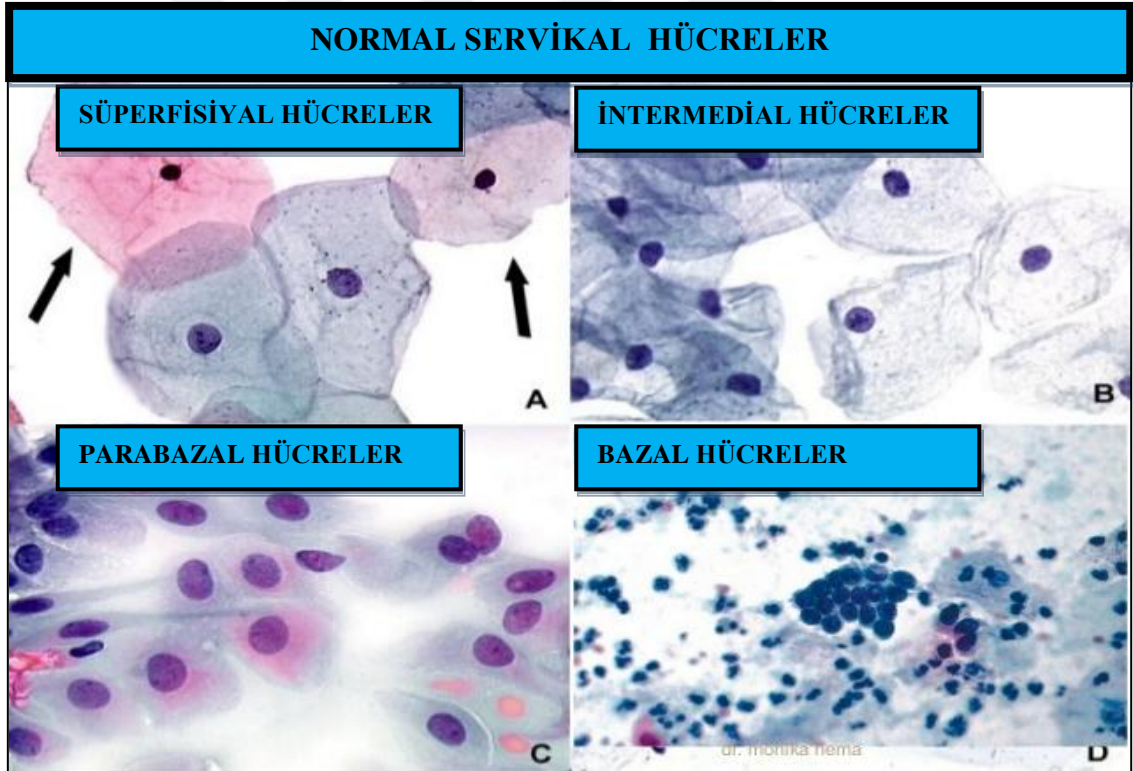
Servikslerin %60'ı kolumnar epitelden matür skuamöz epitele kademeli bir transformasyon geçireceklerdir. Metaplazi en sık, endoservikal kanalın alt üçte birlik kısmında görülür (58). Skuamöz metaplazinin ilk kanıtı, histolojik olarak rezerv hücre hiperplazisi olarak bilinen, subkolumnar rezerv hücrelerin tek tabaka olarak saptanmasıdır. Rezerv hücreler, dar sitoplazmalı, büyük yuvarlak ya da oval nükleuslu küboidal hücrelerdir. Rezerv hücreler proliferer oldukça, sitoplazma miktarı artar. Nükleus boyut olarak bir miktar azalır, keskin nükleer membranlar gelişir ve belirgin bir nükleolusa sahip olur. Süreç devam ettikçe, hücreler yüzeye doğru basıklaşır ve sitoplazma glikojen kazanır; nükleus, tek tip kromatinli, küçük ve yuvarlak bir hale gelir ve nükleolusunu kaybeder (53, 57, 73, 74). Metaplazi süreci oldukça değişkendir ve nonmetaplastik kolumnar epitel içine karışmış halde iyi gelişmiş metaplazi adalarının görülmesi yaygın bir durumdur. Diğer alanlar, endoservikal glandları örten, metaplastik proliferasyon içermeyen ya da az miktarda içeren iyi gelişmiş matür skuamöz epitel özelliği gösterebilirler (53, 57).

Metaplazinin irritasyon ya da inflamasyon nedeniyle meydana gelmesinden dolayı plazma hücreleri ve lenfositlerin görülmesi, yaygın bir durumdur. Nadiren altta yatan stroma ve metaplastik hücrelerin yüzeyinde akut inflamatuvar hücreler bulunur. Yaygın kronik inflamasyon, yüzeyel stroma içinde küçük lenfoid foliküllerin oluşumuna neden olabilir. Bu durum kronik foliküler servisit olarak bilinir; araştırmacılar bu değişikliği servikal *Klamidya Trachomatis* enfeksiyonlu kadınlarda göstermişlerdir (75).

Birçok servikal materyal incelendiğinde, sıklıkla kolumnar epitelden skuamöz epitele, tüm metaplastik süreçte devamlılık gösteren bir geçiş izlenir. Nadiren keskin, ani bir geçiş izlenir ve bu durum skuamöz epitelizasyonu yansıtır olabilir. Küçük biyopsi materyalleri matürasyon, immatür metaplastik hücre proliferasyonu ve rezerv hücrelerin varlığı gibi metaplazinin yaygın özelliklerinin hepsini sıklıkla bulundurmazlar.

2.1.5.Sitoloji

Paps test, çeşitli örnekleme aletleri ile ektoservikal yüzeyin ya da vizüalize edilemeyen endoservikal kanalın bir kısmının kazınarak sıyrılmasını içerir. Yüksek östrojen maruziyeti varlığında sitolojik materyal sıklıkla süperfisiyal ve intermediate hücreleri içerecektir. (Şekil 2.4) Bu hücreler kayık şeklinde ve yaklaşık 40 pm çapındadır. Sitoplazmaları büyük ve sıklıkla eozinofiliktir. Glikojen kazandıklarında perinükleer sarı bir renk gösterirler.



Şekil 2.4 Normal Servikal Hücreler

Süperfisiyal hücrenin nükleusu merkez yerleşimli, küçük, yuvarlak ve koyudur. Intermediate hücrenin nükleusu hafifçe büyüktür ve ince, dengeli dağılmış kromatin içerir. Dökülen hücre miktarı menstrüel siklusla ilişkili değişkenlik gösterir (61). Proliferatif fazda glikojenden zengin süperfisiyal hücrelerin dökülmesinde artış

izlenirken, progesteronun yüksek olduğu sekretuar fazda daha az glikojen içeren intermediate hücreler baskındır (76).

Parabazal hücreler ve az sayıda intermediate hücreler postmenopozal kadınların sitoloji materyallerinde daha yaygın görülür. Parabazal hücreler, daha matür skuamöz hücreler gibi kolaylıkla dökülmezler, kolumnar hücrelere benzer şekilde sıklıkla gruplar halinde elde edilirler. Bu hücreler, matür skuamöz hücrelere göre daha küçük ve yuvarlaktırlar. Merkezde yerleşimli büyük nükleusları vardır. Nükleer membranları düzdür ve nükleer kromatin sıklıkla granüler ya da ince beneklidir. Postmenopozal kadınlarda az miktarda mukus olmasından dolayı konvansiyonel materyallerde hava ile temasa bağlı kuruma sıklıkla görülür. Sonuç olarak, intraepitelyal lezyonlar ile karışabilecek şekilde, nükleus genişleme eğilimi ve kromatinde lekelenme gösterir (57, 61).

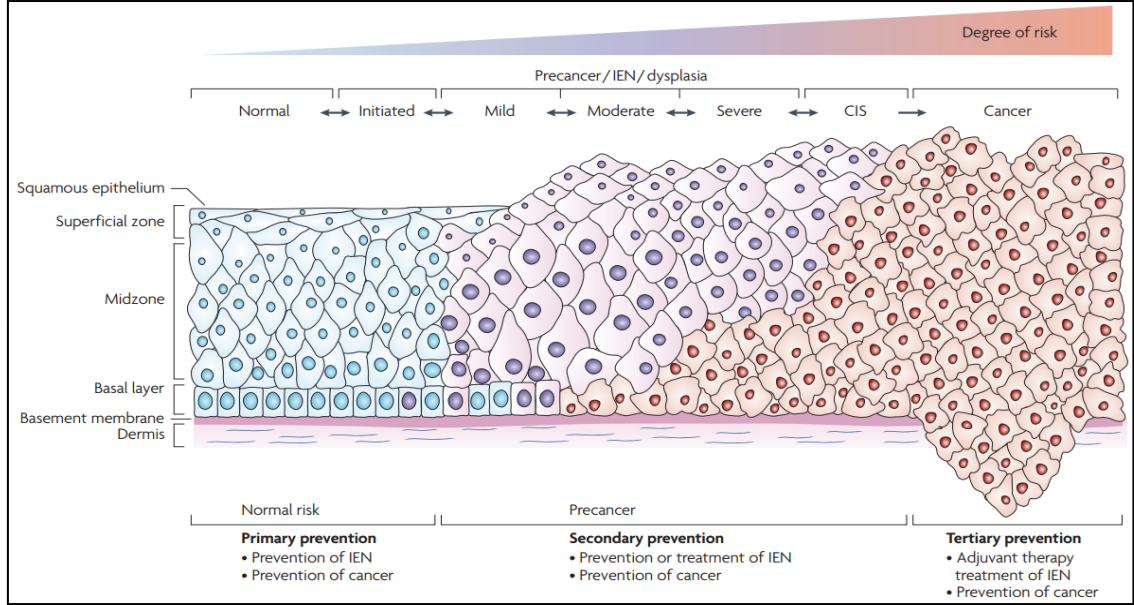
Bazal hücreler hemen hemen hiçbir zaman bir sitolojik materyalde bulunmazlar, ancak rezerv hücreler görülebilirler. Rezerv hücreler sıklıkla bir mukoid zemin içinde lineer tabakalar halinde bulunurlar. Sıklıkla kolumnar hücrelere bitişik olarak izlenirler ve bu durum onların subkolumnar kökeninin kanıtıdır. Rezerv hücreler iyi vakuollü sitoplazmalı, düzensiz sınırlı yuvarlak ya da ovaldirler. Küçük nükleusları yuvarlak ya da fasulye şeklindedir ve belirgin kromatin içerirler. Dizilim ve boyutlarından ötürü bu hücreleri, yüksek dereceli bir skuamöz intraepitelyal lezyondan ayırt etmek zor olabilir.

Metaplastik hücrelerin varlığı, bir materyalin transformasyon zonu elementlerini içerdiğinin minimal sitolojik kanıtı olarak kabul edilir. Bu hücreler tipik olarak küçük, tek tek hücre grupları ya da tabakaları şeklinde görülürler. Metaplastik hücrelerin görünümü, sitolojik olarak parabazal hücrelerinkine benzer olabilir. Bundan dolayı postmenopozal kadınlarda, parabazal hücrelerle metaplastik hücreleri ayırt etmek zordur. Ancak parabazal hücreler daha eozinofilik ve birbirine bağlı olma eğilimi gösterirler ve reproduktif dönemdeki bir kadında nadiren görülürler. Bundan dolayı matür skuamöz hücreler zemininde hafifçe genişlemiş nükleus ve siyanofilik sitoplazmalı, küçük, polihedral ya da oval hücrelerin varlığı skuamöz metaplazinin varlığını gösterir.

2.2. SERVİKAL DİSPLAZİLERDE SİTOLOJİ

Plazi terimi büyüme anlamına gelir. *Displazi ise düzensiz büyüme olarak tanımlanabilir.* Servikal displaziyi anlayabilmek için serviks'in normal yapısını bilmek

gerekir. Serviksin dış yüzünü mikroskop altında incelediğimizde pekçok kattan oluşan hücre tabakaları görürüz. Bu hücrelerin şekli en altta yuvarlak iken yukarılara doğru çıkıldıkça yani hücreler olgunlaştıkça yassı bir hal alır. İşte bu düzenli yapının bozulması, aralarda anormal hücrelerin bulunması servikal displazi olarak adlandırılır. Düzensizlik ne kadar fazla ise displazinin derecesi de o kadar yüksektir. (Şekil 2.5)

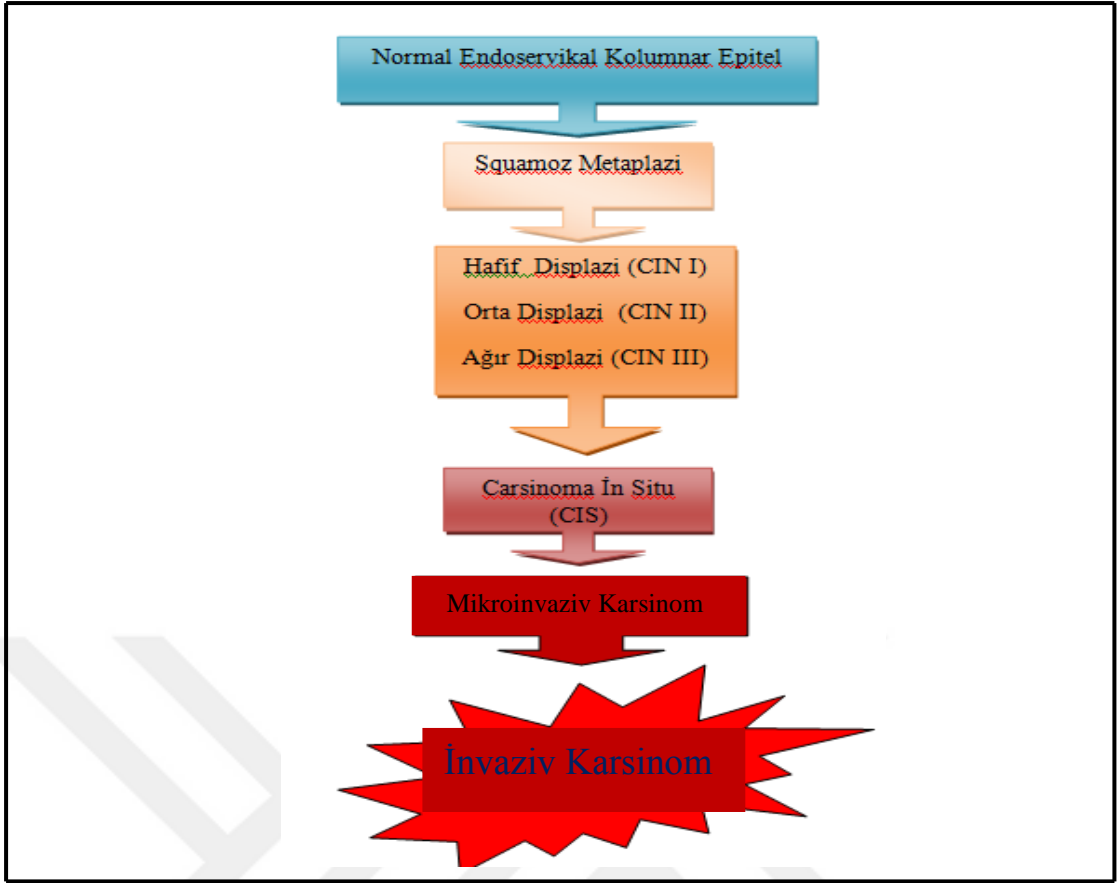


Şekil 2.5. Servikal Karsinogenez (77)

(Şekil Kelloff & Sigman 2007, Şekil 1'den alınmıştır)

Az sayıda hücrenin düzeni bozduğu ama genel anlamda ciddi bir düzensizlik saptanmayan durumlar CIN I olarak adlandırılırken anormal hücrelerin tüm tabakaların yarısının kapladığı durumlar orta dereceli displazi (CIN II), tüm yüzeyin tamamının düzensiz olduğu durumlar ise CIN III olarak adlandırılır. Bu duruma aynı zamanda Karsinoma İn Situ da denir. Bu tablonun tedavi edilmediğinde ileriki dönemlerde kansere ve yayılmaya neden olması kaçınılmazdır.

Displazi ve Karsinoma İn Situ durumlarında olay tamamen rahim ağzının yüzeyel epitel kısmındadır. Oysa kanserde olay dokunun içine doğru ilerlemiştir. Kanseri tedavisi displaziden tamamen farklıdır ve bu iki durum birbirinden tamamen farklı iki hastalık olarak kabul edilmelidir. Serviks kanseri gelişmesinde serviks epitelinde birbiri ardısıra gelen değişiklikler olur, bu da serviks kanserinin erken tanısında önem taşır. (Şekil 2.6)



Şekil 2.6. Serviksteki Epitelyal Değişiklikler

Son yıllarda servikovajinal neoplaziye özel bir önem verilmeye başlanmıştır. Serviksin kolaylıkla muayene edilebilmesi, premalign lezyonların saptanması ve olguların çoğunda normal sağlıklı mukozadan invaziv kanser gelişiminin çok yavaş olması bu artan ilginin başlıca nedenleri olmuştur. Vajene dökülmüş hücreler arasında anormal skuamöz ve glandüler hücre görülmesi ile displastik ve malign durumların birlikteliği ise sitopatoloji biliminin gelişmesine neden olmuştur. Serviks epitelindeki hücresel değişikliklerin uzun süre incelenmesi sonucunda servikal displazinin ve servikal karsinogenezin altında yatan başlıca faktörün HPV olduğunun bulunması sağlamıştır.

2.2.1. Servikovajinal Sitolojisi

Anormal vajinal kanaması olan hastalarda, skuamöz hücreli kanseri temsil eden atipik hücrelerin tanınabileceği, Papanicalou tarafından ilk defa 1928’de yayınlanmıştır (78). Kentucky merkezinde yapılan araştırma gibi lokal popülasyona dayalı çalışmalar, servikovajinal hücrelerin incelenmesinin tarama testi olarak değerini ortaya koymuştur (79). Sonrasında ABD de Papanicalou (paps) smear veya diğer adıyla Paps test servikal

displazi ve kanserin erken tanısında kullanılan prototip teknik olarak geniş kabul görmüştür.

Paps test, basit bir mekanizmaya dayanır. Skuamöz epitelden hücreler devamlı olarak dökülür. Bu nedenle, sitolojik olarak incelenen bu hücreler, yüzeyde bulunan normal veya anormal hücreleri temsil eder. Hafif displazide, dökülen hücreleri koilositik hücreler oluşturur. Displazinin artışı ile daha küçük, atipik hücreler yüzeye ulaşmaya ve dökülmeye baslar. Displazi kötüleştikçe küçük atipik bazaloid hücreler yüzeye erişir ve dökülmeye baslar. Endoservikal hücreler daha bitişik olmaya eğilimlidirler ve genellikle endoservikal kanaldan kümeler halinde dökülürler. Smear sonuçlarının sitolojik ve histolojik sınıflandırmada birden çok sistem kullanılmaktadır. (Tablo 2.1)

Mevcut raporlama sistemleri;

- 1.Papanicolau Sistemi.
- 2.Displazi/CIN Sistemi
- 3.Bethesda Sistemi

Tablo 2.1. Smear Sonuçlarının Sitolojik Ve Histolojik Sınıflandırması

SİTOLOJİK SINIFLAMA		HİSTOLOJİK SINIFLAMA	
PAP	BETHESDA	CİN	WHO
Class I	Normal	Normal	Normal
Class II	ASC-US ASC-H	Atipi	Atipi
Class II	LSIL	CIN 1 Düz Kondilom Dahil	Koilositozis
Class III	HSIL	CIN 2	Orta Derece Displazi
Class III	HSIL	CIN 3	Ciddi Displazi
Class IV	HSIL	CIN 3	Karsinoma In situ
Class V	İnvaziv Karsinom	İnvaziv Karsinom	İnvaziv Karsinom

Bu 3 raporlama sistemi içinde yer alan dereceler birbirleri ile örtüşmektedir. Fakat Bethesda 3 sistemi, diğer raporlama sistemlerinden farklı olarak glandüler hücre anormallikleri ile ilgili bir kategori içerir.

2.2.2. Bethesda Sistemi

Alt genital lezyonlarla HPV'nin ilişkisinin saptanması, araştırmaları, eskiden erken displazi olduğu düşünölen lezyonları yeniden değerlendirmeye ve onları yalnız viral enfeksiyon, koilositik veya kondilomatöz atipi olarak yeniden sınıflandırmaya yönlendirmiştir. HPV'nin yüksek gradeli servikal intraepitelyal neoplazilerle (CİN) ve servikal kanserlerle olan ilişkisi HPV'nin çeşitli servikovajinal anormalliklerle nasıl bir ilişkisi olduğu ve nasıl sınıflandırılmasının daha iyi olabileceği konusunda karışıklık yaratmıştır (80, 81). Sonuç olarak her laboratuvar kendi sınıflandırma sistemini kullanmaya başlamış ve böylece sonuçlarda karışıklık ortaya çıkmıştır. Servikovajinal sitolojide kullanılan çok sayıda terimin iyice karışıklık yaratması üzerine 1988 yılında Bethestada daki Amerikan Milli Sağlık Enstitüsü kampüsünde alıştay yapılarak Paps testleri sonuçlarında standart bir yaklaşım üzerine çalışılmıştır. Daha sonraki yıllarda 1991 ve 2001 yıllarındaki toplantılarda ortak bir raporlama sistemi olan Bethesta Sistemi oluşturulmuştur (82, 83). Terminolojisinin son servikal neoplazi anlayışını yansıtmaması nedeni ile 2001 Bethesda sistemi hala kullanılmaktadır. 2001 Bethesta Sistemi terminolojisi paps test raporlarını intrapitelyal lezyonlar veya malignité veya epitelyal hücre anomalisi, için negatif veya pozitif olarak sınıflandırır. En son sınıflandırma ayrıca, önemi belli olmayan atipik skuamöz ve glandüler hücreler, düşük ve yüksek gradeli Skuamöz İntraepitelyal Lezyonlar (SİL), endoservikal Adenokarsinoma İn Situ (AİS), skuamöz ve glandüler maligniteler alt gruplarına ayrılır. Ek olarak Bethesda sistemi, spesmen kalitesi hakkında değerlendirmeyi içeren yeterli, yetersiz tanımlarını gönderilen slaytın değerlendirilmesinde gerekli kılar.

Yaymanın kalitesi, servikovajinal anomalileri ayırt etme duyarlılığını etkileyebilir. Bethesda Sisteminde, başlangıçta paps testin kalitesini belirlemek için 3 tanım belirlenmişti; Yeterli, sınırlı ve yetersiz. Zaman içerisinde, optimal olmayan terimi yerine inceleme için yeterli fakat sınırlı terimi kullanılmaya başlandı. Bu terim, sınırlı terimine göre klinik olarak daha kullanışlı olmasına rağmen yeterli paps testinin herhangi bir nedenle sınırlı olmasının bile yaymayı gönderenler arasında şüphe uyandırması bu sınıfın bütünüyle kabul edilmemesine neden olmuştur.

Tablo 2.2 řu anda kullanılan Bethesda sistemini Kalsifikasyonu görölmektedir (84).

Tablo 2.2. Servikovajinal Anomaliler İçin Bethesda Sistem Klasifikasyonu (2001)

Örnek Tipi I.Konvansiyonel / II.Likit bazlı ince yayma smear / III.Diğer
Örnek Yeterliliği I.Yeterli. Değerlendirme için tatmin edici; (endoservikal/transformatasyon bölgesine ait ögelerin ve kısmi engel oluşturan kan, inflamasyon vb. diğer nitelik belirteçlerinin varlığını veya yokluğunu tanımlayın) II.Yetersiz. Değerlendirme için tatmin edici olmayan; (açıkça neden belirtin) III.Örnek kabul edilmedi/çalışılmadı (açıkça neden belirtin) IV.Sınırlı. Örnek çalışıldı ve incelendi, fakat epitelyal anomali değerlendirmesi için tatmin edici değil; (açıkça neden belirtin)
Genel Kategorizasyon (isteğe bağlı) I.Intraepitelyal lezyon veya malignite açısından negatif II.Diğer: Yorum/Sonuç bölümüne bakın (örneğin 40 yaş veya üstü kadın hastada endometriyal hücrelerin görülmesi gibi) III.Epitelyal hücre anomali: Yorum/Sonuç bölümüne bakın (uygun bir şekilde 'skuamöz' veya glandüler' olarak açıkça belirtin)
Otomatik Makine ile Yeniden İnceleme Eğer vaka otomatik cihazla incelenmişse, cihazı ve sonucu açıkça belirtin.
İkincil (Yardımcı) Test Test metodlarının kısa bir tarifini verin ve sonucu rapor edin ki klinisyen bunu kolayca anlayabilsin.
TANIMLAYICI YORUMLAR/SONUÇLAR
<u>LİNTRAEPİTELİYAL LEZYON VEYA MALİGNİTE ACISINDAN NEGATİF</u> (Neoplaziye dair hücresel kanıt yoksa bunu yukarıda Genel Kategorizasyon bölümünde ve/veya raporun Yorum/Sonuç bölümünde organizmalar veya diğer neoplastik olmayan bulgular olsun ya da olmasın ifade edin.)
<u>II.ORGANİZMALAR:</u> A.Trichomonas Vaginalis B.Morfolojik olarak Candida spp ile uyumlu fungal organizmalar C.Vajinal florada bakteriyel vajinozis düşündürülen değişim D.Morfolojik olarak Actinomyces spp. ile uyumlu bakteriler E.Herpes simplex virüsü ile uyumlu hücresel değişiklikler
<u>III. DİĞER NEOPLASTİK OLMAYAN BULGULAR:</u> (bildirmek isteğe bağlıdır, liste kapsamlı değildir) A.Reaktif hücresel değişiklikler 1.İnflamasyonla ilişkili/2.Radyasyonla ilişkili/3.İntrauterin kontraseptif araçla ilişkili B.Histerektomi sonrası iyi huylu görünen glandüler hücreler C.Atrofi
<u>IV.DİĞER</u> Endometriyal hücreler (40 yaş veya üstü kadın hastada, eğer 'skuamöz intraepitelyal neoplazi için negatif ise açıkça belirtin)
<u>V. EPİTELİYAL HÜCRE ANOMALİLERİ</u> A.Skuamöz hücre 1.Atipik skuamöz hücreler -ASCUS: Önemi belirlenmemiş (ASCUS) - ASCH: Yüksek gradeli skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL) ekarte edilemeyen 2. LSIL: Düşük gradeli (low grade) skuamöz intraepitelyal lezyon Kapsamındaki HPV sitopatik etkisi/hafif displazi/servikal intraepitelyal neoplazi (CIN1) 3. HSIL: Yüksek gradeli skuamöz intraepitelyal lezyon Kapsamındaki orta ve ağır displazi, CIN2, CIN3 ve CIS İnvazyonu şüphelendiren özelliklerle olması (eğer invazyondan şüpheleniliyorsa) 4.Skuamöz hücreli karsinom B.Glandüler hücre 1. Atipik:- Endoservikal hücreler (başka türlü belirtilmeyen; NOS Not otherwise specified) - Endometriyal hücreler (başka türlü belirtilmeyen; NOS) -Glandüler hücreler (başka türlü belirtilmeyen; NOS) 2. Atipik:-Neoplaziyi destekleyen endoservikal hücreler / -Neoplaziyi destekleyen glandüler hücreler 3. Endoservikal adenokarsinoma in situ 4.Adenokarsinom: -Endoservikal / - Endometriyal / Ekstrauterin / -Başka türlü belirtilmeyen (NOS) C.Diğer Maling Neoplazmlar (açık belirtin)

2.2.3. Servikovajinal Sitolojinin Yorumlanması

Skumöz intraepitelyal lezyon veya malignite için negatif; servikovajinal çevredeki hormonal değişikliklerden, pH'daki kaymalardan, enflamasyondan, vajinal floradaki değişikliklerden, radyasyon ve yabancı cisim gibi dış etkenlerle karşılaşmaktan dolayı ortaya çıkan epitelyal hücre değişiklikleri benign hücrel değişiklikler tanımlaması altında toplanmıştır (85). Belirtilen faktörlerle etkilenen hücreler normal görünmese de, bu faktörler neoplaziden çok benign etkenlerin meydana getirdiği değişiklikleri gösterirler. Bu minimal değişiklikleri göstermeyen nondisplazik epitelyal hücreler normal sınırlar içerisinde değerlendirildi.

Benign Hücrel Değişiklik; patologların normalin dışında benin bir değişiklik olup henüz premalign potansiyel göstermeyen hücreler saptadıklarında kullandıkları ve üzerinde uzlaşma sağladıkları bir tanımlı içerirdi. Bununla birlikte klinisyenler bu kategoriyi tartışmalı hücrelerin normal dışı olarak nitelendirildiğini düşünerek daha karıştırmacı buldular (83). Sonuç olarak en son yapılan Bethesda Sistem çalışmayı (2001), normal sınırlar içinde ve benign hücrel değişiklikler kategorilerini skumöz intraepitelyal lezyon veya malignite için negatif olarak tek kategoride birleştirilmesini önermiştir. Bu sınıflandırma çeşitli organizmaların varlığını gösteren tanımlayıcıları, spesifik olmayan reaktif ve tamirsel değişiklikleri nitelendirebilen bir sınıflandırma şeklini almıştır. Bu sınıflandırma patologlar tarafından gözden geçirilmesi gereken yaymaları ayırt etmek için kullanılır (84, 86).

2.2.4. Anormal Sitolojiler

Aşağıda bizim için önemli olan anormal servikal sitolojilerden bahsedeceğiz.

(Şekil 2.7)



Şekil 2.7. Normal - Anormal Sitolojiler

2.2.4.1. Atipik Skuamöz Hücreler (ASC-US / ASC-H)

Uzun zamandan beri çekirdeklerinde ve sitoplazmalarında değişiklikler gösteren, fakat bu değişikliklerin benign bir nedene mi yoksa displaziye mi bağlı olduğu yapısal olarak tam ayırt edilemeyen bir grubun varlığının dikkat çekmekteydi. Başka bir ifadeyle bu grup hücrelerin biyolojik davranışı genel sitolojik özelliklerinin değerlendirilmesiyle belirlenemez. Bu nedenle önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücreler (ASC-US) kategorisi oluşturuldu (82). Her ne kadar anormal olsalar da, histolojik özellikleri malign tanısı kovabilmek için yeterli değildir. 2001 yılına kadar önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücreler olarak isimlendirilen bu grup hücrelerin önüne reaktif lehine veya neoplazi lehine gibi tanımlayıcı terimler kullanılmaktaydı. Günümüzde ise ASC iki kategoriye ayrılmıştır; önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücreler (ASC-US) ve yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonun ekarte edilemediği atipik hücreler (ASC-H) (84).

Bethesda Sisteminin tanımladığı gibi ASC-US olarak sınıflandırılan hücreler normal ara hücrelerin çekirdeklerinden 2.5-3 kat daha büyük çekirdekleri olan hücrelerdir. Çekirdek büyüklüklerinde ve şekillerinde hafif bir varyasyon ve nukleoplazmalarında hafiften ortaya kadar değişen derecelerde hiperkromazi vardır. Ancak kromatin eşit olarak dağılmıştır. Sitoplazma hafif soluklaşma gösterebilir fakat periferik halo sınırları belirgin değildir. ASC-US genişlemiş koyu boyanan çekirdekli ve irregüler görümlü turuncumsu hücrelerden oluşan atipik ve pleomorfik parakeratozis olgularını da kapsar (83). Bu yapısal değişikliklerin iyi tariflenmesine rağmen farklı patologlar bu tanıyı koymak için kendi kişisel kriterlerini kullandığı için ASC-US tanısı oldukça subjektiftir (87).

Son zamanlarda sitopatologlar, koyu düzensiz çekirdekli, küçük immatür metaplastik hücreler ile karakterize olan, sıklıkla atipik immatür metaplazi veya atipik hücre-yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon açısından şüpheli diye rapor edilen ve altta yatan önemli bir servikal ve vajinal anormallik olma açısından daha büyük potansiyeli olan bir ASC alt grubunun varlığını saptadılar (88, 89). *Bu tip hücreler görülen kadınlarda kolposkopiyle yönlendirilmiş biopsilerde yüksek dereceli CİN ve onkojenik HPV DNA saptanma oranının bu tip hücrelerin görülmediği kadınlara oranla daha yüksek olduğunu göstermiştir (94).* Bunun sonucu olarak Bethesda sisteminin içerisinde ASC-H kategorisi tanımlanmıştır (84).

2.2.4.2. Düşük Dereceli Skuamöz İntraepitelyal Lezyon (LSIL)

Paps testte displazik hücrelerin saptanması bu hücrelerin serviks veya vajinanın yüzeyinde olduğunu gösterir. Displazinin herhangi bir derecesi için sitolojik bulgular arasında ayırt edici olan özellik anormal çekirdek değişimleridir. Çekirdek büyür, çekirdek membranında kıvrılmalar olur, kromatin daha belirgin (kaba) hale gelir. Displazinin histolojik bulgularında olduğu gibi sitolojideki displazinin derecesi/gradei başta hücrenin boyutuna ve daha az olarak displazik hücre sayısına bağlıdır. Eskiden Paps testler arasındaki aralığın lam üzerindeki hücre sayısını etkilediği düşünülürdü. Ancak ALTS(ASCUS-LSIL Triage Study) çalışması bunun doğru olmadığını ispatladı (91). Yüksek dereceli displazi immatür hücrelerin (metaplastik veya parabazal/bazal) transformasyonu ile karakterize iken düşük dereceli displazi matür epitelyal hücrelerin (yüzeyel veya intermediate) transformasyonu ile karakterizedir. *Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon terimi hafif displazi CINI ve HPV nin varlığını gösteren kondilomatöz displazi veya koilositik atipi gibi farklı tanımlayıcıları kapsar.*

LSIL kategorisinin varlığı, bu çeşitli tanımlayıcıların daha şiddetli anomalilerle karşılaştırıldıklarında (yüksek dereceli displazi veya karsinom) aynı ilerleme hızını gösterdiklerini ve patoloğların *hafif displazi ile sade HPV enfeksiyonunun olduğu vakaları ayırt edemediklerini gösterir.* LSIL olarak yorumlanan hücrenin çekirdeği normal ara hücre veya polimorfonükleosit çekirdeğinden en az 3 misli daha büyüktür ve düzensiz çekirdek şekilleri ve kırışık membrana sahiptir. Çekirdek boyutlarındaki değişikliklerle birlikte multinükleasyon da görülür. Çekirdekçik yoktur. LSIL orta veya yüzeyel hücrelerde sınırlıdır. Bu hücrelerin çoğunda çekirdek etrafında saydamlaşma ve sitoplazmanın hücrenin periferinde yoğunlaşması görülür (koilosit). Biopsi spesmenlerinde görüldüğü gibi saydam alanla sitoplazma arasındaki sınır çok belirgindir (83, 92). (Şekil 2.8)

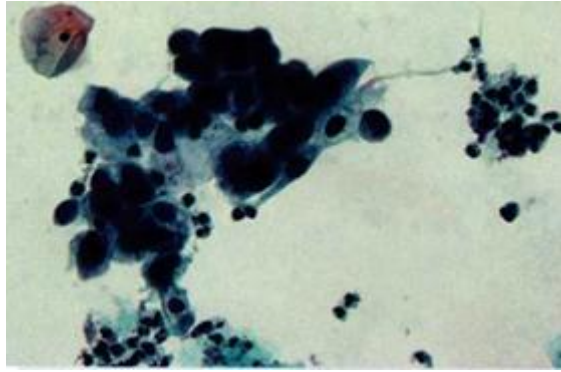


Şekil 2.8. LSIL

2.2.4.3. Yüksek Dereceli Skuamöz İntraepitelyal Lezyon (HSIL)

Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL) *terimi sitolojik olarak orta ve şiddetli displazi, CIN 2 ve 3 ve karsinoma in situ (CIS) kategorilerini içine alır.* Bu kategorileri tek bir başlık HSIL altında toplamanın temel nedeni, displazinin değişik derecelerinin histolojik olarak farklı şekillerde görülmesine rağmen sübjektif bir yöntem olan sitolojik incelemeyle HSIL kategorisi daha alt sınıflara ayrıldığında bu alt sınıflardaki farkın çok da belirgin olmamasından kaynaklanmaktadır.

CIN 2 sitolojik spesmeninde LSIL dekine benzer çekirdek görünümünü içerir. Hücre büyüklüğü immatür meteplastik hücrelerle eşittir. Çekirdek toplam hücre büyüklüğünün yarıya yakınına kaplayabilir. Sitoplazma miktarındaki bu azalmaya bağlı olarak çekirdek/sitoplazma oranı azalmıştır. LSIL dekine benzer displastik görünüm vardır, ancak çekirdek daha küçüktür. Hücrelerin daha küçük olması ve hücre sitoplazmasına oranla daha büyük çekirdek alanı olması nedeniyle çekirdek/sitoplazma oranı artmıştır. Hücreler ya izole bir haldedir ya da karakteristik olarak çizgisel bir şekilde dizilmişlerdir. Sitolojik olarak CIS ile uyumlu olan hücreler çok az sitoplazmalı hücreler şerit çekirdekler veya çoğunluğunu çekirdeklerin oluşturduğu büyük sinsityal hücre toplulukları şeklinde görülen hücrelerdir (83, 92). (Şekil 2.9)



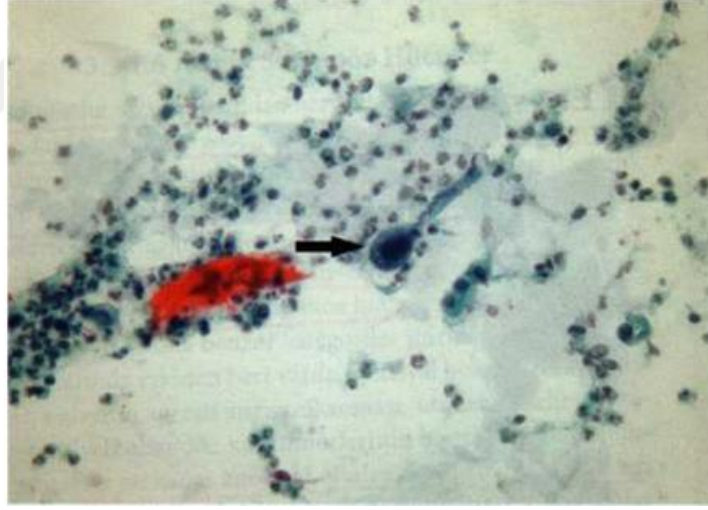
Şekil 2.9. HSIL

2.2.4.4. İnvaziv Skuamöz Hücreli Karsinom

İnvaziv skuamöz hücreli karsinom, *bazal membranın devamlılığının ortadan kalktığı ve alttaki stromaya doğru invazyon olduğu anlamına gelir.* Bunun olabilmesi için skuamöz hücrelerin hızlı çoğalmalarının damarlanmalarından daha hızlı olması gerekir. Bu hızlı büyüme nekroz veya tümör diatezine neden olur, invaziv karsinomdan alınan bir spesmenin zemini sıklıkla “kirli” olarak tanımlanır. Enflamasyon, kanama ve dejenere olmuş sitoplazma ve çekirdek parçacıkları görülür. Dejenere olmuş elementler

pamuk şekeri görünümünde diye tarif edilirler. 3-5 mm arasında invazyonu olan skuamöz hücreli karsinomlar tümör diatezinin sitolojik bulgularını gösterirler (93).

Malign hücrelerin tek tek görülmesi stromayı invaze etme veya metastaz yeteneği olduğunu gösterir. Bu özellikle CİN zemininde gelişen mikroinvaziv skuamöz hücreli karsinom için doğrudur. Spesifik olarak bu hücreler CIS dakine benzer bir şekilde sinsityal tarzda kümeleşmiştir CİS'in tersine çekirdekçik görülür; dev çekirdekçikler sık olmasa da görülebilirler. Hücreler sinsityal kümeler halinde dağılım gösterip belirsizleşebilir. Çekirdeğin kapladığı alan normal hücrenin 2 mislidir. Keratinizasyon gösteren skuamöz hücreli karsinomda turuncumsu sitoplazma görülür. Çekirdekler koyu renklidir ve yoğun kromatin içerir; çekirdekçikler görülmez. Küçük hücreli karsinomlar neredeyse bütünü kaba granuler kromatin içeren çekirdeğin oluşturduğu küçük yuvarlak hücrelerden oluşurlar. Sitolojik inceleme verrüköz histolojisi olanlarda olduğu gibi çok iyi diferansiye skuamöz hücreli karsinomun ayırt edilmesinde yararlı olmayabilir (92). (Şekil 2.10)



Şekil 2.10. Skuamöz Hücreli Karsinom

2.2.4.5. Atipik Glandüler Hücreler/Adenokarsinoma In Situ (AGC/AIS)

Atipik Glandüler Hücreler (AGC) kategorisi Bethesda Sistemin kullanılmaya başlamasından önce tanımlanmayan sitolojik değişiklikleri içine alan bir kategoridir. *ASC gibi AGC de kolaylıkla benign, premalign veya malign olarak tanımlanamayacak morfolojik varyasyonlar içeren glandüler hücrelerden oluşturur (83, 85).* Yeni Bethesda Sistem revizyonunda eğer olanak varsa atipik glandüler hücrelerin endoservikal veya endometriyal kaynaklı olduğunun belirtilmesi gerekmektedir (94). Görünüm glandüler

displazi lehineyse bunun not edilmesi gerekir. ASC de olduğu gibi bu tanı oldukça sübjektiftir (95). Skuamöz atipi ve intraepitelyal neoplazilere benzer şekilde gelecekte geliştirilecek sensitif ve spesifik markırların kullanımı bu ayırımında yararlı olabilecektir (96).

Normal hücrelerde görülen hücre sınırları ve hücre elemanlarının yerleşimi kaybolmuştur. Çekirdekler büyümüştür ve büyüklük ve şekil açısından farklılıklar vardır. Kromatin yoğunluğu artmıştır, çekirdekçikler genellikle görülmez ve mitozlar olabilir. Nükleer büyümeye bağlı olarak çekirdek sitoplazma oranı artmıştır. Reaktif endoservikal hücrelerde de aynı şekilde çekirdekte belirgin büyüme görülebilir (90). Eskiden, AIS sitolojik tanısı AGUS'un geniş kategorisi içine dahil edilirdi. Son zamanlarda AIS'e spesifik sitolojik özelliklerin tanımlanmasından sonra (periferal palisidasyon gösteren çekirdek rozetleri) bu tanı AGC den ayrı olarak rapor edilmeye başlandı. Atipik endometrial hücreler genellikle 5-10 hücreden oluşmuş kümeler halinde görülürler. Çekirdekler biraz büyümüş ve çekirdek/sitoplazma oranı artmıştır. Çekirdekçik genellikle vardır (85).

2.2.4.6. İnvaziv Adenokarsinom

İnvaziv adenokarsinomun sitolojik bulguları AIS'ye benzer. Ancak çekirdekçikler daha belirgindir ve çekirdekte kromatin düzensiz yoğunluktadır. Çekirdek boyutlarında belirgin bir farklılık olabilir ve tümör diatezi görülebilir. Berrak hücreli veya seröz tip gibi farklılaşmış özel histolojik sınıflandırmaları olan endoservikal adenokanserler kötü diferansiye karsinom gibi görünebilirler. Ancak *bunların tipik özellikleri olmayan malign hücreleri olan iyi diferansiye adenokanserdir.* Endometriyal adenokarsinomlarda malign hücreler küçük kümeler halindedir. Göreceli olarak küçük olmasına karşın çekirdek büyüklüğü açısından farklılıklar vardır ve çekirdekçikler belirgindir. Temiz bir zemin üzerinde kötü diferansiye karsinom hücreleri servikse metastaz yapmış adenokarsinomlarda görülür (97).

2.3. ANORMAL SİTOLOJİNİN YÖNETİMİ

1994 yılında servikal sitoloji tarama testi ve anormal PAPS testine yaklaşım konusunda deneyimli bir grup uzman tarafından bu konuyla ilgili literatürler ve diğer uzman görüşleri değerlendirilerek anormal servikal sitolojiye yaklaşım kriterlerinin belirlendiği bir rehber çıkartılmıştır (98). Bunu takiben 1997 ile 2000 yılları arasında Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patoloji Topluluğu (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, ASCCP) tarafından anormal servikal smear ve yetersiz materyal sonuçlarına, klinik yaklaşım açısından birkaç komite kararı yayınlanmıştır (99, 100). 2012 Eylül ayında 23 profesyonel cemiyeti temsil eden ve 47 uzmandan oluşan bir grup ASCCP'nin 2006 yılı Anormal Servikal Kanser Tarama Testleri Kılavuzunu revize etti ve 2013 te ASCCP klavuz olarak yayınladı. 2014 yılında NCCN tarafından genel olarak tekrar revize edildi.

2001 yılında ASCCP tarafından düzenlenen konferans sonrası, uzmanlar tarafından kanıta dayalı, literatür bilgileri baz alınarak, servikal kansere karşı kadınları korumayı amaçlayan anormal servikal smeare yaklaşım rehberi oluşturuldu (101). 2006 yılında yapılan ASCCP'in düzenlediği 2. konferansta 2001 ile 2006 yılları arasında yayınlanan raporlar doğrultusunda 2001 yılında oluşturulan rehber güncellendi (102). 2005 yılında ise Amerikan Obstetri ve Jinekoloji Derneği (American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG) ASCCP'nin 2001'de yayınladığı rehberine benzer bir kılavuz yayınladı. 2008 yılında ise 2005'te yayınladıkları rehberi, ASCCP'nin 2006'da yaptığı reviziyona benzer bir şekilde güncelledi (103). 2001 yılında yapılan Bethesda Workshop'unda, 1988 ve 1991'de yapılan TBS (The Bethesda System) 'lerde yeterli servikal örnekleme yapılması hakkındaki rehber güncellendi. Bu güncellemeyi. ASCCP'den bir komite ve 2001 TBS'den bir alt komite beraber çalışarak gerçekleştirdi (104, 105).

2.3.1. Yetersiz Sitoloji Yönetimi

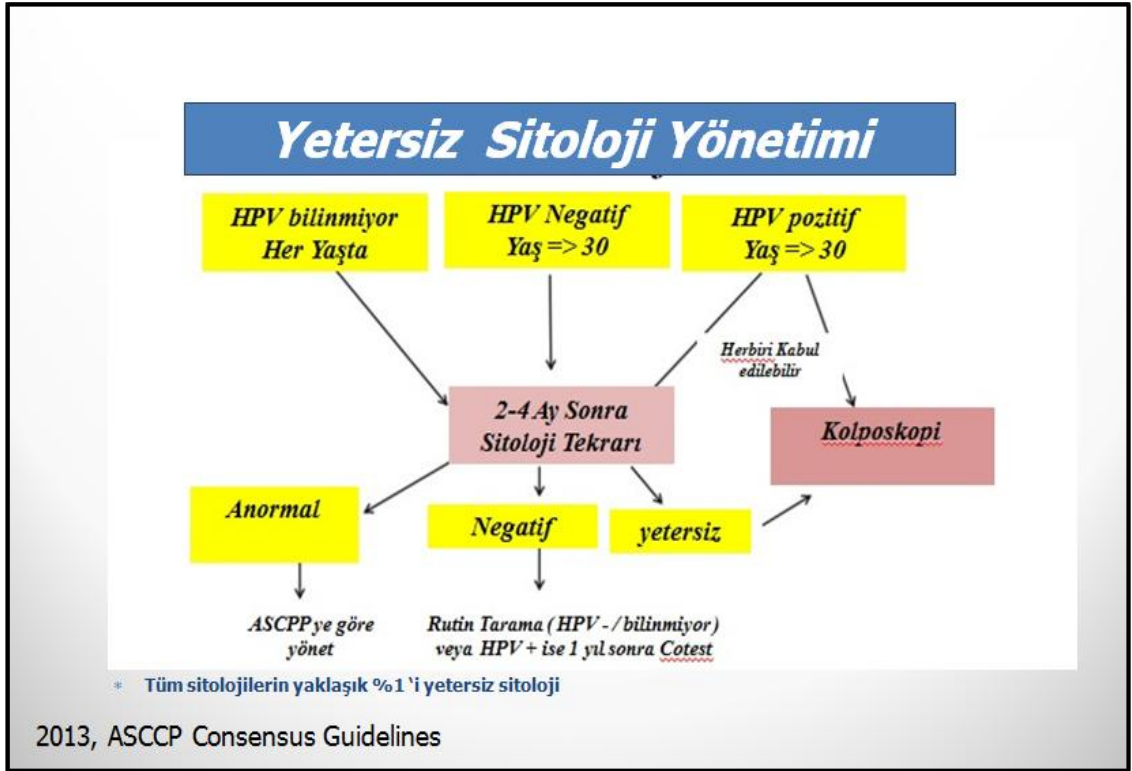
2002 yılında ASCCP'nin yayınladığı yeterli servikal örnekleme kılavuzunda, Paps testi için yetersiz servikal örnek veya Paps testinin kalitesini belirleyen endoservikal kanal/transformasyon zonu (EC/TZ) komponentlerinin olmadığı ve/veya birtakım belirsiz faktörlerin bulunduğu durumlarda kadınların takibi açısından önerilerde bulunulmuştur (105). 2008 yılında ise 2002 yılından itibaren servikal kanser taramasında gerçekleşen yenilikler ve gelişmeler doğrultusunda bu yeterlilik rehberi

güncellenmiştir (106). Ayrıca 30 yaş ve üstü kadınlarda servikal sitoloji tarama testleri ile birlikte, Human Papilloma Virüsünün yüksek onkojenik riske sahip olanlarının DNA'sını saptayan test co-test olarak kullanılma oranı gittikçe artmaktadır. Her iki gelişme ASCCP'nin yeterli servikal örnekleme rehberinde güncellenmelere neden olmuştur. Smear testinin yeterlilik açısından değerlendirilmesi, hiç anormal hücre gözlenemezse söz konusu olabilir. Eğer örnekte bir tane anormal hücre bile varsa bu örnek smear değerlendirebilmek için yeterlidir.

Sitolojinin yetersiz olarak rapor edildiği durumlar; (1) smear örneklerinin laboratuvar tarafından reddedildiği zamanlar (isimlendirme hataları, örnekte kontaminasyon olması, lamın kırık olması... gibi) ve (2) örneklerdeki skuamöz hücre oranının yetersiz olması veya örneklerin kanla karışık olması, (>%75) inflamasyon varlığının bulunması olarak belirlenmiştir (106, 107). Sıvı bazlı servikal örneklerde (LBC-Liquid Based Cytology) skuamöz hücre miktarının az olması örneğin yetersiz olarak rapor edilmesinin en sık nedenidir. 2001 yılında Bethesda da Paps testlerinin optimum değerlendirmenin yapılabilmesi için yeterlilik kriterleri, hasta popülasyonu ve laboratuvar koşulları göz önünde bulundurularak, skuamöz hücre sayısında alt limit belirlenerek oluşturulmuştur (104, 106, 107). Alan hesabına göre hücre sayımı yapıp hücrelerin sayısının yeterliliği değerlendirilirken hücre kümeleri, sitolize uğramış hücreler veya atrofi bulguları varlığında değerlendirme zorlaşır. Bu durumlarda laboratuvarların deneyimlerine dayanarak bir yargıda bulunmaları tavsiye edilmiştir (107). Pelvik malignensi öyküsü, pelvik radyasyon öyküsü, konizasyon, histerektomi, gebelik, 3 aylık lohusalık, vajinal kanama, anormal vajinal akıntı varlığı, rahim içi araç varlığı ve servikal polip varlığı gibi durumlarda Paps testi raporu yetersiz materyal olarak geldiğinde klinik bulgular önem kazanır (108, 109).

Yetersiz Paps testi sonucu çıkan kadınlarda Paps testi 2 ile 4 ay içinde tekrarlanmalı ve klinik korelasyon gösteren bulguları varsa ek olarak kolposkopi ve/veya diğer histolojik incelemeler klinik değerlendirmeye beraber yapılmalıdır. Bir süredir Paps testini kısa zaman aralıklarıyla tekrarlanmasının (<3 ay), testin kalitesinde ve sensitivitesinde azalmaya neden olduğu düşünülmekteydi. Yapılan çalışmalar Paps testi kalitesi ve güvenilirliği üzerinde özellikle sıvı bazlı sitolojik tekrar yapıldığında hiçbir yan etkisi olmadığı anlaşılmış ve sıvı bazlı örneğin kalan kısmı kullanıldığında dahi HPV viral yükünün test edilmesinde olumsuz bir sonuç yaratmadığı sonucuna varılmıştır (110).

2013, ASCCP Consensus Guideline yetersiz sitoloji yönetimi aşağıdaki gibi şematize etmiştir. (Şekil 2.11)



Şekil 2.11. Yetersiz Sitoloji Yönetimi

2.3.2. Paps Smearinde EC/TZ Komponenti Görülmeyen Kadınlara Yaklaşım

Tek Tarama Testi Paps Smear Olduğu Zaman; Paps smear testinde endoservikal kanal/transformasyon zonu hücrelerinin bulunmaması servikal kanal içindeki veya portio bölümündeki servikal intraepitelyal neoplazi (CİN) veya adenokarsinoma insitunun (AİS) atlanabileceği endişesi yaratır. Paps smearlerde EC/TZ komponentinin bulunup bulunmamasının tarama testinin güvenilirliği için önemi araştırılan birbiriyle çelişkili birçok çalışma yapılmıştır (106). Endoservikal hücreler alınan örnekte varsa Paps smearde anormal hücre görülme ihtimalinin arttığı iddia edilmiştir (111, 112). Buna rağmen Paps smearinde EC/TZ komponenti görülmeyen kadınların ileriki takiplerinde CİN saptanma oranında da artış görülmemiştir (112, 113).

Servikal örnekleme teknikleri ve araçlarının gelişmesi ve EC/TZ hücrelerinin daha kolay toplanmasına rağmen (99, 111, 114, 115), bu hücreleri her zaman elde etmek mümkün olmamaktadır. Oral kontraseptif kullanan kadınlarda, gebelerde veya

postmenapozal kadınlarda EC/TZ komponenti bulunmayabilir (114, 116, 117). Adenokarsinomların Paps testte tespit edilebilmesi için yeterli örnek alınması gerekir. Bunun içinde EC/TZ komponentinin alınan örneklerde bulunması gerekmektedir. EC/TZ komponentinin önemi adenokarsinom tanısında artar. Son birkaç onyılıda endoservikal adenokarsinom servikal kanserler içinde insidansı en fazla artan tip haline gelmiştir (106). Bu nedenle 2008 yılında çıkartılan servikal örnekleme yeterliliği rehberinde; Paps testinde EC/TZ komponenti eksik olan kadınlara da sitolojik incelemenin sık tekrarının uygun olduğu belirtilmiştir.

Artık günümüzde tek tarama testi paps smear değildir. Ko-test olarak HPV rutin kullanıma girmeye başlamış olup yeni klavuzlarda yerini çoktan almaya başlamıştır. Paps smearinde EC/TZ komponenti görülmeyen kadınlarda HPV testi tek başına sitoloji yönetimini belirlemektedir.

2.3.3. Sitoloji Negatif / HPV Pozitif Olgu Yönetimi

American Cancer Society (ACS)'nin 2002 yılında, ACOG'un da 2003 yılında yayınladıkları primer servikal kanser tarama rehberine göre 30 yaş üstü kadınlarda Paps testi ile HPV testi birlikte kullanılarak servikal kansere karşı taranmasını bir seçenek olarak sunmuşlardır (118). Bir kadının her iki testi de negatif ise en az 3 yıl servikal kanser geliştirme riskinin düşük olduğu söylenebilir.

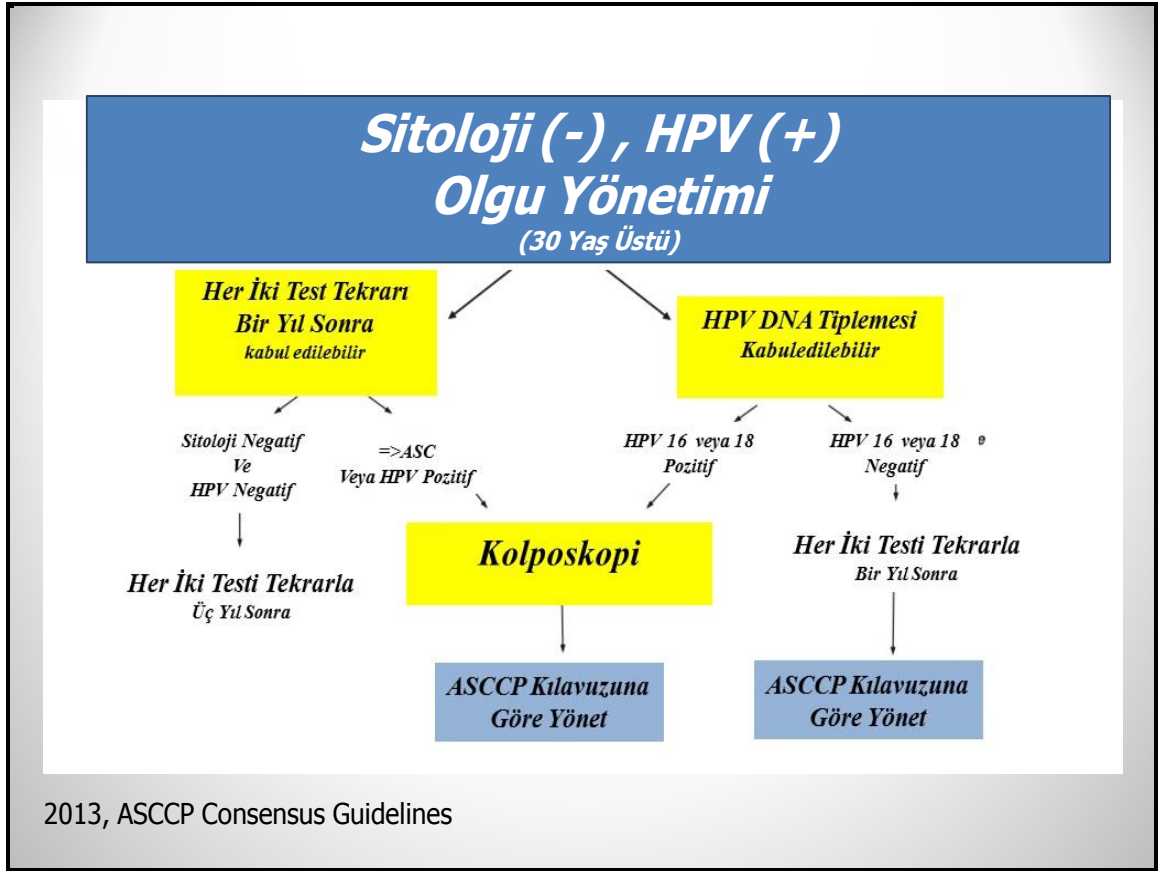
Servikal sitoloji ve HPV DNA testini içeren birçok servikal tarama yöntemlerine yönelik çalışmalar yapılmış olmasına rağmen negatif Paps testi olup yüksek riskli HPV pozitif (cyto-/HPV+) kadınların takibine yönelik net yaklaşımlar son zamanlarda belirginleşmiştir. Persiste eden hrHPV enfeksiyonunun CİN 3 gelişimi ve bunun servikal kansere ilerleme riskini arttırdığı Meijer ve arkadaşları (119) tarafından gösterilmiş ve herkesce kabul gören genel bir olgu halini almıştır. 2003 yılında ASCCP, ACOG, NCI, ACS ve CDC'nin üyelerinden oluşan bir grup çalıştay düzenleyerek servikal kanser taramasında HPV testinin servikal sitolojiyle beraber kullanılmasına yönelik geçici bir rehber oluşturmuşlardır (120). 2013 Eylül ayında ASCCP'nin 2006 yılı Anormal Servikal Kanser Tarama Testleri Kılavuzunu revize etti ve bu yaklaşım kılavuza girdi.

2003 yılında servikal kansere progresyonun tek belirteci hrHPV pozitifliği olarak biliniyordu. Ancak günümüzde 30 yaş ve üzeri kadınlardaki HPV geçici bir dönem pozitif olarak saptanabilirliğinin daha sonraki takiplerde negatifleştiği açığa

çıkartılmıştır. Geçici Rehber Çalıştay'ında (Interim Guidance Workshop) sitoloji negatif/HPV DNA pozitif kadınlarda Paps testi raporu değerlendirme açısından yeterli materyal sonucu geldiğinde ilk yapılması önerilen işlem kolposkopi değildir. HPV testi ve servikal sitoloji 6 ile 12 ay aralığında tekrar edilmelidir. Kolposkopi ise sitolojisi anormal çıkan kadınlarda ve/veya yüksek riskli HPV DNA'sı tekrarlayan testlerde pozitif olan, servikal sitoloji sonucundan bağımsız olarak yapılmalıdır. Kolposkopi muayenesinde CIN2,3 veya daha ileri evre lezyona sahip olmayan kadınlar 12 aylık sitoloji veya hrHPV testi tekrarı ile takip edilebilir. Takipler sırasında tekrarlayan hrHPV pozitifliği veya anormal Paps testi varlığı bulunan kadınlarda kolposkopi tekrarlanmalı ve kolposkopi yapılırken aynı zamanda vulva ve vajen de dikkatlice incelenmelidir (120). 2006 yılında ASCCP'nin düzenlediği konferansta 2003 yılında geçici rehberdeki bahsedilen sitolojisi negatif, hrHPV pozitif olan kadına yaklaşım yöntemleri tekrardan düzenlenmiştir. 2003 geçici rehberindeki bilgilere sadece sitolojisi negatif hrHPV'si pozitif olan hastaların Paps tekrarını 6-12 ay aralıklarla yapmak yerine 12 ayda bir yapılmasının yeterli olacağı kararı eklenmiştir. Bu karar CİN 2,3+ tanısının atlanma ihtimali düşük olduğu için ve düşük riskli kadınlarda gereksiz yere kolposkopiden kaçınmak amacıyla alınmıştır. *HPV enfeksiyonu geçici bir durumdur. 12 aylık bekleme döneminde sitoloji negatif/HPV DNA pozitif hastaların büyük bir kısmında HPV negatifleşir. Bu bilgiye rağmen takip hakkında alınan öneri değişmemektedir ve hrHPV pozitifliği persiste eden hastalara kolposkopi yapılmalı, her iki testi de negatif olan kadınlarda ise 3 yılda bir tarama yapılmasının yeterli olduğu belirtilmektedir* (102). 2008'de ACOG'un yayınladığı rehberde de aynı yaklaşım yer almaktadır (103). Fakat bu yaklaşım 2013 ASCCP kalvuzunda şekildeki gibi değişikliğe uğramıştır.

Servikal kanserlerin %70'inden HPV tip 16 ve 18 sorumludur. Bu nedenle sitoloji negatif/HPV DNA pozitif kadınlarda tip tayini yapıp sonucuna göre kolposkopiye yönlendirmek akıllıcadır. Uzun süreli takip sonucu HPV 16/18 pozitif olanlarında CIN3+ saptanma oranının daha yüksek olduğu görülmüştür. 30 yaş ve üzeri kadınlarda 10 yıllık süreçte CIN3+ lezyonların saptanma riski kümülatif olarak HPV 16-pozitif olanlarda %20.7, HPV 18-pozitif olanlarda %17.7'dir. Onkogenik HPV tiplerinde HPV 16 ve 18'in tayin edilmesi CIN3+ lezyonlarının erken tanısı bakımından önemlidir. Ayrıca diğer hrHPV pozitif kadınlarda gereksiz agresif tedavi ve tetkikten kaçınmayı da sağlamaktadır (141). 2006 ASCCP rehberindeki refleks HPV 16/18 tirajı

kriterlerini karşılamaması üzerine ASCCP genotiplendirmeye ilgili bir güncelleme yayınladı. Bu güncellemede 30 yaş ve üzeri sitoloji negatif/HPV DNA pozitif olan kadınlarda ve hrHPV testi ile yüksek risk grubu HPV DNA pozitif saptanması veya genotipleme ile HPV 16 veya HPV 18 pozitif olarak saptanması derhal kolposkopiye yönlendirilecek (HPV16 ve/veya HPV 18 pozitif) veya 12 ay sonra sitoloji ve hrHPV testinin tekrarlanması yeterli olacağı (HPV 16 ve 18 bakımından negatif) kadınları belirlemekte faydalıdır. Ve bu yaklaşım 2013 ASCCP kılavuzunda çok değişikliğe uğramadı. (Şekil 2.12)



Şekil 2.12. 30 Yaş ve Üzeri Hr-HPV(+)/Cyto(-) Olgu Yönetimi

Sitoloji negatif/HPV DNA pozitif ve CİN 3 pozitif kadınlarda en sık HPV tip 16 (% 48,9), ikinci olarak tip 31 (% 9,2) ve üçüncü olarak tip 18 (% 8,5) saptanmıştır. Paps testi normal olup CIN 3 lezyonu geliştiren kadınlarda HPV tip 18 daha ön planda olduğu dikkate değerdir. Bu nedenle sayısal olarak aksi gözükse de sitoloji negatif/HPV DNA pozitif hastalarda bu iki tipin belirlenmesi önemlidir. Aynı zamanda HPV 16 ile bağlantılı olan HPV 31 ve HPV 18 ile bağlantılı olan HPV 45'in de taranması da yoğun tartışma konusudur.

2.3.4. Anormal Servikal Tarama Testi Olan Kadınlara Yaklaşım

2001 yılından itibaren ALTS(ASCUS-LSIL Triage Study) ve diğer çalışmalar ile 2001 Bethesda Çalıştayı'ndaki yeni sitolojik terminolojinin oluşturulmasıyla kanıta dayalı anormal servikal smearlara yaklaşım rehberim oluşturuldu (104, 122, 123). 2001 ASCCP servikal örnek yeterlilik rehberi modifiye edildi. Bunu takip eden yıllarda oluşturulan rehberler 2006 yılındaki konferansta (102) alınan kararlar ve 2008'deki ACOG un yayınladığı takip rehberi yılındaki konferansta (103). *2012 Eylül ayında 23 profesyonel cemiyeti temsil eden ve 47 uzmandan oluşan bir grup ASCCP'nin 2006 yılı Anormal Servikal Kanser Tarama Testleri Kılavuzunu gözden geçirdi ve 2013'te ASCCP klavuzu olarak yayınladı.* 2014 yılında NCCN tarafından genel olarak tekrar gözden geçirildi.

Yeni klavuzdaki bazı önemli değişiklikler;

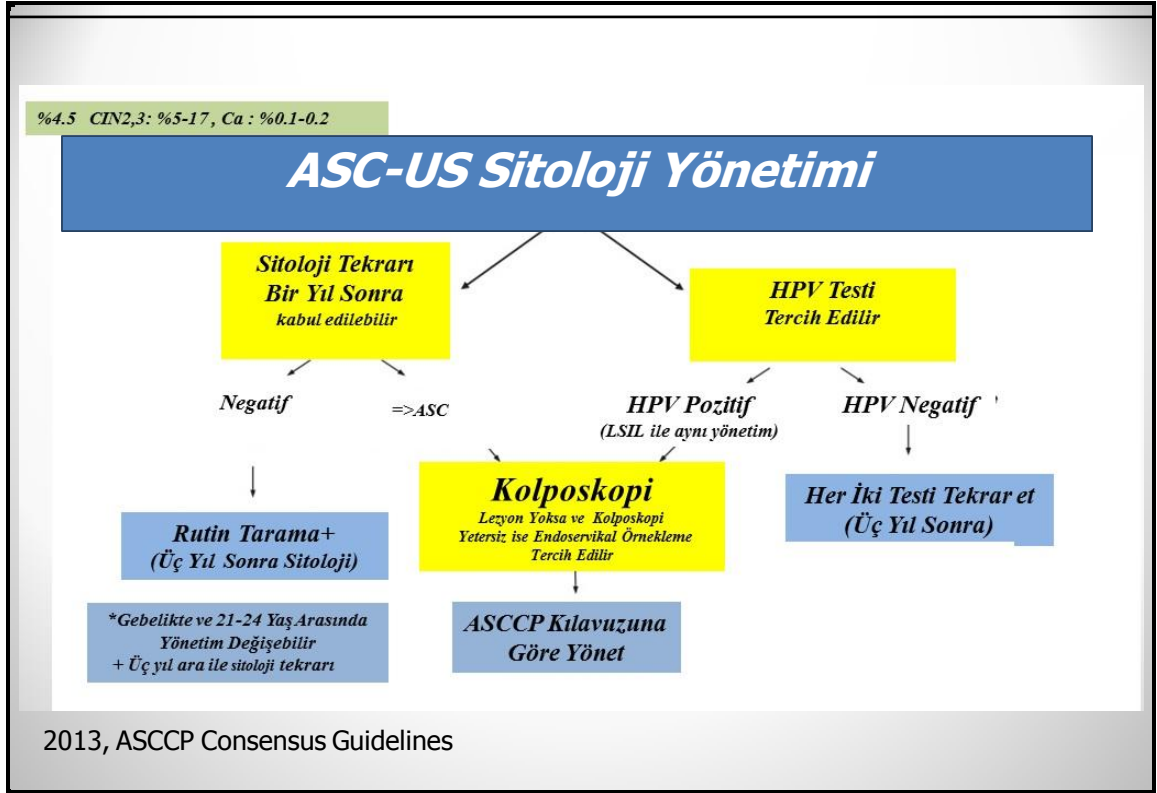
- *Sitoloji negatif fakat endoservikal hücre yok erken tekrar gerektirmez.*
- *ECC'de CIN1 varlığı normal CIN1 gibi değerlendirilmelidir.*
- *HPV negatif bile olsa sitoloji yetersiz değerlendirilmişse sitoloji tekrarı gerekir.*
- *HPV 16 ve/veya 18 pozitifliğinde sitoloji negatif olsa dahi kolposkopi önerilir.*
- *ASC-US için direkt koloskopi endikasyonu değildir. Rutin tarama ve cotesting aralıkları açılmıştır.*
- *ASC-US HPV negatif ise cotesting ile 5 yılda bir değil 3 yılda bir izlenmelidir.*
- *21-24 Yaş kadınların yönetimi ayrı değerlendirilmelidir.*

2.3.4.1. ASC-US Yönetimi

2001 Bethesda Workshop'ında atipik skuamöz hücreler (ASC), ASC-US ve yüksek gradeli skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL) dışlanamayan (ASC-H), iki kategoriye ayrıldı (104). ASC-US saptanmasının median ortalaması US laboratuvarlarında yaklaşık % 4,3'tür. ASC-H'lerde CIN2,3 gelişme riski ve hrHPV saptanma olasılığı ASC-US bulgusuna göre daha fazladır. Bu nedenle bu iki alt kategoriye klinik yaklaşım farklı olmalıdır. ASC-US'lu kadınlarda CIN2+ görülme olasılığı % 5 ile % 12 arasındayken (124, 125, 126), ASC-H'li kadınlarda HPV saptanma olasılığı % 74 ile % 86 ve CIN2,3 saptanma riski % 26 ile % 68 arasında değişmektedir (124, 127, 128, 129, 130).

Doğrudan kolposkopik muayene, sitolojinin tekrarlanması ve HPV testinin üçü de ayrı ayrı ASC-US'a yaklaşım da kullanılabilecek yöntemlerdir. 2001, 2006 ve 2008

yıllarına ait kanıta dayalı literatür bazlı çalışmalara göre her üç yöntemde ASC-US yönetiminin de güvenli ve efektif olduğu gösterilmiştir (101, 103). (Şekil 2.13)



Şekil 2.13. ASC-US Sitoloji yönetimi

ASC-US 'a doğrudan kolposkopik yaklaşım ASC-US'lu kadınları doğrudan kolposkopik incelemeye yönlendirmenin teorik olarak CIN2,3 ve kanser tanılarının hepsinin saptanmasını sağladığına inananların aksine son zamanlarda yapılan çalışmalar bunun aksini göstermektedir (131, 132). Ek olarak ASC-US'lu kadınlarda CIN2,3 görülme oranı düşük (%5 ile %12 arasında) olduğu için bu yaklaşımın pozitif prediktif değeri de düşüktür (124, 125, 126, 133, 134). Doğrudan yapılan kolposkopi muayenelerinde saptanan CIN2,3 olguları genelde ASC-US/ hrHPV+ hastalardır (125). Kolposkopinin bu negatif yanlarına rağmen, birçok klinikte hala ASC-US'lu kadınlara ilk yaklaşımda kullanılmaktadır.

Servikal sitoloji takibi iyi bir tarama testi olsa da diğerleriyle karşılaştırıldığında düşük sensitiviteye (%51 ile %83) ve zayıf tekrarlanabilirlik özelliğine sahip olmasıyla değerli bir triaj testi değildir (125, 135, 136, 137). ASC-US sonucu gelen hastalarda sitoloji tekrarı yapıldığında sonuç ASC-US ve üzeri gelirse hastalar kolposkopiye yönlendirilmelidir (102, 103). Bu değerlendirmeyi kolposkopik muayene için eşik değer

olarak kabul edersek, CIN2,3 vakalarının %95'ine tanı konabilir; fakat bunun için 12 aylık bir bekleme sürecine ihtiyaç vardır. Bu nedenle tanı ihtimali eş değer olan doğrudan HPV testi yapılması tercih edilebilir.

Kolposkopik incelemenin gereksinimini azaltmak için, ya gereksiz yere hasta takibi yapılması engellenmeli ve takipten bazıları çıkartılmalı veya kolposkopik inceleme eşik değeri LSIL ve üzeri olarak arttırılmalıdır. Bu değer olarak en az LSIL bile gelse CIN2,3 lezyonların ancak %74'ü saptanabilir, eğer 3 defa tekrar edilirse Paps ile CIN2,3 lezyonlarının yaklaşık %82 si saptanabilir (125). 25 yaş ve altındaki ASC-US'lu olgularda HPV pozitifliği yüksek olduğu için sitolojinin tekrar edilmesi tercih edilebilir.

HPV Testi ile ASC-US'a Yaklaşım ASCCP ve ACOG tarafından HPV testi ile ASC-US yönetimi rehberinde bahsedildiği gibi sitoloji slaytı hazırlandıktan sonra LBC'de kalan rezidüel hücrelerin kullanılması veya servikal ek örnek alınması ile yapılabilir (102, 103). Hastaların takibi sırasında hastaneye başvuru sayılarını ve Paps testi tekrarlarını önler, böylece zaman israfı ve masraftan kaçınılmış olur. CIN3 ve üzeri lezyonların tanısında HPV testi kolposkopiye göre daha düşük maliyete sahiptir (130, 138). HPV-negatif ASC-US olgularında az da olsa CIN2,3 lezyonlarını atlama riski devam etmektedir. Bundan dolayı ASC-US'lu Paps sonucuna sahip kadınlarda HPV-negatif ise 12 ay sonra Paps tekrarı yeterlidir. Eğer HPV-pozitif ise bu kadınlar belirgin olarak risk altındadırlar ve doğrudan kolposkopik incelemeye yönlendirilmelidirler (102, 103).

Adolesanlarda ASC-US'a Yaklaşım: Adolesan dönemi 21 yaşının altındaki kadınlar ve kızları kapsayacak şekilde tanımlanır. 2009 yılında ACOG'a göre servikal kanser taraması ilk cinsel ilişki yaşı kaç olursa olsun 21 yaşından önce başlamamalıdır (139). Servikal neoplastik değişikliklerin bu popülasyonda yönetimi yetişkinlere göre farklıdır. Çünkü HPV ile ilişkili hastalığın bulguları ve seyri yetişkin topluluktan daha farklı seyretmektedir (140).

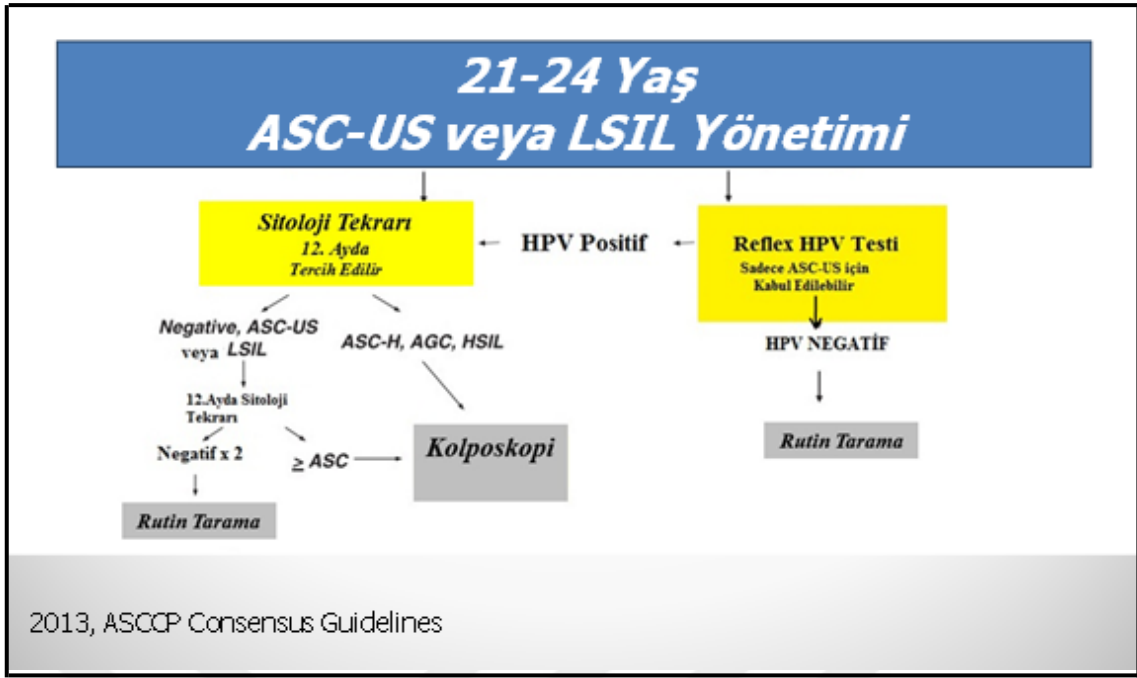
Rehberlerdeki temel iki öneri; (1) HPV testi adolesan tarama ve hastalık yönetiminde herhangi bir koşulda kullanılması önerilmez, (2) ASC-US ve LSIL 12 ay sonra sitoloji tekrarı ile takip edilir. Direk kolposkopik inceleme veya HPV DNA testi yapılmaz, (3) CIN1, CIN2 ve CIN2,3 tanısı almış hastalar invaziv terapi yerine spontan takip edilebilir, CIN3 ise tedavi edilmelidir (102, 103, 140, 141). Adolesan

populasyonunda bu önerilerin temel nedeni HPV nin sık görülmesidir ve sıkça ilk cinsel ilişkiden kısa süre sonra ortaya çıkmasıdır (142, 143). Adölesanlarda ard arda birbirini takip eden HPV enfeksiyonları görülür bunlar kısa sürede temizlendikleri için sadece HPV DNA pozitifliğine neden olurlar (102, 144, 145).

ALTS çalışmasına göre 18-22 yaş aralığındaki ASC-US'lu genç kadınların %71'inde hrHPV pozitifdir (146). Bu yüksek oran diğer çalışmalarda da bahsedilmektedir. HPV enfeksiyonlarının %90'dan fazlası, düşük-gradeli sitolojiler ve CİN 1 lezyonları adölesanlarda 3 yıl içinde kaybolduğuna dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (147, 148). Bu durum CIN2 için de geçerlidir, 1 yıl içinde %38'i 2 yıl içinde ise %63 ile %71'i regrese olmaktadır.

21-29 yaş arası 3 yıl arayla yalnızca smear ile tarama HPV testinin tek başına veya sitoloji ile beraber kullanılması önerilmemektedir. Bunun nedenleri ise bu taramanın kanser insidansı azaltmıyor ve kolposkopi sayısı artıyor olmasıdır. 30 yaş altı kadınlarda HPV prevalansı yüksek oranda (1 yıl içinde %70, 2 yıl içinde %90 spontan regresyona uğrar).

Adölesanlara anormal sitoloji varlığında konservatif yaklaşılsa servikal kanser riskinde artış görülebileceğine yönelik endişeler bulunmaktadır. Adölesan yaş grubunda CIN3'ten kansere progresyon çok nadir görülmüştür. CIN2,3'ten kansere progrese olan yayınlanmış bilinen hiçbir olgu da yoktur (140). *21 yaş altındaki kadınların servikal kansere karşı taraması kanser gelişme riskinde azalmaya neden olacağına dair hiçbir bilgi bulunmamaktadır (149).* Dolayısıyla adölesanlarda servikal kanser taraması yapmamak daha uygundur. Adölesan toplulukta ASC-US ve LSIL yönetimi benzer şekilde yapılır. (Şekil 2.14)



Şekil 2.14. 21-24 yaş ASC-US ve LSIL Sitoloji yönetimi

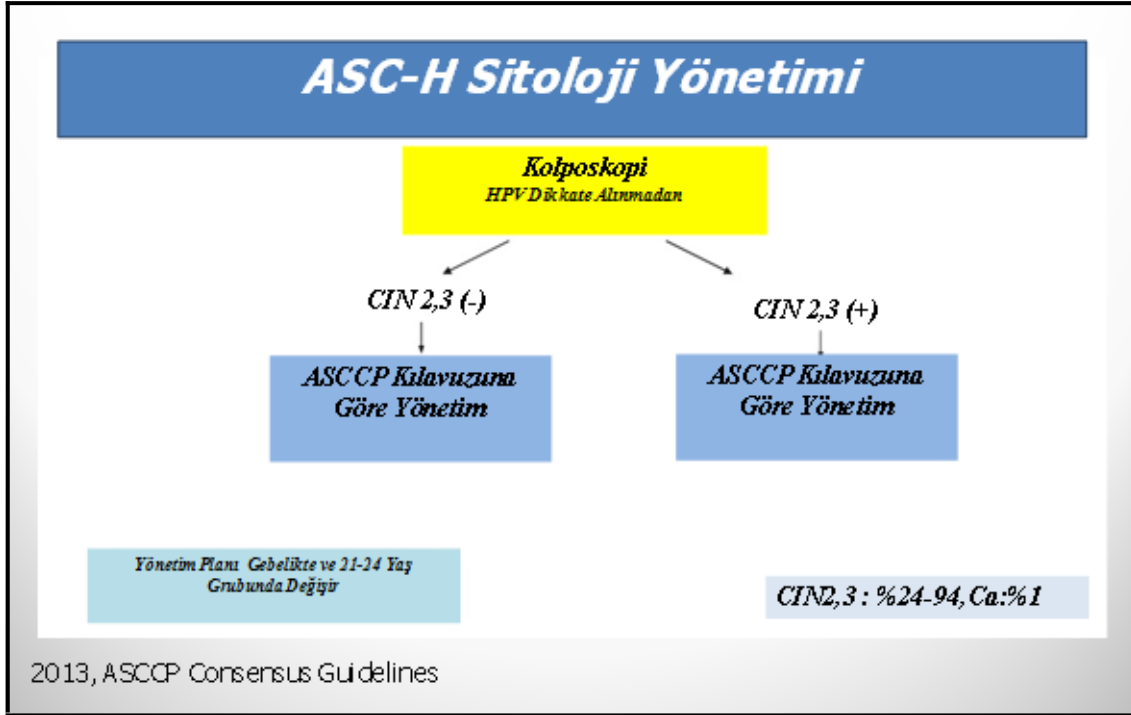
ASC-US’lu Gebe Kadınlara Yaklaşım; Gebe kadınlarda ASC-US varlığında kolposkopi yapılmasının yararlı olduğu saptanmamıştır ve göreceli olarak kanser oranları da gebe popülasyonunda azdır (102, 150). Gebe kadınlarda kansere progresyon riski düşük olduğu için kolposkopik inceleme eğer invaziv servikal neoplazi durumu yoksa ertelenebilir. 20 yaş üstü gebe kadınlarda ASC-US’a yaklaşım gebe olmayan kadınlarla benzerdir. Tek fark ise gebelerde kolposkopik muayene 6 haftalık postpartum dönem sonrasına ertelenebilir (102, 103). Ayrıca gebe kadınlarda endoservikal küretaj yapılmamalıdır.

2.3.4.2. ASC-H Yönetimi

ASC, yüksek gradeli lezyonun dışlanamadığı durumlardır (ASC-H) ve servikal sitoloji bulgusu olarak nadir görülür. Bütün PAPS’ların içinde yaklaşık %0.27 ile %0.6 oranında saptanır (151, 152). ABD’de yapılan geniş çaplı bir araştırma sonucunda ASC-H’li kadınlarda hrHPV pozitifliği prevalansı yaklaşık %67 ile %86 oranındadır. Bu oran ASC-US’lu kadınlardan %30 fazladır (102, 153, 154).

ALTS’de ASC-H’li kadınların %84’ü HPV pozitif, %50’sinde CIN2 ve %30’unda CIN3 saptanmıştır. 35 yaş altı ASC-H’li kadınlarda HPV pozitifliği, 35 yaş üstü kadınlardan yaklaşık %40 daha fazla bulunmuştur. ASC-H’de ASC-US a göre biyopsi sonuçlarında CIN2 daha fazla saptanır (155). Negatif hrHPV testine sahip ASC-H’li kadınlarda CIN2 saptanma riski %20’dir (154). ASC-H’li kadınlarda CIN2,3

prevelenası %26 ile %68 civarındadır ve bu oran ASC-US'lu kadınlardan fazladır (151, 154). ASC-H'li kadınlar CIN2,3 bakımından daha yüksek riske sahiptirler ve doğrudan kolposkopik incelemeye yönlendirilmelidir. (Şekil 2.15)



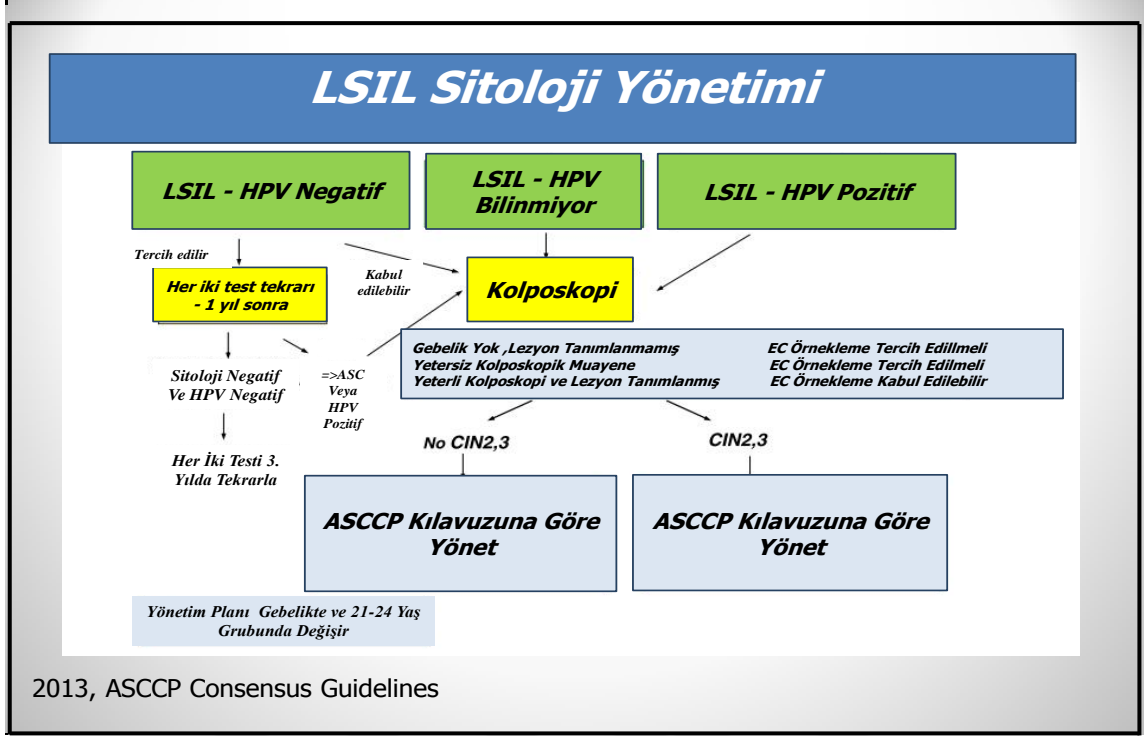
Şekil 2.15. ASC-H Sitoloji yönetimi

2.3.4.3. LSIL Yönetimi

2001 Bethesda Sistemine göre yapılan sınıflandırmada LSIL koilositik atipi ve hafif displazi/CIN 1 tarzı hücresel değişiklikler olarak adlandırılan HPV'nin sitopatik etkisi sonucu oluşan sitolojik değişiklikler olarak tanımlanmıştır (104). LSIL ASC-US'tan daha az görülür. Birçok laboratuvarın ASC-US: LSIL oranı 2.1'dir (101, 104). LSIL'li kadınların çoğu HPV-pozitifdir. Fakat bu pozitiflik artan yaşla birlikte azalmaktadır (156, 157, 158). Son dönemlerde yapılan metaanalize göre LSIL'li her yaş grubundan kadınlar dâhil edildiğinde hrHPV DNA pozitifliği %76.6 oranında saptanmaktadır (159).

LSIL'leri Paps tekrarı ile takip etme taraftarı olanların savunduğu nokta LSIL lezyonları zamanla regrese olma eğilimine sahip olması görüşüdür. Paps testini tekrarlamak için gereken süre lezyonun regrese olması için yeterli olmaktadır (160). Ayrıca Paps smear sonucu LSIL gelen bir kadında invaziv kanser gelişme riski oldukça düşüktür (101). Doğrudan kolposkopik muayenenin faydası CIN2,3 veya kanser olgularını zamanında yakalamak veya hastaların takibi bırakmasını önlemektir. Bu

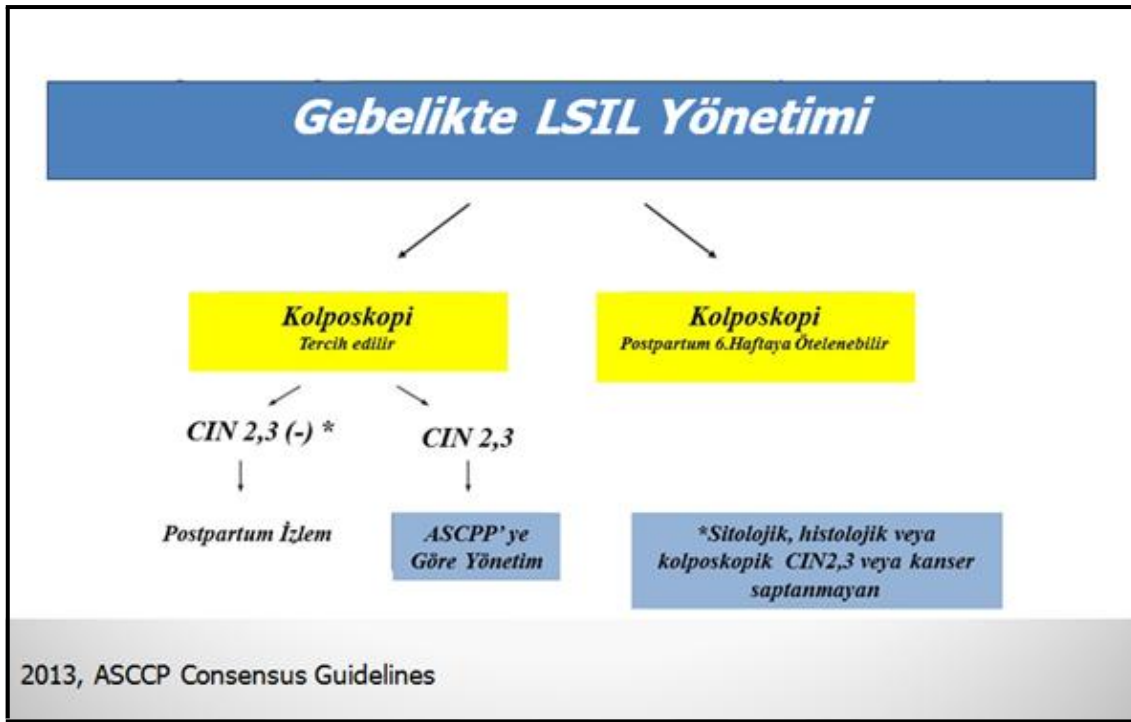
yöntemle kolposkopik anomalisi olmayan ve CİN lezyonları saptanmış hastaya yaklaşım güvenilir şekilde belirlenebilir (161, 162). (Şekil 2.16)



Şekil 2.16. LSIL Sitoloji yönetimi

Adölesanlarda LSIL; Yeni rehberlere göre adölesanların taranmasına gerek olmadığı bilinse de yine de adölesan taraması yapan doktorlar bulunmaktadır. Bu taramaların sonucunda ASC-US veya LSIL'e sıklıkla rastlanır. Adölesanlar için ASC-US yönetim rehberinde olduğu gibi LSIL tanılı adölesanlarda da doğrudan kolposkopik inceleme önerilmemektedir. Bunun yerine 12 ay sonra sitolojinin tekrarlanması yeterlidir. Eğer kontrol Paps sonucu HSIL gelirse kolposkopik muayene yapılır (102, 103). (Şekil 2.17)

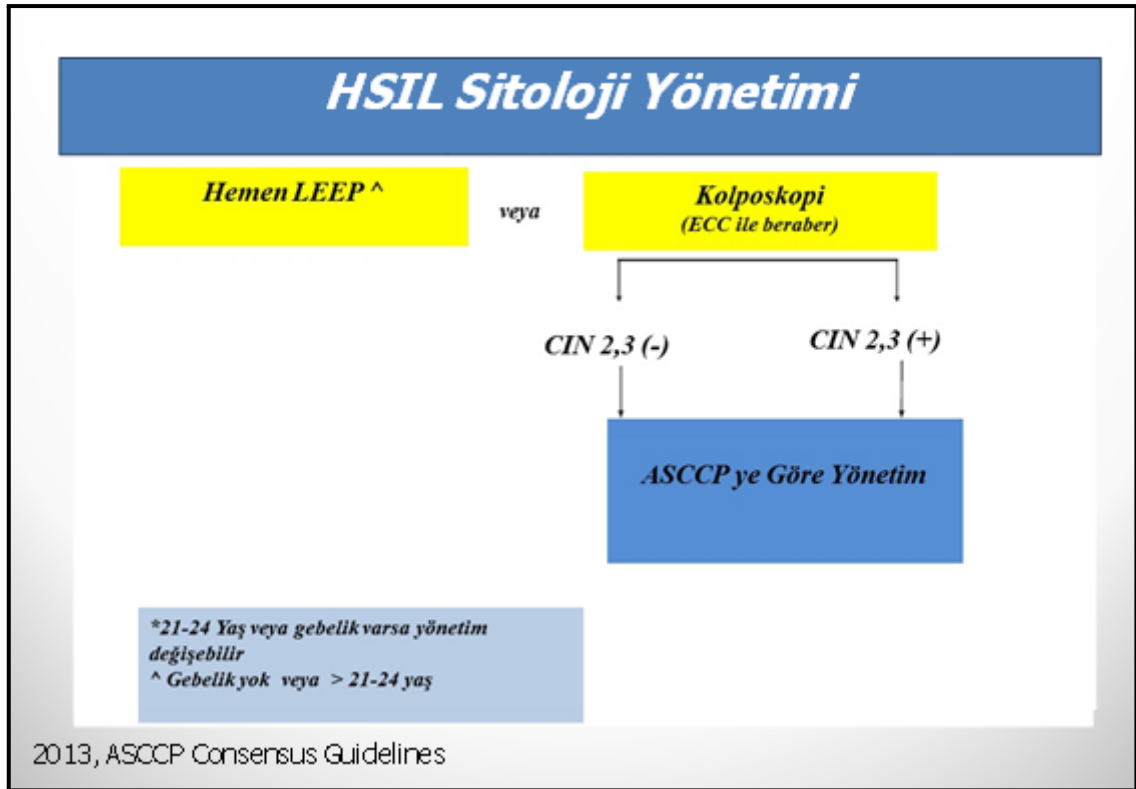
Gebe kadınlarda LSIL; Adölesan olmayan LSIL'li gebe kadınlarda kolposkopik inceleme tercih edilir. Gebe kadınlarda endoservikal küretaj önerilmez. Gebelerde kolposkopik incelemenin postpartum 6. haftaya kadar ertelenmesi kabul edilebilir. Hamilelik sırasında eğer kolposkopik, sitolojik veya histolojik olarak CIN2.3 şüphesi yoksa postpartum takip önerilmektedir. Bu kadınlar için gebelik süresince ek kolposkopik ve sitolojik inceleme yapılması önerilmez.



Şekil 2.17. Gebelerde LSIL Sitoloji yönetimi

2.3.4.4. HSIL Yönetimi

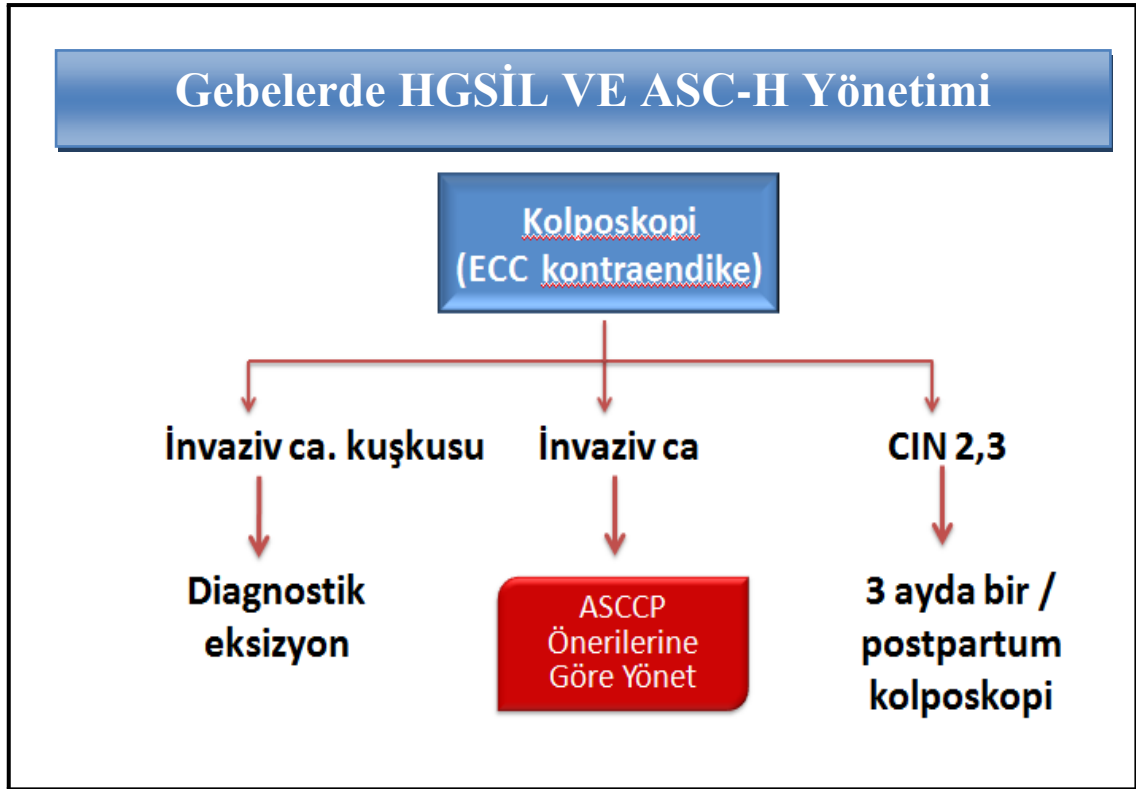
HSIL'in Bethesda sistemi terminolojisi daha önceden orta veya şiddetli olarak sınıflanmış Karsinoma in situ, CIN2 ve CIN3 kapsar (104). HSIL sık bir Paps değerlendirmesi değildir. ABD laboratuvarlarında ortalama HSIL raporlama oranı % 0,7'dir (163). HSIL oranı yaş ile değişiklik göstermektedir. 20-29 yaş arası kadınlarda %0,6, 40-49 yaş arası kadınlarda %0,2, 50-59 yaş kadınlarda ise %0,1 oranında HSIL saptanmıştır (102, 164). Kolposkopide HSIL sitolojisi olan kadınların yaklaşık %53-66'sında ve halka elektrocerrahi eksizyonel işlem (loop electrosurgical excision procedure - LEEP) sonrası kadınların %84-97'sinde CIN2,3 veya servikal kanser tespit edilmiştir (165, 166). *HSIL'li kadınların yaklaşık %2'sinde ise invazif servikal kanser görülmektedir. Bu yüzden HSIL'li kadınların ilk değerlendirmesi kolposkopi, uygun yönlendirilmiş servikal biyopsi ve endoservikal örnekleme, özel durumlarda anında eksizyonel işlemdir. HSIL'li kadınların neredeyse hepsinde HPV DNA pozitifliği saptanabilir (165, 167, 168, 169). Bundan dolayı HSIL Paps'lı kadınlarda "refleks HPV testi yapılması" önerilmemektedir (102, 103).* HSIL tanısının geleneksel tedavisi CIN2-3 veya AIS'in kolposkopik olarak belirlenmesi ve bulunan lezyonun tedavisi esasına dayanıyordu. Bu stratejinin, *kolposkopik biyopsi ve endoservikal örneklemenin* yüksek gradeli lezyonlarda ve kanserdeki sensitivite dezavantajına rağmen, gelişmiş ülkelerde servikal kanser oranının azalmasında başarılı olduğu kanıtlanmıştır (126, 131, 170, 171). (Şekil 2.18)



Şekil 2.18. HSIL Sitoloji Yönetimi

Kolposkopi CİN 2,3 lezyonlarını atlayabildiğinden, HSIL sitolojisine sahip kadınlarda kolposkopinin CİN 2,3'ü saptayamaması gerçekten CİN 2,3 olmadığı anlamına gelmez. Sonuç olarak HSIL olan kadınların çoğuna tanısız eksizyonel girişim uygulanır. Ne olursa olsun kolposkopi, lezyon boyutunun ve transformasyon zonunun sınırlarının belirlenmesi için yararlıdır.

Gebelikte HSIL yöntemi; Gebelikte HSIL olan kadınların yönetim ve kolposkopisi gebe olmayan kadınlardan daha zordur. İdeal olarak gebelikteki tipik kolposkopik değişiklikler konusunda deneyimli klinisyenler tarafından uygulanmalıdır. Bu değişiklikler servikal hiperemiye, kolposkopik olarak preinvaziv hastalıkları taklit eden belirgin normal epitel değişikliklerini, lokalize kanamayı, örtücü mukusu ve biyopsi sonrası kanamayı içerir (172). İnvaziv kanser riski yüksek olan ileri yaş gebelerde kolposkopik izlenim yüksek grade hastalığı düşündürüyorsa biyopsi önemlidir (102, 103). Öncelikle kanser dışlanmalıdır, postpartum döneme kadar servikal tedavi ertelenebilir. Çünkü CİN, antenatal sitoloji ve postpartum inceleme arasında regrese olabilmektedir. Gebelikte invaziv kansere progresyon nadirdir. Kolposkopi gebelik ilerledikçe daha zor hale gelmektedir (103, 173, 174). (Şekil 2.19)



Şekil 2.19. Gebelikte HSIL ve ASC-H Sitoloji Yönetimi

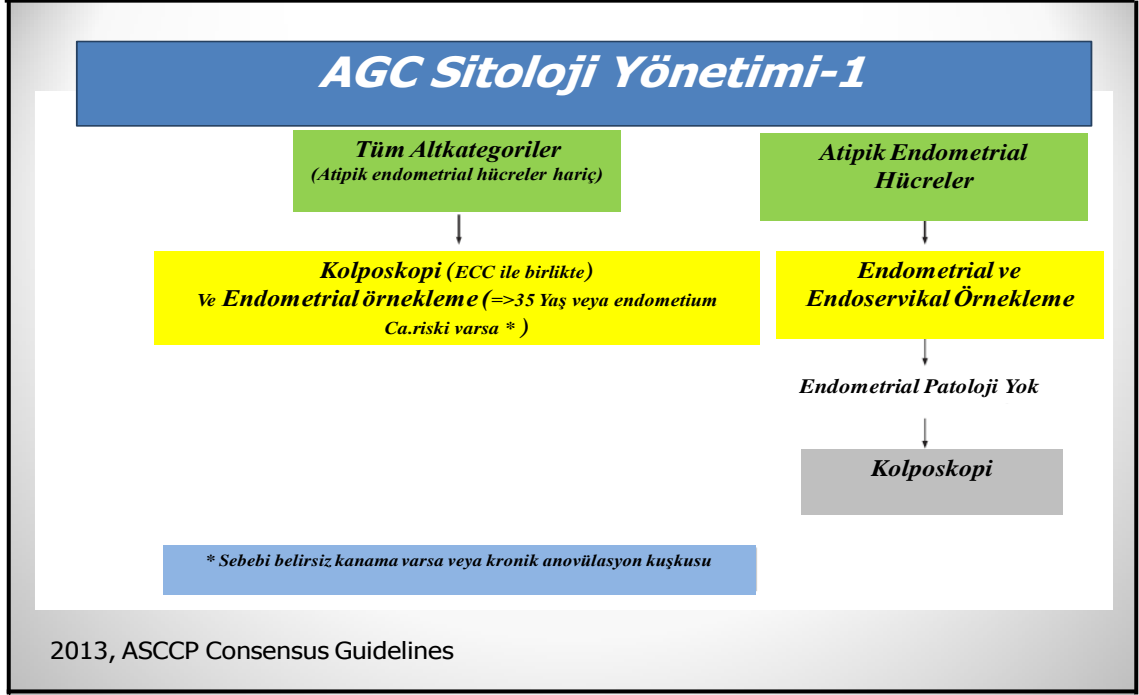
2.3.4.5. AGC Yönetimi

Bethesda 2001 çalışmayı ASCUS ve AGUS'taki benzer terminolojiden kaynaklanan karışıklık nedeniyle "tanımlanmamış önem" terimini devre dışı bırakmış AGUS veya AGC olarak kısaltmıştır. Hücrelerin Adenokarsinoma İn Situ (AİS) ile uyumlu olarak değerlendirilmesi için gerekli sitolojik kriterler bu patolojiyi ayrı bir başlık olarak listelemek için yeterli olarak değerlendirildi. En sık alt sınıflama, daha sonra hücresel özellikleri iyi tanımlanırsa endoservikal veya endometriyal olarak ayrılabilen AGC veya hücresel özellikleri iyi tanımlanmamışsa basitçe "başka türlü tanımlanmamış glandüler hücre" olarak tanımlanan AGC-NOS olarak iki kategoriden oluşmaktadır. Daha ender olarak gözlenen tip ise atipik glandüler hücrelerin (endoservikal veya "glandüler hücreler") neoplaziyi düşündürdüğü durumlar olarak tanımlanmaktadır. Atipik endometriyel hücrelerin evrelemesi başarılı değildir ve bu yüzden "neoplazi düşündüren" alt kategorisi bu değerlendirme için hiç var olmamıştır (104). Sitopatologlar arasında AGC'nin değerlendirmesi geniş farklılıklar göstermektedir. Ancak gözlemciler arası ortak görüş LBC (Liquid Based Cytology-Sıvı Bazlı Sitoloji) örneklerinde ECC (Endoservikal Küretaj)'den daha iyi olduğu gözlenmiştir (175).

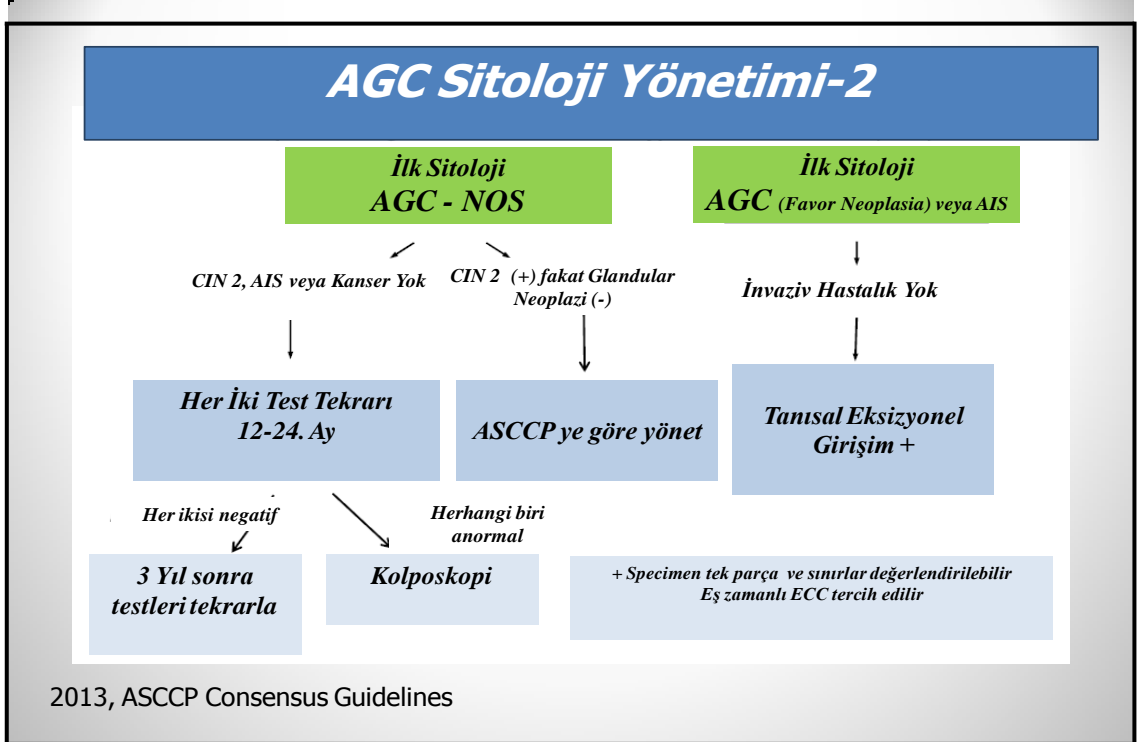
AGC sık bir Paps değerlendirmesi değildir. 2003 yılında yayınlanan ABD raporlarında %0,4 oranında gözlenmektedir (163). Genç yaşlarda daha sık tanı alma özelliği olan ASC, LSIL ve HSIL'in aksine AGC 40 yaş ve üzeri kadınlarda daha sık gözlenir (164). Paps sonucu AGC olan hastalar nadir olarak gözlenirse de büyük önem taşımaktadır çünkü takipte sadece HSIL Paps'larda AGC'ye oranla daha fazla CİN 2,3 saptanmaktadır. AGC sitolojilerin takibinde skuamöz lezyonlar glandüler lezyonlardan daha sık bulunduğu ve skuamöz lezyonların gençlerde daha sık, glandüler lezyonların ise yaşlılarda daha sık gözlendiği unutulmamalıdır (102, 103, 176). AGC'li kadınların çoğunda ciddi bir lezyona rastlanmaz. AGC'de yönetim kararı, glandüler atipinin doğal seyrindeki belirsizlik, sitoloji ve kolposkopinin glandüler prekanseröz lezyonları saptamasındaki yetersizlikler yüzünden engellenmiştir. Sitolojinin azalmış duyarlılığı, alt uterin segmentten gelen endometrial hücrelerin, tubal metaplazili endoservikal hücrelerin veya reaktif endoservikal hücrelerin glandular neoplaziler ile benzerlik göstermesi sebebiyledir (177). Paps sonucu AGC saptanan birçok kadının normal bulunmasının sebebi benign değişikliklerin AIS, skuamöz intraepitelyal lezyonlar ve kanserden ayrılmasındaki güçlüktür. Bu zorluk aynı gözlemciler arasındaki AGC değerlendirmesinin düşük tekrar edilebilirliğini de açıklamaktadır (175). AIS lerin yaklaşık %50'si CİN, invazif skuamöz hücreli karsinom veya adenokarsinom sınırında bulunmaktadır (178, 179). Bu yüzden CİN saptanması AGC'li kadının yönetimini değiştirmemektedir (102, 103).

Anormal sitolojinin takibinde geleneksel yönetim seçeneklerin, AIS'in ve küçük servikal adenokarsinomların tanınmasında benzer skuamöz lezyonlardan daha az etkili olduğunu göstermektedir (102). Servikal sitoloji serviksin adenoskuamöz ve adenokarsinomlarını taramada yetersiz kalmaktadır. Tarama programında olmayan hastalar genellikle belirtiler geliştikten sonra doktora başvururlar. AGC yönetim şemasıyla glandüler kanser saptanan kadınları daha erken evrede saptayarak hastalığa özgü mortalitede azalmayı sağlarlar (180, 181). AGC'li kadınların hiçbirisinde 12 aylık takipte CIN2,3 veya AIS saptanmamıştır (182). Ancak AGC'nin HPV testi ile başlangıç triyajı endometriyumdan veya fallop tüplerinden kaynaklanan HPV ile ilişkisiz neoplazileri kaçırılabilir (102, 103). Bu sebeple AGC sitolojili hastaların başlangıç takibinde ne sitoloji tekrarı ne de HPV testi uygun olarak görülmektedir. Ancak hastanın HPV durumunun bilinmesi ilk incelemede hastalık saptanmayan hastaların takibinde HPV ilişkisiz neoplazi riskinin belirlenmesinde yardımcı

olabilir. AGC'li kadınlarda başlangıç incelemesinin kolposkopiye, endoservikal değerlendirmeyi, örnekleme (eğer yapılmamışsa), HPV testini ve gerekli olduğunda endometriyal değerlendirmeyi içermesini gerektirir (102, 103, 183, 184). (Şekil 2.20-21)



Şekil 2.20. AGC Sitoloji yönetimi-1



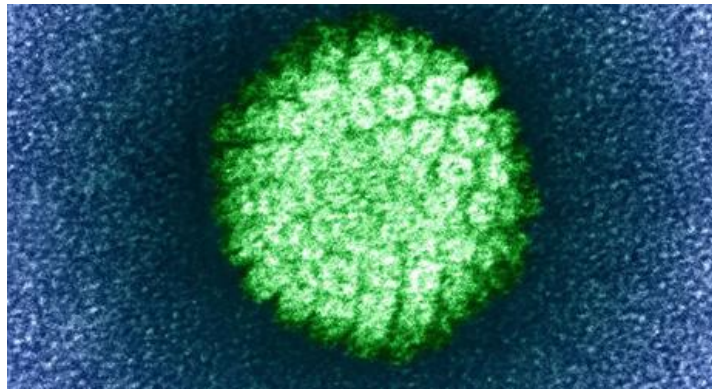
Şekil 2.21. AGC Sitoloji yönetimi-2

Endoservikal adenokarsinom genç kadınlarda artan endişe iken, endometriyal kanser 35 yaş üstü kadınlarda baskındır (184, 185). Belirtisiz premenapozal kadınlarda servikal sitolojide normal endometrial hücreler anlamlı değildir (102, 103).

Sonuç olarak anormal sitoloji sadece hastaların yarısında endometriyumu birincil bölge olarak doğru şekilde belirleyebilir. Ayrıca servikal sitoloji endometriyal neoplazi tarayıcısı olarak tasarlanmamıştır. Endometriyal hiperplazili veya kanserli birçok kadın düzensiz kanamaya, artmış mukus akıntısına sahiptir. Bu yaştaki kadınlarda herhangi bir anormal glandüler sitoloji endometriyal neoplazi endişesini artırır. Endometriyal hiperplazi ve endometriyal kanser 49 yaş altındaki hastaların AGC Paps takiplerinin sadece %3'ünde saptanırken, bu yaşın üzerindeki kadınlarda bu oran %19'dur (186). Bu nedenle *ASCCP kılavuzu 35 yaş üzerindeki AGC veya AIS sitolojili her kadına endometriyal örnekleme önermektedir*. Gebelikte AGC yönetimi HSIL gibidir.

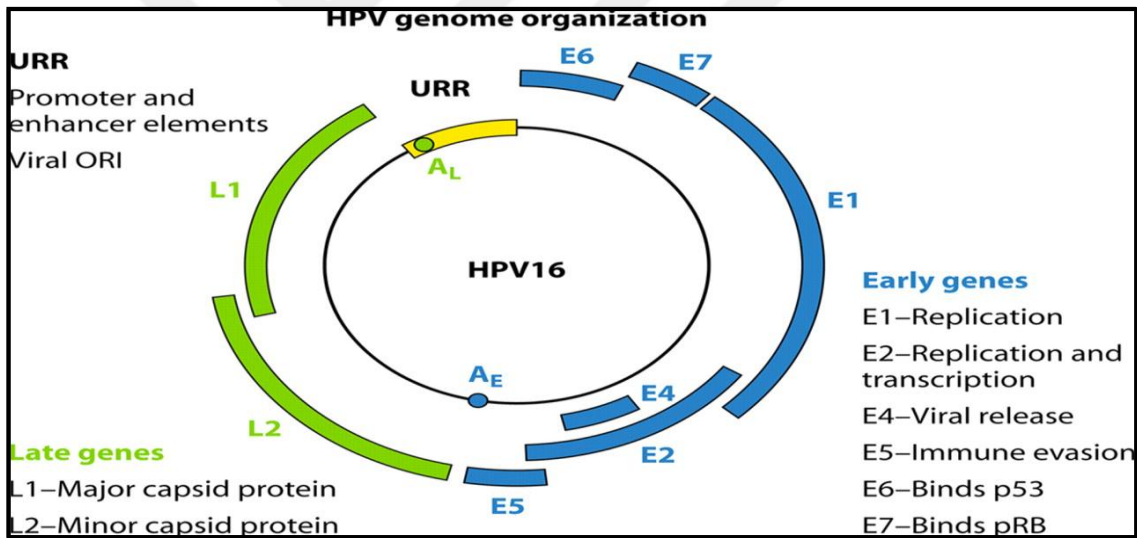
2.4. HPV

Human papilloma virüsü (HPV) (Şekil 2.22) ve servikal kanser arasındaki ilişki açıkça belirlenmiştir (187, 188). *HPV enfeksiyonu, CİN 3 ve serviks kanseri olgularının hemen hemen hepsinde, vajina ve vulvar kanserlerin yaklaşık %40-%50, penis kanserlerinin %50'si ve anal kanserlerin %90'una neden olur* (187, 189). Servikal neoplazili kadınların büyük çoğunluğunda HPV DNA (190, 191) tespit edilebilir düzeyde olduğu ve yüksek riskli HPV (hrHPV) varlığının yüksek dereceli intraepitelyal neoplazi riskinde artış öngördüğü gösterilmiştir (191, 192). Sağlıklı, asemptomatik kadınların yaklaşık %5 ile %27'sinde hrHPV DNA testi pozitif iken aksine, (193, 194, 195) yüksek dereceli CİN ile kadınların %90 ile %100'ünde pozitif olarak bulunmuştur.



Şekil 2.22. HPV Elektron Mikroskopisi Görüntüsü

Papilloma virüsleri küçük, 8000 baz çifti çift sarmallı DNA virüsleridir, epitel hücrelerini enfekte ederler. Virüs, zarfsız 72 yüzeyle ikozahedral protein kapsid ile kaplıdır. Virüs genomu genellikle sirküler şekilli ve sadece tek iplik transkripsiyona aktif olacak şekilde bulunur. HPV genomu üç bölgeye ayrılmıştır: üst bölge düzenleyici (URR), erken bölge (E) ve geç bölge (L) (Şekil 2.23). URR (Upstream Regulatory Region), HPV genomunda kodlamanın olmadığı, viral replikasyon düzenlenmesi ve erken bölgede aşağı dizilerinin transkripsiyonunun sıralanmasından sorumlu bölgedir (190, 196, 197). Fonksiyonel papilloma virüs genleri, sadece erken (E) ve geç (L) bölgelerde bulunur ve açık okuma alanları olarak ifade edilir (ORFs). Her ORF, RNA polimerazın spesifik bölümleri tarafından okunur (197, 198). Erken bölge ağırlıklı olarak erken viral yaşam döngüsünün olduğu viral replikasyonda önemli proteinleri kodlar. Geç bölgeler, virüs ömrü çevrimi içinde daha sonra kronolojik olarak ortaya çıkan kapsid yapımları için gerekli viral yapısal proteinleri kodlar (187, 197, 198).



Şekil 2.23. HPV Genomunun organizasyonu

Erken bölgenin URR aktivasyonu, viral replikasyonu desteklemesi yoluyla yüksek viral kopya sayısını korumaktan sorumludur. Kansere ilişkili HPV tiplerindeki, erken bölge (E) aynı zamanda hücre dönüşümü (transformation) destekleyen proteinleri kodlar. HPV'nin erken bölgesinde, proteinlerin 8 farklı ORFs de kodlandığı tespit edilmiştir. Bunlar E1'den E8'e kadar düzenlenmiştir (197). E1 ORF viral genomik replikasyondan sorumlu bir protein olan helikaz'ı üretir. Bazı HPV tiplerindeki transkript analizleri E2 geninin, viral transkripsiyon ve replikasyonun güçlü uyarıcısı olan E2 regülatör proteinini ve E8-E2C proteinini kodladığını ortaya çıkarmıştır. Bu

proteinler diğ er erken alan ORF'leri özellikle E6 ve E7 transkripsiyonunu düzenler (198, 200). Dolayısıyla, bu iki genetik bölgenin onkojenik potansiyelinin supresyonunda önemli bir işleve sahiptir. (Tablo 2.3)

Konak hücre genomu içine hr HPV tiplerinin integrasyonu HPV düzenleyici E2 proteininin işlevini bozar, viral onkogen ekspresyonunun negatif feed back ile kontrolünün kaybına neden olur. Bu bozulma ilerleyici (progresif) hastalık için potansiyel bir belirteç, servikal neoplazi patogeneğinde kritik bir olay olarak kabul edilmiştir (201).

Tablo 2.3. HPV Gen Fonksiyonları (202)

GEN DİZAYNI	GÖREV
E1	Viral DNA replikasyonunu başlatma
E2	DNA replikasyonunda yardımcı viral replikasyonu düzenler
E3	Net değil ama E3 ubiquitin ligaz onkogeneğini başlatabilir
E4	Sitokeratinleri bozar
E5	Transformasyon
E6	Transformasyon, <i>p53</i> tümör supresor proteinin yıkımını hedefler
E7	Transformasyon, <i>rPb</i> 'ye bağlama
E8	E2 ile birlikte viral transkripsiyon ve replikasyon
L1	Major kapsid protein
L2	Major kapsid protein

E3 genin işlevi henüz belirsizdir, ama E3 ubiquitin ligaz çeşitli kanserlerin gelişimi ve ilerlemesine neden olabilir (203). Yoğun enfeksiyon durumunda E4 protein ürünleri büyük miktarlarda saptanır ve enfekte olmuş hücrelerin normal sitokeratin matrisi değiştirmeden hücrelerden viral parçacıkların salınmasında önemli rol oynar (197, 198, 204). Buna ek olarak, E4 messenger (m) RNA kodlayan transkriptler, yüksek dereceli lezyonlar ve kanser de belirgin olarak down regüle edilmiştir (205). E5 proteini hücre-hücre füzyonu sonucu binükleer hücrelere neden olur ve konağın immün yanıtını down regüle eder. Ayrıca epidermal büyüme faktörü reseptörü ve platelet derived büyüme faktörü reseptörü gibi bazı büyüme faktörü reseptörlerini aktive eder (197, 198, 206)

HPV türlerinin değişen kanser yapıcı tür ve tipleri, esas olarak iki onkogen E6 ve E7 aktivitesi ile ilişkilidir. Bu iki genin ürünleri diğer fonksiyonlarının yanı sıra sırasıyla tümör baskılayıcı protein p53 ve pRb ile etkileşirler (187). En önemli anti onkojenlerin inaktive olması ile spontan mutasyonlar zaman içinde birikebilir ve hücre gelişimine ve ölümsüzleşmesine neden olabilirler (207). E8 proteini yukarıda anlatıldığı gibi, E8-E2C olarak E2 düzenleyici proteini ile kompleks halde görünmektedir.

İnfektif HPV genomunun iki geç bölgesinde bulunan L1 ve L2, kapsid yapımına katılan proteinleri kodlar. L1 kapsid protein -major kapsid protein- yapısal ama tüm HPV tiplerinde antijenitesi sabit olmayan, L2 HPV tipleri arasında çok fazla değişen minor kapsid proteinlerini üretir. Ancak L2 tüm tiplerdeki major antijeni belirlediğinden L2'ye antijenik cevap daha fazla çapraz reaksiyon gösterir. Genellikle çevresinde kapsid olmayan HPV DNA enfektif değildir. L1 ve L2 kapsid proteinlerinin transkripsiyonu sadece üst ve orta epitelyal katmanlardaki farklılaşmış konak hücrelerde bulunan transkripsiyonel regülatör tarafından başlatıldığı düşünülmektedir (197, 200). L1 ve L2 tarafından kodlanan proteinler kondiloma akuminatalarda yüksek miktarda tespit edilebilirken, CİN 3 ve kanserde çok az miktarda tespit edilmektedir (197).

İnsan ve hayvan papilloma virüslerinin L1 kapsid proteininde kodlama yapan nükleoid dizilerinin karşılaştırılması ile filogenetik ağaçta süper gruplar sınıflandırıldı. Kendi süper gruplarında bulunan HPV'ler ve hayvan papilloma virüsler kendi supergruplarında bulunmayanlara oranla yakın ilişki içinde bulunurlar (208).

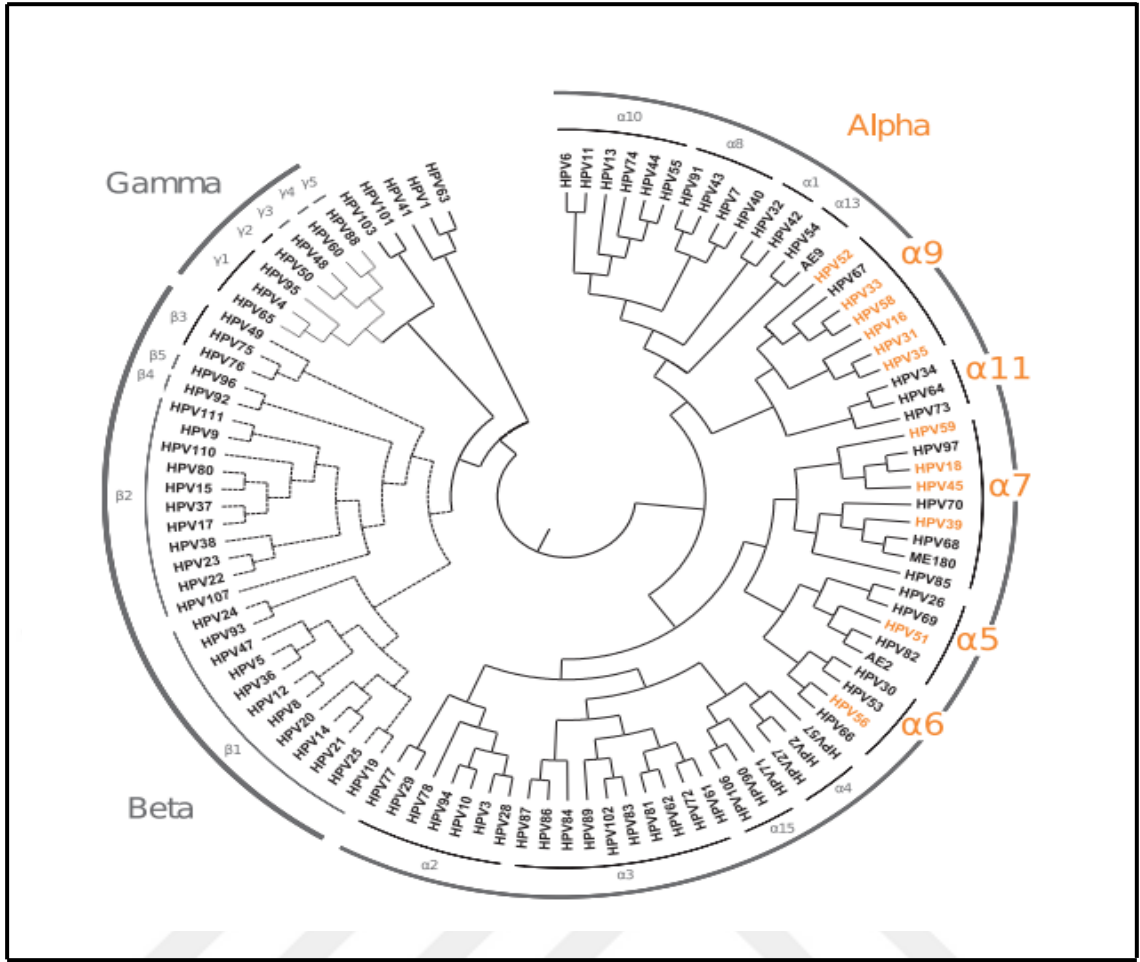
Bu virüslerde mutasyonlar nadirdir ve bir kere oluştuğunda filogenetik soyağacına belirteç olarak sıra ile yayılır (209, 210). Örneğin, düşük risk türlerin, filogenetik ağacının bir tek dalı içinde geliştiği görünmektedir (211). Bu viral değişmezlik ve anlamlı genetik varyasyonların olmaması aşı gelişiminde önemli etkide bulunmuştur.

Papillomavirüsleri birçok hayvan türünde olmasına rağmen, HPV insan dışı konaktan bulaşmaz. Papillomavirüsleri arasında tür özgüllüğünü, doğal konak türlerinin sınıflandırılması sağlar (örneğin insan, sığır). Türlerin spesifisite mekanizması henüz tespit edilmemiştir. (198). Tipler arasında subklasifikasyon nükleotid sıralamasına göre yapılır. En sık görülen HPV tipleri aşağıdaki tabloda listelenmiştir. (Tablo 2.4)

Tablo 2.4. Genital Sistem ve Diğer Mukozal HPV Klinik İlişkisi (212)

KLİNİK	HPV
Genital Yol	
Subklinik infeksiyon	Tüm genital HPV tipleri
Egzofitik kondilom	6, 11
Yassı kondilom	6, 11, 16, 18,31, diğerleri
Bowenoid papilloma	16
Dev kondilom (Bushke-Lowenstein)	6, 11
<i>Serviks kanseri</i>	
-Orta-güçlü ilişki	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59,
-Zayıf-hiç ilişki	6, 11, 26, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 62, 66
Vulva kanseri	16
Penil kanser	16
Respiratuar Papilloma	6, 11
Konjoktival Papilloma	6, 11
Oral kavite	
Genital yol HPV'leri ile infeksiyon	6, 11, 16

Her papillomavirüsü, spesifik bir epitel için yüksek oranda tropizm gösterir, kendi onkojenite derecesine sahiptir ve aynı türdeki çeşitlerinden onkojenitesi farklılık gösterir (213). Viral tropizm tam anlaşılmasına rağmen, nükleotid yapısındaki farklılıklar ve spesifik anatomik bölgelerde viral ve konak kodlanmış proteinler arasındaki etkileşimlere ikincil olduğu düşünülür. Papillomavirüsleri, spesifik konaklarda gelişmiştir ve her konağın spesifik dokularını enfekte etmek için özelleşmiştir (209). Bu nedenle HPV tiplerinin alfa genomu, anogenital ve oral mukozaya tropizm gösterir. Mukozal HPV tipleri içinde bazıları serviksi enfekte etmeye vajene kıyasla daha özelleşmiştir. Daha önemlisi alfa genomunun 3 parçası, karsinojenik HPV tipleri 1 parça üzerinde bulunurlar. Bu parça 5'e ayrılır; Alfa-5, alfa -6, alfa -7, alfa -9 ve alfa 11. Bu beş grupun farklı risk profilleri mevcuttur. Alfa 9 en önemli gruptur, neredeyse bütün karsinojenik tipleri içerir (213). (Şekil 2.24)



Şekil 2.24. HPV Filogenetik Ağacı

HPV tipleri bulunuş sıralarına göre numaralandırılmıştır. Bir HPV virüsü %10 L1 ORF ile diğer virüslerden farklıdır. 120'den fazla HPV tipi tanımlanmıştır. 40'dan fazlası anogenital bölgededir. Yaklaşık 15 tanesi servikal kanserlerde izlenmiştir. Bu nedenle yüksek riskli olarak nitelendirilmiştir (HPV 16,18, 31,33, 35, 39,45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) Ek olarak 3 tip HPV yüksek ihtimalle yüksek risk olabilecek şekilde sınıflanmıştır. (HPV 26, 53,63) 12 tanesi düşük risk olarak sınıflandırılmıştır. (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61,70, 72,81 ve CP 6108) (214). Herhangi bir HPV tipinde viral izolatlar %2'den fazla oranda kodlama bölgelerinde %5 oranında kodlama yapılmayan bölgelerde fark gösterir, prototip izolata kıyasla farklılık gösterir.

2.4.1. Düşük Riskli HPV Tipleri

HPV 6 ve 11 dış genityalya, vajina ve serviks ekzofitik kondilomların yaklaşık %90'ından, tekrarlayan solunum papsilomatozisinden çoğundan, servikal transformasyon zonunun düşük dereceli lezyonlarının %15'inden sorumludur. Düşük risk ve yüksek riskli virüslerin birlikte enfeksiyonları servikal intraepilyal neoplazili kadınlarda

yaygındır (215, 216). HPV tip 42,43, 44, 6 ve 11, nükleotid seviyeleri ve servikal kanserle ortak etkileri bakımından ilişkilidir. Bu türler vulva, serviks ve penisin düşük dereceli lezyonlarının sadece küçük bir oranında bulunurlar. Dünya çapında değerlendirilen 1.000 servikal kanserden sadece tek bir serviks kanserinde düşük riskli viral tip pozitifdir (217). HPV 6/11 normalde tamamen benign hastalıklar ile ilişkili olmasına rağmen bu iki tür ile birlikte görülen maligniteler vardır. Buschke-Lowenstein tümörü, anal, vulvar ve penis kanserlerinde (bu lezyonların %2.5 -%5 civarında nedeni) HPV 6/11 bulunur (218). HPV 6/11 ile Tekrarlayan Solunum Papillomatozlarında (RRP) nadir malign dönüşüm de bildirilmiştir. HPV 53, 61,70 ve 71 gibi diğer düşük risk HPV türleri, öncelikle alt genital sistem genelinde düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LSIL) ile ilişkilidir (208, 219).

2.4.2. Yüksek Riskli HPV Tipleri

Yüksek riskli HPV tiplerinin onkojenik riski, insan tümörleriyle olan yakın ilişkileri ve normal hücreleri ölümsüzleştirme yetenekleri ile tarif edilmiştir (198). CİN 3 ve servikal kanserin yüksek riskli HPV tipleri ile rölatif risk ilişkisi çok iyi tarif edilmiştir (214, 220). 15 tip yüksek risk olarak sınıflandırılmış olmasına rağmen servikal kanserlerin çoğuna 8 tipi neden olur (Sıklık sırasına göre: HPV 16, 18, 45, 31, 33, 57, 58 ve 35). *Başlıca alpha 9 (HPV 16 ilişkili) türleri fakat alpha 7 (HPV 18 ilişkili) tipleride orantısız bir şekilde adenokarsinom için önemlidir. HPV 16 açık farkla en kanserojen ve HPV kaynaklı diğer anogenital ve orofarinks kanserlerinde bulunan en önemli türdür. Servikal kanserlerin %50-60'ında HPV 16, %10-12'sinde HPV 18 bulunur.* Dokuz ülkeden 11 vaka kontrol çalışmalarından elde edilen verilerde, skuamöz hücreli serviks kanseri olan hastalarda en sık görülen HPV tipleri sıklık sırasına göre 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 ve 35 olduğu belgelenmiştir. Kanser olmayan kontrol grubu içindeki kadınlar arasında en yaygın tipler de 16, 18, 45, 31, 6, 58, 35 ve 33'dir. Bu nedenle popülasyondaki en yaygın dört tip servikal kanserli kadınlardaki en yaygın dört tiptir. HPV 16 özgül biçimde persiste etme ve persiste ettiğinde neoplazi gelişimine neden olmaktadır. Bu da, HPV 16'yı güçlü bir insan karsinojen haline getirir ve klinik olarak ayrıca değerlendirilmesini gerektirir (209). CİN 3 tespit edilenlerde HPV 16 en sık görülen tiptir. HPV 16 ile oluşan CİN 3, diğer karsinojenik HPV tipleri pozitif olan CİN 3'lere göre daha genç yaşta gözükür (221, 222). 30 yaş üzeri CİN 3'lü kadınların %49'unda HPV 16, %9,2'sinde HPV 31 ve %8,5'inde HPV 18 bulunmuştur. İleri yaşlarda HPV 16 ile ilişkili CIN3, AIS ve CIN3/AIS'lerde oransal olarak düşüş izlenir

(222). HPV 16 adenokarsinomların yaklaşık üçte birine neden olur ve aynı zamanda HPV ile ilgili vulva (vulvar intraepitelyal neoplazi VIN), vajina (vagina intraepitelyal neoplazi VaIN), penis (penil intraepitelyal neoplazi PIN), baş-boyun ve anüs (anal intraepitelyal neoplazi AIN) intraepitelyal neoplazilerin %40-90'ında saptanır (223, 224). Diğer HPV kanserojen genotipler ile karşılaştırıldığında, normal Paps'lı kadınlarda HPV 18 CIN 3 pozitifliği ile güçlü ilişkilidir (222).

HPV-16 yüksek riskli viral tip olsa da, vulva ve penis düşük dereceli (low grade) lezyonlarının en az %40'ında, düşük grade servikal lezyonların %30'unda, dış genital siğillerin %10'unda ve normal sitolojili kadınların en fazla %7'sinde tespit edilir. HPV 16 virüsü ile enfekte kadınlar geniş klinik değişkenlik gösterir, HPV ile ilişkili kanserler için çoğunlukla risk altında olmasına rağmen, sıklıkla asemptomatik kalan veya invaziv kansere ilerlemeyen lezyonlar gelişir. *Bir kısmında yokken, bazı HPV 16 ile ilişkili CIN'lerde invazyon gelişmesi, hala tamamen, anlaşılabilir değildir.*

HPV 18 CIN'lerde beklenenden daha nadir izlenmektedir. İnvaziv karsinomlarda ise ikinci en sık görülen viral tiptir (%25). Bu da, bu kanserlerin de novo oluşumunu düşündürür, yani intraepitelyal geçiş izlenmemiştir veya çok hızlı geçiş nedeni ile rutin tetkiklerle tespit edilememiştir (225). Bir diğer olası açıklama da, HPV 18'de E2 geninin diğer tiplere kıyasla erken kırılması olabilir bu da HPV 18'in erken integrasyonuna neden olur. Viral yükün ani düşüşüne neden olur. Bu da HPV 18 ilişkili hastalıklarda altta yatan histolojik anormalliğin ciddiyetinin neden minör sitolojik değişiklikler ile izlendiğini gösterir (201). Genç kadınlardaki Adenokarsinomlar genelde HPV 18 ile yüksek oranda ilişkili oldukları ve sitoloji ile zamanında fark edilemedikleri için bu modele uygundur (222, 226). *Paps Smear testi negatif olan kadınlarda HPV 18 ile ilişkili kanser oranı HPV 16 ilişkili kanser oranına kıyasla 2,6 kat daha fazla görülür (225).*

2.4.3. Düşük ve Yüksek Riskli HPV Tiplerinin Fonksiyonel Farklılıkları

Tüm papillomavirüsleri viral DNA'larını replike edebilmek için konak hücrede DNA sentezini indüklemelidirler. Replikasyon konağın enfekte hücrelerinde apoptozu durduran retinoblastoma (pRb) gen ailesinden olan E7 proteininin aktivasyonu ile sağlanır. Hem düşük hem de yüksek riskli HPV tipleri CIN 1 ve kondülamatada apoptozu durdurabilme yeteneğine sahip olmasına rağmen sadece hrHPV tiplerinin E5, E6 ve E7 proteinleri hücre siklusunun regülatörlerini inhibe ederek malign dönüşüme

neden olur (219, 227, 228). HPV E6 ve E7 proteinlerinin hücre çoğalmasında ve genetik anomalilerde farklı rolleri vardır ancak her ikisi de neoplazi oluşturmak için gereklidir (187, 197, 198). Bu gen ürünleri, Major tümör suprasör p53 ve pRb (retinoblastoma) proteinlerini inhibe etmektedir. E6'nın telomerazı aktive etmesinin yanında E6 ve E7 epitel hücrelerinin ölümsüzlük kazanmasını sağlarlar. E6 ve E7'nin kanser başlatıcı etkisi olmasa da her ikisi de direkt veya indirek olarak karsinogenezin her basamağından sorumludurlar (207, 229, 230).

Düşük riskli HPV tiplerinin E6 ve E7 proteinleri, p53 (Tümör Süpresör Gen) ve pRb (Retinoblastoma Geni)'ni tamamen inaktive edemezler (230). Sonuç olarak da düşük risk HPV hücrel ölümsüzlüğü, transformasyon ve onkogenezi minimal oranda etkilerler. E6 onkoproteini p53, uygunsuz DNA replikasyonunu durduran apoptoz geni ve apoptozun inhibisyonu için gereklidir (231). E6 proteini kodlayan HPV 16 veya 18 ile enfekte hücrelerde telomeraz aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. Telomeraz ekspresyonu servikal kanserlerde %85, CIN 2,3'te % 61, CIN1'de %10 ve normal histolojide % 7 oranla artmıştır (198).

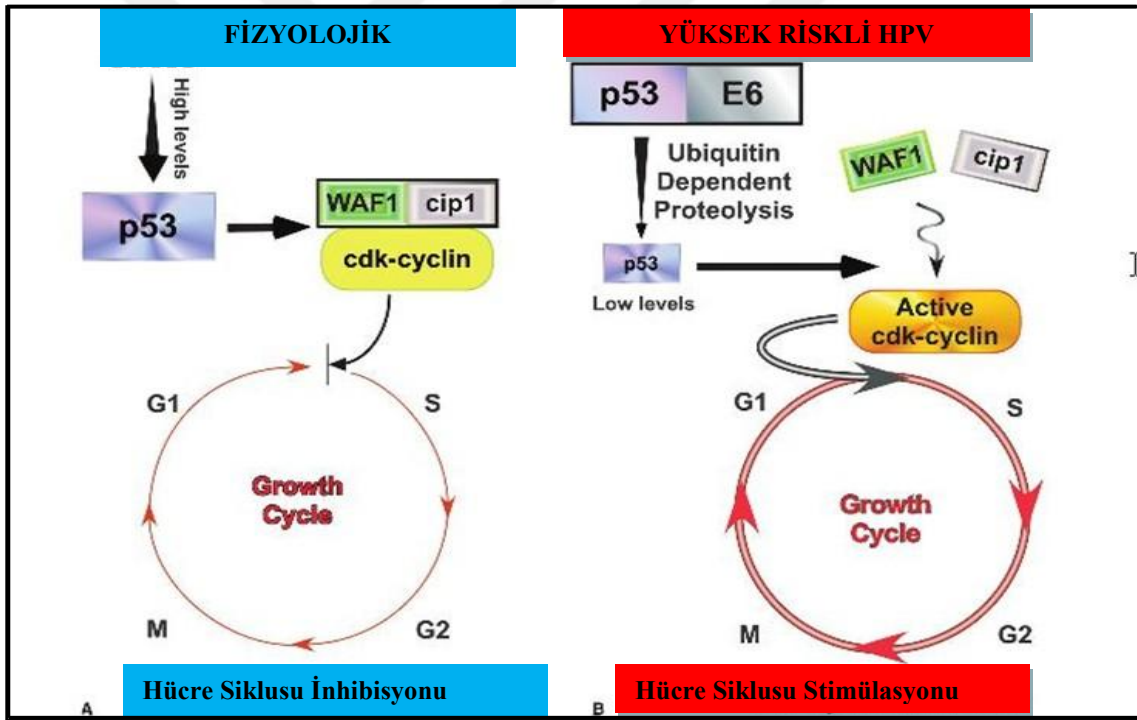
Yüksek riskli HPV tiplerinde bulunan E7 ayrıca hücre transformasyonuna yol açan hücrel büyüme düzenleyici proteinlerle etkileşime girer. E7nin protein ürünü tümör süpresör bir protein olan retinoblastoma bağlanır. Retinoblastoma proteini hücre bölünmesinin S fazındaki DNA sentezinde kritik ve yeri olan bir düzenleyicidir (198). Normal epitel hücrelerinde hücre bölünmesi sonlandırılmıştır, sadece bazal hücreler çoğalabilmektedirler. Bu nedenle HPV ile ilişkili epitelyal proliferasyonda pRb'nin süpresyonunu gerekir. Yüksek risk HPV'nin E7'si hücre transformasyonunu, proliferasyonunu, G1 fazından S fazına süpresyonunu gerekir (197, 232). Ek olarak E7 siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21 ve p27'yi (replikasyonun durdurulmasında görevli proteinler) inaktive eder (233). Bu nedenle E7'nin onkojenik özellikleri; hücre siklusu kontrol noktalarını bozması, hücrel proteinlerin ekspresyonunu değiştirmesi, hücrel karbonhidrat metabolizmasını bozması, apoptozu değiştirmesi olarak sıralanabilir (198).

Yüksek riskli HPV'lerde; E6 gen amplifikasyonları ve delesyonlarını bozarak, E7 ise anöploidiyi artırarak insan genomunun stabilitesini bozar (234). E7 sentrozom ilişkili mitotik mekikleri indükliyerek anöploidi riskini artırır (235). Sonuç olarak da HPV ile ilişkili lezyonlarda malign transformasyon gözlenir (236, 237). Düşük riskli HPV tiplerini diğer HPV tiplerinden ayıran temel özellik, moleküler düzeyde onkojenik

etkilerinin olmamasıdır. Düşük riskli HPV tipi olan HPV 6 ve 11’de Buschke Lowenstein verrüköz karsinoma gelişimi net açıklanamamıştır.

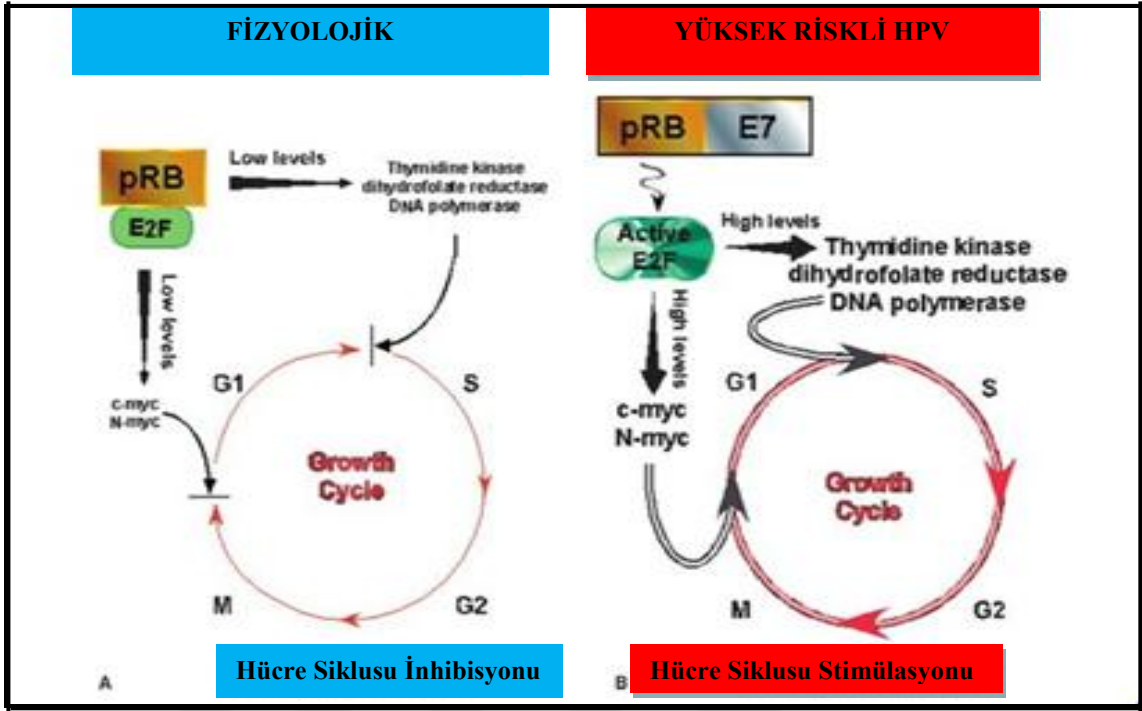
Düşük ve yüksek risk HPV’lerin ortak bir özelliği de konağın immün sisteminden kaçmasıdır (238). Bu HPV E6 ve E7 proteinlerinin, viral persistansı ve apoptozun inhibisyonunu açıklayabilir (197). Bu inhibisyonlar hücrelerde mutasyonların birikmesine neden olur ve karsinogenezis için önemlidir. HPV’nin onkojenik aktivitesi olması için virüsün uzun dönem persistansı ve mutasyonların hücrede birikmesi gerekir. Viral bulaş ve kofaktör etkileşimleri sonucunda hücresel kontrolün kaybı ve HPV persistansı oluşur (239). HPV DNA’sının konak DNA’sına geri dönüşümsüz integre olması sonucunda P53 ve pRb tümör supresör genleri inaktive olur. Bu durum genom stabilitesini bozar ve hücresel ölümsüzlük oluşturur.

E6 ve p53 karsinogeneze etkisi aşağıdaki şekilde gösterilmiştir. (Şekil.2.25)



Şekil 2.25. E6 ve p53'nin Karsinogeneze Etkisi

E7 ve pRb karsinogeneze etkisi aşağıdaki şekilde gösterilmiştir. (Şekil.2.26)



Şekil 2.26. E7 ve pRB'nin Karsinogeneze Etkisi

Servikal kanserlerde E6 ve E7 ekspresyonu korunmuştur, ancak E5 ekspresyonu viral integrasyon sonrası kaybolmuştur (196). İnvazyona gidişte ve hastalığın ciddiyetinde HPV integrasyonu önemli ve ciddi bir basamaktır (189). Yüksek oranda HPV enfeksiyonu düşük kanser insidansı arasındaki ilişki, bireyde bu mekanizmaların oluşumu ile açıklanabilir.

2.4.4. HPV Enfeksiyonun Doğal Seyri

HPV'lerin neden olduğu genital bölge kanserleri seksüel alışkanlıklar ile ilişkilidir. Bu alışkanlıklar HPV'ye maruziyet oranını belirler. HPV enfeksiyonunun bulaşması, multiple seksüel partner, oral genital temas veya genital bölgeden oto inokulasyon gibi bazı belirli seksüel davranışların sonucudur, bu nedenle standart seksüel davranış ölçümleri ile bu alışkanlıklar saptanabilir. Yaşam boyu fazla sayıda seksüel partner, erken cinsel ilişki yaşı, yeni partnerle tanıştıktan kısa bir süre içinde ilişkiye girilmesi ve cinsel yolla bulaşan hastalık hikayesinin bulunması HPV maruziyetine yol açan seksüel davranışlar olarak sıralanabilir (240). Başka bulaş mekanizmalarında bulunmasına rağmen, cinsel yolla kıyasla çok daha düşük oranda enfeksiyona neden olurlar. Seksüel maruziyetten önce araştırmaya dahil edilen kadınlar

üzerinde yapılan geniş çalışmalar incelendiğinde HPV enfeksiyonunun ana bulaş yolunun cinsel ilişki olduğu doğrulanmıştır (240, 241, 242).

Cinsel yolla bulaşan perzistan hastalığın en son sonucu servikal kanserdir. Seksüel aktivite hem penil HPV lezyonları hemde servikal karsinogenez için en önemli risk faktörüdür. Her iki partnerin cinsel geçmişi de, risk analizinde aynı derecede önemlidir.

Genital bölge papillomaları genital temasla geçerler bir çok çeşit HPV tipine maruziyet sık olmasına rağmen HPV tipleri arasında iletişim olamaz ve genellikle ayrı ayrı enfeksiyon yaparlar (243, 244). HPV maruziyetinden sonra lezyon oluşması için gereken inkübasyon süresi haftalar, nadiren de yıllar alır (245). İnsidental olarak HPV 6 veya 11 saptanan kadınların %64'ten fazlasında 36 ay içerisinde klinik olarak saptanabilen genital siğiller oluşmuştur (246). Dış genital bölgede siğili olan hastaların cinsel partnerlerinde % 66'ya kadar aynı lezyonların ortaya çıkması HPV'nin ne kadar kolay bulaştığının bir göstergesidir (245, 247). Buna rağmen % 40'lık bir kesim enfekte olmaz ve bunlarda hastalık oluşmaz veya lezyon saptanamayacak kadar geçici bir sürede var olur. Bu sürenin uzun olması kişilerde HPV maruziyetinin ne zaman nerde olduğunun saptanma ihtimalini azaltır. Buna rağmen HPV ve yeni hastalık saptanmasında en güçlü belirleyici yakın zamanda yeni bir partner hikayesidir (248, 249).

2.4.5. HPV'nin Yaşam Döngüsü

Toplumun büyük kısmında yıllar içinde kümülatif HPV maruziyeti olmasına rağmen çoğunlukta HPV nedeni lezyon görülmemektedir. Akut HPV enfeksiyonlarının sadece %5'i birkaç yıl persiste olur. HPV ile enfekte olan kadınların çok küçük bir kısmında persistan enfeksiyon veya kanser gelişir. Bu yüzden klinik olarak ortaya çıkan hastalıklar kuraldan çok istisnadır (187, 250). Sitolojisi negatif olan ve yeni HPV tanı almış kadınlar incelendiğinde ilk 5 yıl içinde % 15'inde bir sonraki paps teste anormal sonuç görülmüştür (250). Bu enfeksiyonların çoğu geçici olacaktır, viral işgalcinin yenilmesinde konak, virüs ve çevresel faktörlerinde dahil olduğu karmaşık bir etkileşim vardır.

2.4.5.1. Viral Giriş

Genellikle HPV dejenere olmuş deskuame genital epitel hücrelerine bulaşır. HPV kapsidi bazal keratinositler üzerindeki reseptörlere bağlanır ve bu reseptörler genellikle serviksin transformasyon zonu, anal kenar ve orofarinks gibi mikrotravmaya uğramış, ince veya immatür bölgelerde görülür (187, 251). Karsinojenik HPV nin kansere yol açtığı transformasyon zonları genellikle iki tip (squamoz, kolumnar) epitelin birleştiği yerlerdir. Bunun tersine transformasyon zonu bulunmayan fakat sürekli travmaya maruz kalan kadınlarda posterior forşet ve labia minoranın iç yüzü, genital siğiller gelişir ve bu siğillerin malign transformasyonu çok nadirdir.

HPV'nin kendine özgü ve diğer virüslerde görülmeyen, seçili epiteli enfekte etme yolu vardır. Viral bağlanma ve giriş araştırmaların aktif bir alanıdır ve bu konuda öğrenimler hızla artmıştır. Virüs bazal membrana ve epitelin bazal katlarına gelince HPV L1 proteini bazal membranda spesifik bir reseptöre bağlanır ve bu bağlanma viral yapıda değişikliğe yol açarak L2 proteinlerini ortaya çıkarır. Reseptöre bağlandıktan sonra lokal enzimler virüs üzerindeki yeni ortaya çıkmış L2 proteinini böler. Bu bölünme L1 molekülünün saklı kısmını ortaya çıkarır ve bu protein yeni oluşan epitelin bazal tabakasına bağlanır. (252).

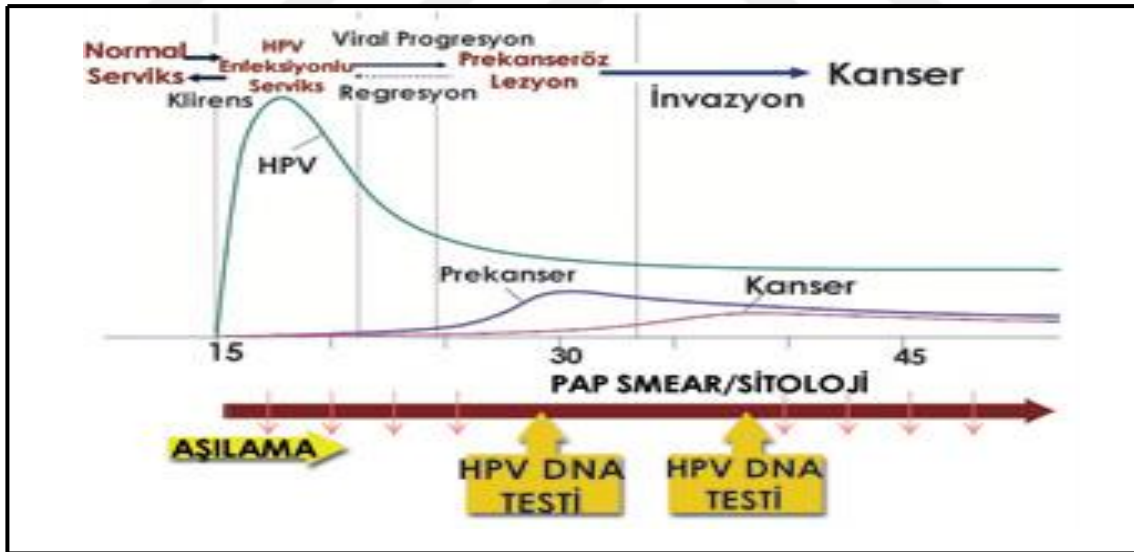
HPV'nin bazal epiteli enfekte etme şekli kendine hastır ve diğer virüsler tarafından bilinmez. Hücreleri enfekte etmek için öncelikle L1 proteini bazal membrandaki Heparan Sülfat Proteoglikan (HSPG) reseptörüne bağlanır ve bu olay yapısal değişikliğe yol açar. Bu bağlanma viral L2 proteinini ortaya çıkarır ve bu protein lokal enzim olan furin veya PC 5/6 tarafından bölünür. Bu bölünme L1 proteinin sakli epitopunu ortaya çıkarır ve bu epitop yeni oluşan epiteldeki bazal tabakanın üzerindeki reseptöre bağlanır. Bu mekanizma virüse epitelin bazal tabakasını enfekte etme avantajı verir.

Hücre içine girdikten sonra viral genom hücre nükleusuna transport edilir ve burda epizomal enfeksiyon yapar. HPV DNA kendini çoğaltan plazmid olarak var olur ve insan kromozomuna girmez. Bazal kök hücrelerde, perzistan enfeksiyonu sağlamak için genom her hücre siklüsünün S fazında kendini çoğaltır (198). HPV DNA aktif enfeksiyon öncesinde ve sonrasında hücre içinde sessiz bir şekilde bulunabilir (253). Bu 'sessizlik' durumu tam olarak net değildir, kalıcı olabilir veya viral replikasyonda değişikliğe yol açan genlerin enfeksiyondan hemen sonra devreye girmesi ve konağın

immün sistemi tarafından hızlıca baskılanması, HPV'nin saptanmasını engelleyebilir. Geleneksel olarak bu sessizlik evresi viral latent dönemi olarak adlandırılır. Bu tanım sadece HPV'nin moleküler, sitolojik veya görsel hiç bir konvansiyonel metotla tespit edilemediğinde kullanılır.

2.4.5.2. Prodüktif Viral Enfeksiyon

HPV'nin konak DNA sentezinden bağımsız olarak çoğalmasıyla prodüktif enfeksiyon başlar. HPV ilişkili hücresel anomalilerin çoğu geçici olduğu için enfekte insanların ne kadarının HPV eksprese ettiği bilinmemektedir. Viral replikasyon konak hücrelerde proliferatif anormalliklere yol açar. Bunlar; akantozis, koilositozis, nükleer atipi ve multinükleasyondur. Lezyonların morfolojisi yassıdan papsillere kadar değişkenlik gösterebilir. HPV ekspresyonunu belirleyen kesin faktör bilinmemekle beraber; konak virüs ve çevresel faktörlerin içinde yer aldığı kompleks bir etkileşimin önemli olduğu bilinmektedir (254). Çoğu bireyde hayat boyu HPV ile ilişkili hücresel değişiklik saptanmayacaktır. Ancak HPV enfeksiyonları geçici enfeksiyondan, anormal sitolojik bulgular, kolposkopik bulgular ve invaziv kansere kadar çok geniş bir yelpazede kendini gösterebilir. (Şekil 2.27)



Şekil 2.27. HPV Enfeksiyonu Seyri

HPV DNA, lezyonun bazal hücrelerinde düşük sayıda kopya içerir ancak DNA replikasyonu başladıktan sonra hücrede birçok HPV genomu üretilir (198). HPV replikasyonunda E1 ve E2 proteinleri gereklidir (197, 208). E4 proteininde prodüktif enfeksiyonda rol oynar. Bunu DNA replikasyonuna katkıda bulunarak veya sitokeratin

ağını bozup viral salınımı kolaylaştırarak yapar (198). HPV replikasyonu sırasında birçok büyüme faktörü ve bunların reseptörleri üretilir. Prodüktif lezyon meydana geldikten sonra özellikle yüzey epiteline yakın hücrelerde viral replikasyonla çok sayıda viral genom üretilir. Enfekte hücreler genellikle deskuame oldukları için en yüksek viral yükü içerir. Epitelin üst tabakalarında HPV L1 ve L2 proteinleri fazla miktarda ekspres olur (255). Bu proteinlerin birikmesi ve lezyonun üst tabakalarında HPV virionunun tamamlanması sayesinde HPV'nin sitopatik etkisi meydana gelirki bu etkiler hiperkromatik düzensiz 'kuru üzüm' şeklinde nükleus ve vakuollü sitoplazmadır. Bu sitopatik etkilere koliositosis adı verilir.

Aşınmış alanlardaki yara iyileşmesi bazal hücrelerde bölünmeyi ve vasküler proliferasyonu uyarır. Bu olay sayesinde viral replikasyon hız kazanır (256). Klinik olarak genital siğillerin iyileşmekte olan epitel sınırlarındaki aşınmış alanlar üzerinde yeniden meydana gelmesi (Koebner reaksiyonu) hücre yenilenmesi sırasında viral promosyonunun etkisini göstermektedir. Viral replikasyonu ve prodüktif enfeksiyonu ne başlatırsa başlatsın, bir kez başladıktan sonra hızlı epitelyal ve kapiller proliferasyon immunité tarafından ilk başta inhibe edilemez. Epitelyal proliferasyon akantosis, hiperkromazi ve artmış mitotik aktivite ile sonuçlanır. Tersine yüksek riskli HPV tipleri genellikle düz veya çok az yükselmiş lezyonlar meydana getirir. Bu lezyonlarda karnıbahar şekilli siğil oluşmaz. HPV ilişkili epitelyal lezyon oluştuktan sonra enfekte alanda hastalık yayılımı, lezyonun morfolojisi, klinik yansıma, terapötik cevap ve kanser gelişme riskinde çok farklı sonuçlar izlenir. Olası hastalığın karmaşıklığına göre yönetim şekilleri belirlenir.

2.4.5.3. Konak Savunması

HPV enfeksiyonlarının ister yüksek riskli ister düşük riskli olsun konak hücre tarafından kısa sürede temizlendiğini ve çok az malignite riski içerdiğini söyleyebiliriz. HPV enfeksiyonları geçicidir ve servikal HPV'nin temizlenme oranı 9 ayda %91 dir ve 2 yıl içinde saptanamaz hale gelir (242). Enfeksiyon ne kadar uzun sürerse persistans gelişme riski o kadar fazla olur (187, 243, 257).

Hastalık regrese olsun veya persiste olsun, lezyonun derecesi ve ciddiyeti ve de tedavinin başarısı konağın immün cevabı ile virüsün bundan kaçma becerisi arasındaki denge ile belirlenir Konakta immün cevabın ortaya çıkması varolan HPV run tanınmasıyla başlar. HPV enfekte ettiği epitel hücrelerini öldürmediği için ve epitel

hücreleri iyi birer antijen sunucu olmadıklarından HPV varlığı uzun süre saptanmayabilir. HPV saptandıktan sonra ilk cevap immünite tarafından verilir.

Kondilomlar klinik olarak ortaya çıkmaya başladıktan sonraki ilk 3 ayda % 20'ye kadar kendiliğinden geriler. Diğer % 60 hastada aşikar vulvar kondilomların lokal olarak tahribatı klinik remisyona sağlar. Geri kalan % 10-20 hastada HPV-nedenli lezyon "kalır ve standart ofis tedavilere direnç gösterir.

Yüksek riskli HPV ile enfekte ve aktif persistan hastalığı olan veya lezyon iyileştikten sonra rekürrens gösteren hastaların % 10-20'lik bir kısmı malign progresyon riski içerir. Bu alt gruptaki çoğu insanda sebebi bilinmeyen bir şekilde HPV'ye karşı immün eksiklik olduğu düşünülmektedir. Ancak bazı "rekürren" ve "persistan" hastalıklar yeni HPV tiplerine maruz kalmaya bağlanmaktadır (258). Örneğin tedaviden sonraki ilk 6 ay içinde rekürrens gösteren hastalarda orijinal lezyonla aynı HPV tipi saptanmıştır ve bu yetersiz immün cevaba bağlanmıştır, 6 aydan sonra rekürrens saptanan hastalarda ise genellikle farklı bir HPV tipi saptanmıştır (259). Belli bir HPV tipinin lezyonuna yeterli immün cevap veremeyen hastalar başka bir HPV tipine farklı immün yanıt verebilir.

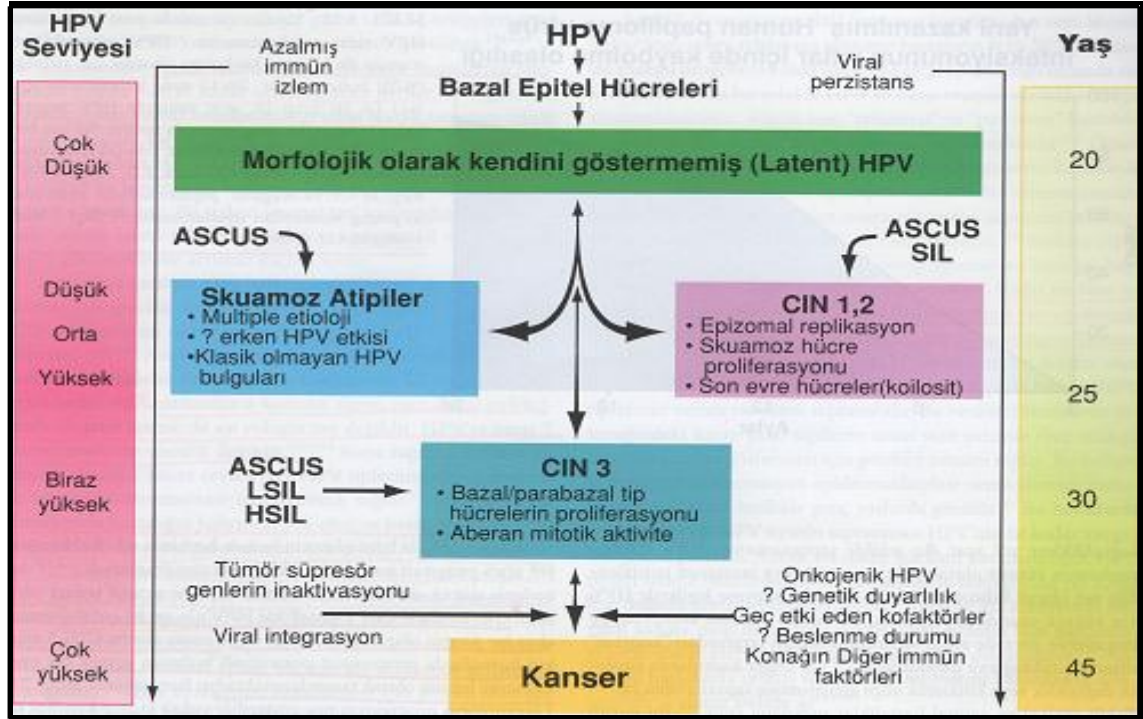
Nadir görülen ve herediter bir deri hastalığı olarak "epidermodisplasia verrukoformis" incelendiğinde HPV enfeksiyonlarının doğası, yayılımı ve immün sistemin önemi anlaşılabilir. Lokal hücrel immün defekti olan bu hastaların genital olmayan ciltleri incelendiğinde bilinen HPV tiplerinin neredeyse yarısı saptanabilir. Bu virüsleri temizleme yeteneğindeki kayıp yassı siğillerin uzun süre persiste olup malign transformasyon göstermesi için gereken zamanı sağlar. Bu nedenle malign transformasyon epidermodisplasia verruciformis hastalarının % 25'inde özellikle genç yaşlarda görülür (260). Bu hastalarda çok sayıda yeni HPV tipinin saptanması HPV'nin ne kadar yaygın olduğunu gösterir.

2.4.6. Servikal İnterepitel Neoplazilerin Oluşumu ve Seyri

HPV maruziyeti, onlu yaşların sonunda ve yirmili yaşların başında cinsel ilişki başlamasıyla artar, ancak klinik hastalık göreceli olarak daha az saptanır. Ancak çok sık yapılan taramalar daha yüksek oranda pozitif sonuç vermektedir. Genç kadınlarda 3 yıllık takip süresinde PCR ve sitolojik değerlendirmeyle yapılan çalışmada toplam % 60 oranında HPV enfeksiyonu saptanmıştır. Ancak insidental olarak saptanan bu hastalıkların çoğu geçicidir ve ortalama 8 ayda gerilemiştir (194, 261). Ancak ortalama

yaşın daha yüksek olduğu başka bir çalışmada da enfeksiyonun daha uzun sürdüğü gösterilmiştir (262).

HPV enfeksiyonlarından sonra genellikle üç klinik durum ortaya çıkar. Çoğu enfeksiyon ya latent fazda kalır (moleküler, sitolojik yada kolposkopik olarak saptanamaz) ya da sık olmayan taramalarla saptanmayacak şekilde geçici sitolojik değişikliklere yol açar. (Şekil 2.28)



Şekil 2.28. HPV nin Oluşturduğu Servikal Lezyonlar (16)

Bu şekilde saptanamayan HPV enfeksiyonlarının süresiz olarak persiste ettiği veya tamamen temizlendiği net olarak bilinmemektedir. İmmün süprese kişilerde HPV nin yüksek oranda saptanması, bu virüsün immün kompromize kimselerde persiste ettiği ve immün sistem tarafından “kontrol” altında tutulduğunu düşündürür (263). Diğer kadınlarda sitolojik değişiklik veya koilositik atipi gelişmesiyle saptanabilen HPV ile ilişkili servikal ve vajinal hastalıklar meydana gelir (264). Bu grup hastaların HPV'nin geçici doğasından ve saptamadaki bazı yetersizliklerden dolayı aslında olduğundan daha mı az görüldüğü tam olarak bilinmemektedir.

Minör atipi veya low grade intaepitelyal neoplazi izlenen çoğu kadında bu lezyonlar spontan geriler veya aynı kalır. Bu grup hastalarda high grade CIN gelişir ve takip süresince hRHPV DNA sürekli olarak pozitif izlenir (193, 265, 266). Ara ara HPV

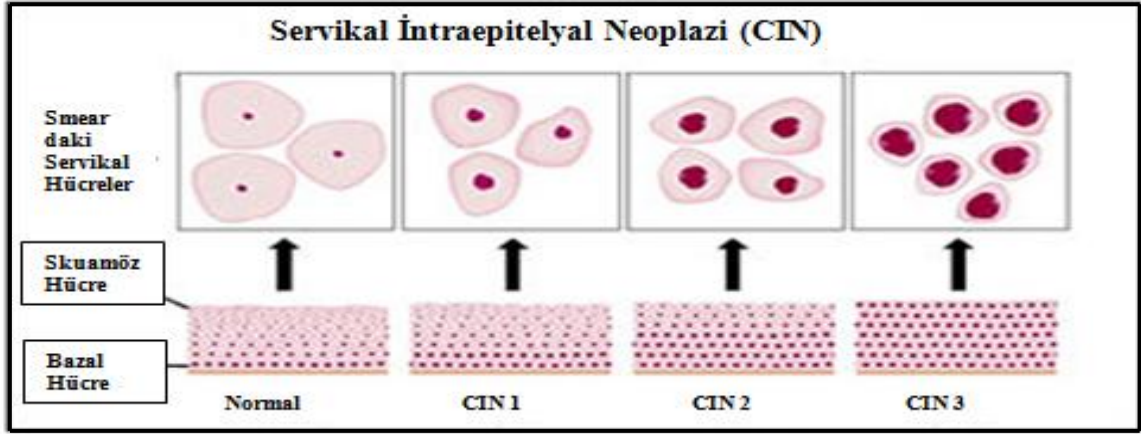
pozitif olan kadınlarda kısa vadede (24 aylık izlemde) hastalığın progrese olma riski düşüktür (187, 267). 34 yaşının altındaki kadınlarda %80 oranında gerilerken bu oran 34 yaşının üzerinde yaklaşık %40'tır (268). ASCUS-LSIL Triage Study çalışmasında (ALTS) LSIL ve HPV pozitif ASC-US'ların değerlendirilmesinden sonra saptanmış CİN 1 vakalarının CİN 2 ve CİN 3'e progresyon oranı 2 yıllık takip süresince %13 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada tamamen normal serviksi bulunan veya atipik transformasyon zonu olan ancak biyopsi sonucu normal gelmiş hastaların progresyonunda CİN 1 ile aynı oranda bulunmuştur. 2 yıllık takip süresince %11,2 oranında CİN 2'ye, %11,6 CİN 3'e progresyon izlenmiştir (269). Bu bilgiler göstermektedir ki CİN 2 veya 3 gelişmesinde önemli olan CİN 1 varlığı ya da yokluğu değil yüksek riskli HPV'nin varlığıdır.

Geçmişte CİN lezyonlarının hemen hepsinin servikal kansere yol açan progresif hastalıklar olduğu düşünülmekteydi (270, 271). Bu nedenle düşük-dereceli lezyon dahil hepsine agresif tedavi verilirdi. Günümüzde CİN 1 genellikle HPV'nin geçici enfeksiyonun akut bir formu olarak görülmektedir. Bunun aksine CİN 3 erişkin bayanlarda progresyon potansiyeli bulunan, gerçek bir prekanseröz lezyon olarak tanımlanmaktadır. Bazı çalışmalarda CİN lezyonlarının progresyon mu gösterdiği yoksa sadece kendini sınırlayıp sabit kalan ve regrese olan basit bir prodüktif enfeksiyonmu olduğu sorgulanmıştır. Progresyon gösteren hastalarda eş zamanlı birbirine komşu, farklı karakterde lezyonların olduğu ve saptanma olasılıklarının da birbirlerinden farklı olduğu gösterilmiştir (272, 273).

Bu bilgi yeni gelişen yüksek-dereceli lezyonların neden genellikle yeni oluşan squamokolumnar birleşkede ve düşük-dereceli lezyonun komşuluğunda oluştuğunu açıklar.

2.4.6.1. Persistan HPV Enfeksiyonlarının Progresyonu

CİN 1 lezyonlarının iyi diferansiye sitopatik etkileri viral enfeksiyonlar için klasiktir. Aynı şekilde CİN 3 lezyonların andiferansiye hücreleri neoplastik süreç için klasiktir. CİN 2 lezyonları ise regrese olacak düşük dereceli geçici HPV enfeksiyonları ile persiste olacak eksik gradelendirilmiş CİN 3 lezyonlarını içeren bir karışım gibidir. CİN 3 lezyonların karakteristik bulguları; nükleer kalabalıklaşma, pleomorfizm doku organizasyonunun kaybı ve anormal mitotik figürlerdir. CİN 2'de anormal hücreler epitelin 2/3'ünü tutarken CİN 3'te tamamını tutar. (Şekil 2.29)



Şekil 2.29. CIN Oluşumu

Yüksek dereceli CİN persistan HPV enfeksiyonundan kaynaklanır. HPV enfeksiyonun doğasını öğrenmek için yapılan bir çalışmada üçüncü vizitte enfeksiyonu temizlenen hastalarda CİN 2 veya 3 saptanmamıştır (198, 274). Ancak ilk 1 ile 3 yıl arasında insidental enfeksiyondan kaynaklanan CİN 2 ve hatta CİN 3 saptanmıştır (275, 276). CİN 3 lerin çoğu, köken aldığı ilk HPV enfeksiyonundan sonraki 10 yıl içinde saptanmıştır (187). HPV persiste oldukça temizlenme olasılığı azalır ve CİN 3 gelişme olasılığı artar (257). Persistan enfeksiyonu olanlarda CİN 3 gelişme riski 25-35 yaşları arasında artar ve daha sonra azalır (187). CİN 3 gelişmeden uzun süre karsinojenik HPV persistansı nadirdir fakat görülebilir (277). Ostor'un derlemesinde CIN 3 % 32 oranında ergrese olurken % 12 oranında progresse olmuştur. CİN 2'nin regresyon ve progresyon oranları CİN 1 ve CİN 3 un ortalamasına yakındır (278). (Tablo 2.5).

Tablo 2.5. Regresyon, Perzistans Ve Progresyon Oranları (278)

	Regresyon	Perzistans	CİN3'e Progresyon	Kansere Progresyon
CİN 1	%60	%30	%10	%1
CİN 2	%40	%40	%20	%5
CİN 3	%33	>%56	-	%12

CİN 3 prevalansı 35-65 yaşları arasında azalır ve bazı ülkelerde 65 yaşından sonra ikinci bir pik yapar (279). CİN 1 ve CİN 2 lezyonların çoğu hrHPV ile ilişkili olmasına rağmen bunların çok az bir kısmı CİN 3'e veya invaziv kansere ilerler (280). High grade lezyon geliştirme riski tip bağımlıdır. HPV 16 diğer karsinojenik tiplere

göre daha fazla persiste olma eğilimindedir. Buna ek olarak HPV 16 diğer karsinojenik tiplere göre daha erken yaşlarda CİN 2 ve CİN 3 e neden olur (281). Yapılan prospektif bir kohort çalışmada ilk sitolojisi normal olan ve HPV 16 18 pozitif olan hastaların %39'unda ilk 2 yılda CİN 2 ve CİN 3 geliştiği gösterilmiştir. Bunun aksine HPV negatif hastalarda sadece %3 oranında CİN 2 ve CİN 3 gelişmiştir (272). HPV 31,33 ve 35 pozitif olan hastalarda %22 progresyon izlenmiştir. HPV 16 ve diğer varyantlarının farklı biyolojik potansiyel göstermesi lezyonun regrese veya progrese olması üzerinde önemli bir etkidir.

Hangi kadınlarda CİN 3 veya invaziv kanser gelişme riskinin arttığını belirlemede konaktaki genetik değişkenliklerde önemli rol oynar. Servikal kanserle Human Leukocyte Antigen (HLA) arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda çalışma vardır (260, 282). HLA viral antijenlerin sunumunda önemli rol oynar. HPV'nin immünolojik kontrolünde rol oynayan HLA daki pleomorfizimlerin servikal kanserin patogeneğinde rol aldığı düşünülür (283). Farklı toplumlarda, HLA DRB* 1301 - DQB1 *0603 haplotipinin koruyucu olduğu ve HLA B71DQB 1*032 haplotipinin ise servikal hastalıklarda riski arttırdığı gösterilmiştir (260). Progrese ve regrese olan lezyonları birbirinden ayıran diğer bir genetik değişken de tümör süpresör genlerin inaktivasyonu ve DNA tamir genlerinde meydana gelen tek nükleotid polimorfizmidir (283, 284, 285, 286). Tümör süpresör genlerinin dört kromozomdan birinde (3p,4p,4q ve 1q) veya daha fazlasında inaktive olması invaziv kanserler de genel olarak görülürken (%80). Daha düşük gradeli lezyonlarda daha az olarak görülür; CİN 3 (%41), CİN 2 (%22), CİN 1 (%0). Bu bulgular CİN 3 un spesifik tümör süpresör genlerinin ve immün sistem tamir genlerinin inaktive olduğu, aynı zamanda onkojenik HPV tipi ile enfekte stabil olmayan tek perekürsör hücrelerden geliştiği düşüncesini desteklemektedir.

CİN 3 lezyonlarda CİN 1 ve 2'ye göre daha fazla DNA indeksi ve anöploidizasyon izlenir (287). Özet olarak viral onkogen ekspresyon olunca ilk olarak kromozomal instabilite ve anöploidizasyon meydana gelir, bunları takiben hrHPV genomu etkilenmiş tüm hücre klonlarına entegre olur (288). İnvazyona progresyon için uzun zaman gereklidir bu zaman random genotoksik hadiselerin gerçekleşmesi için gereken zamandır.

2.4.6.2. İnvazyona İlerleyiş

CİN 3 lezyonlar yavaşça büyür ve invazyon oluşturmadan DNA hasarı giderek artar. Erken invazyon genç kadınlarda nadiren görülür (187). CİN 3'un yeterli süre

perziste olduktan sonra genellikle invazyona ilerlediği uzun zamandır düşünülmektedir (289). CİN 3 nadiren regrese olurken, CİN 2 genellikle regrese olur. ALTS çalışmasında CİN 2 saptanmasında CİN 3'e göre oluşan farklılık bunun kanıtıdır. Çünkü CİN 2'ler ilk 2 yıl içinde %62 spontan olarak geriler (280). Mikroinvaziv skuamöz hücreli kanserler genellikle CİN 3'ten gelişir. Atipik skuamöz epitelden gelişen tekli veya çoklu çıkıntılar bazal lamina üzerinden servikal stromaya 3 mm'den daha fazla olmayan invazyonu ile karakterizedir. İnvaziv kanserde aynı histolojik görüntüye sahiptir. Fakat servikal stromal invazyon 3 mm'den fazladır.

Kanser normal hücre büyümesindeki kontrolün kaybı sonucu ortaya çıkar. Normal doku bütünlüğü hücrelerin yaşlanması, ölmesi ve yerine başka hücrelerin geçmesiyle sağlanır. Bu sıralı işlemler sırasında DNA mutasyonu veya genotoksik stres nedenli bir hata meydana gelirse hücrelerde ya büyüme durur yada programlı hücre ölümü (apoptosis) gerçekleşir. Apoptosis hücrelerin malign transformasyona ve karsinogeneze karşı verdiği bir cevap tümör süpresör gen proteini olan p53 ve pRb hücrede DNA hasarı, büyüme faktörlerinin yetersizliği ve onkojenlerin hücreyi üremeye zorlamağı gibi bu durumlarda üretilirler. DNA hasarına cevap olarak p53 protein seviyesinin arttığı gözlenmiştir (197). Bu artma daha öncede bahsedildiği gibi hücre döngüsünün durmasına veya apoptozize yol acar. Servikal kanser gelişiminde etkin olan birçok molekül aydınlanmayı beklemektedir. Örneğin E6 ve E7 proteinlerinin p53 ve pRB'ü inhibe ettiği bilinmekteyken hrHPV nin hedef aldığı C-MYC, RAS ve hTERT (telomeraz/human telomeraz revers transkriptaz) gibi diğer genlerin etkinliği netleştirilememiştir (260, 290). Bunlara ek olarak, HPV enfekte konak hücrelerinde hipermetilasyonla tümör süpresör genlerinin susturulması da sık rastlanan epigenetik bir olaydır (260, 291, 292). Bu işlem sırasında bir metil gurubu genin promoter bölgesine tutunur ve gen ekspresyonunu baskılar. Bu olay insan kanserlerinde çok sıktır ve HPV'nin onkojenik yolakta başka bir rol daha üstlendiğini düşündürür. Kanser progresyonunda ayrıca normal hücre adezyonlarında bozulmalar meydana gelir ve komşu hücrelerle olan iletişim zarar görür. Onkojenik tiplerdeki E6 proteini hücre adezyon proteinlerini azaltır (293, 294). HPV'ye ilk maruziyetten invazyona geçiş için çok uzun süre gereklidir. Bu sürede viral integrasyon ve hücresel transformasyon için gerekli kompleks olaylar meydana gelir. Bu uzun süre zarfında transformasyona yol açan ikincil olaylar meydana gelme şansıda artar. Progresyon genellikle monoklonaldır ve HPV DNA konak genomuna entegre olur (295). Ancak kanserde HPV 16 DNA'sı

her zaman konak genomuna entegre olmaz. Bazende epizomal formlarında ya da epizomal ve entegre formlarının kombinasyonu şeklinde bulunur.

2.5. SERVİKAL LEZYONLARIN TANI YÖNTEMLERİ

Servikal kanserin görülme insidansı, 1940 lı yıllardan günümüze yaklaşık yüzbin kadında 25'ten, yüz bin kadında 9'lara 10'lara, genel mortalite de benzer bir eğilim göstererek yüzbin kadında 3'ler civarına düştüğünü görülmektedir. Günümüzde serviks kanseri insidansı bir plato çizmektedir. Teorik olarak yüzbin kadında 1 oranında olması gerekirken, bu oran halen yüzbinde 3'ler civarındadır.

Servikal kanser oranının düşmemesi; mevcut sitolojik tarama yöntemiyle veya konvensiyonel veya diğer sitolojik tarama yöntemleriyle yanlış negatiflik oranının hala normalden yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Bunun dışında anormal sitolojili grup da yanlış yönetim, toplumun taranmaması veya bazı kanserlerin kısa süre içerisinde gelişmesi gibi unsurlarla genel mortalite ve insidans oranının beklediğimiz oranlara erişememesinin diğer nedenleridir. Yanlış negatif sonuçlar, sitolojik taramaların önemli bir problemidir. Yanlış negatif sonuçların yaklaşık %70'i örnekleme hatalarına bağlanmaktadır. Geri kalanı ise anormal hücrelerdeki tanıma ve değerlendirme yetersizliği ile ilişkilidir. Bu nedenle yeni tarama tekniklerine ihtiyaç vardır.

Tarama yöntemlerinin 4 temel amacı vardır:

1. Örneklemenin kalitesini yükseltmek,
2. Mevcut anormal hücreleri tanıma yeteneğini arttırmak,
3. Servikal kanser ve anormal sitoloji gelişiminde önemli rol oynadığı bilinen HPV'nin dokularda ve hücrelerde etkilerini tanıyarak prognoza katkı sağlamak,
4. Anormal dokulardaki fizyolojik, genetik, moleküler markerları araştırarak, daha doğru, daha uygun tanı yöntemleriyle geliştirmektir.

Servikal kanser arama tarama yöntemleriyle ilgili çeşitli organizasyonların en son önerileri tablo 2.6'da özetlenmiştir. Servikal kanser 20 yaş öncesi kadınlarda sık görülmez. Bu yaş grubunda servikal kanser taramasında yanlış pozitiflik oranı diğer yaş gruplarından daha fazladır. hr-HPV enfeksiyonu, sitolojik ve histolojik anormallikler bu yaş grubunda yüksek oranda regrese olur. Bu nedenlerden dolayı 20 yaş ve daha genç kadınlarda servikal kanser taraması önerilmemektedir.

Tablo 2.6. Servikal Kanser Tarama Programları

Protokoller	ACS 2002	ACOG 2009	USPSTF 2012	T.C SAĞLIK BAKANLIĞI 2009
Başlangıç zamanı	21 yaşında başlamalı veya cinsel ilişki başlangıcından 3 yıl sonra (21 yaşından önce tarama önerilmiyor)			30 Yaş
Tarama Aralığı				
-Paps Test	Yıllık, 30 yaş üstü ve 3 negatif sonuç varsa 2-3 yılda bir yapılmalı	Yıllık, 30 yaş üstü ve 3 negatif sonuç varsa 2-3 yılda bir yapılmalı	En az her 3 yılda bir yapılmalı	5 yılda bir
-Sıvı Bazlı Test	2 yılda bir, 30 yaş üstü ve 3 negatif sonuç varsa 2-3 yılda bir yapılmalı	2 yılda bir, 30 yaş üstü ve 3 negatif sonuç varsa 2-3 yılda bir yapılmalı	Takip için yeterli kanıt yok	Takip için yeterli kanıt yok
-HPV Testi	Eğer HPV ve sitoloji testi negatif ise 3 yılda bir	Eğer HPV ve sitoloji testi negatif ise 3 yılda bir	Takip için yeterli kanıt yok	Takip için yeterli kanıt yok
Bitiş Zamanı	70 yaş üzerinde en az 3 negatif testi varsa ve en son 10 yıldır anormal sitoloji yoksa	Ust yaş limit için yetersiz kanıt	65 yaşın üzerinde normal Paps testi olan ve düşük riskli olan hastada tarama kesilir	65 yaş üzeri ve son 2 testi negatif olanlar
Histerektomi Sonrası Tarama	Benign nedenle yapılmışsa veya daha önce HSIL öyküsü yoksa tarama kesilir	Benign nedenle yapılmışsa veya daha önce HSIL öyküsü yoksa tarama kesilir	Benign nedenle yapılmışsa veya daha önce HSIL öyküsü yoksa tarama kesilir	Benign nedenle yapılmışsa veya daha önce HGSIL öyküsü yoksa tarama kesilir

Servikal Tarama Yöntemleri

A. Sitolojik yöntemler

1. PAPS (PAPS Smear)
2. Sıvı bazlı teknikler (ThinPrep)
3. Kompüterize teknikler (AutoPaps-Papsnet)

B. Visüel yöntemler

4. Asetik asit testi (VİA/VİAM)
5. Spektroskopi
6. Speculoskopi
7. Servikografi
8. Kolposkopi

C. Diğer

9. Polarprobe
10. HPV TESTLERİ

2.5.1. Paps Smear

Paps smear testi dökülen servikal hücrelerin toplanıp incelenmesi esasına dayanan sitolojik bir tarama testidir. Test ilk kez 1942 yılında George Papanicolaou tarafından tanımlandığı için onun adına ithafen Paps smear şeklinde adlandırılır. Sitolojik yöntem, hızlı ve kolay tanınma olanağı sağlar, dokuya zarar vermez ve sık olarak hücre örneği almak açısından elverişlidir. Sitoloji, sadece tarama testi olup diğer yöntemlerle (kolposkopi ve histoloji) irdelenmesi gereken bir yansımadır. Sitolojik incelemenin yanlış negatif oranları ilk yayınlarda %40 olarak bildirilmiştir. 1947 yılında Dr.Ayre'nin sayesinde (Ayre Spatülü) yanlış negatiflik %20'lere düşmüştür (%10- 35). Yanlış pozitiflik ise % 5'tir (296).

Paps smear hataları genel olarak örnek alımında hata, laboratuvar hatası ve laboratuvar kalite denetiminde yetersizlik gibi nedenlere bağlıdır. Konvansiyonel Paps smear taramasının sensitivitesi % 11-98, spesifisitesi % 14-97, yanlış negativitesi % 6-55 arasındadır. Yanlış negativitenin % 70'i anormal hücre içermemesi nedeniyle gerçek negatif olarak sınıflandırılabilirken; sadece % 30'u laboratuvar hatasına bağlıdır (297, 298).

Paps smearin alınmasından cama yayılmasına dek geçen süreçte hücrelerin %80'i kaybedilebilmektedir. Cama yayılabilen hücreler arasında anormal hücreler

saptandığında, havada kurumaya bağlı artefaktlar, ortamda bulunabilen kan, mukus, inflamatuvar debris gibi kontaminasyonlar veya yaymanın kalın yapılmış olması smearin yorumlanmasında hatalara yol açabilmektedir (299). ABD’de servikal kanser hastalarının %50’sinin smear yetersizliği veya yokluğuna bağlı olduğu düşünülmektedir (300).

Paps smear alımı konusunda standardizasyon, 2000 yılında Amerikan Sitopatoloji Derneği kriterleri ile sağlanmıştır.

Amerikan Sitopatoloji Derneği Kriterleri Özeti: (301)

1. Paps smear son adet tarihinden 10-18 gün sonra alınmalıdır

2. Testten önceki 48 saat içinde

- Vajinal duş
- Vajinal tampon, vajinal kontraseptif ajanlar veya ilaç kullanımı
- Cinsel ilişki olmamalıdır

3. Paps smear ile birlikte hastanın

- Adı soyadı (son 5 yıl içinde değişiklik varsa belirtilmelidir)
- Yaşı ve/veya doğum tarihi
- Menstruel durumu (SAT, histerektomi, gebelik, postpartum, HRT)
- Önceki anormal sitoloji veya biopsi sonuçları,
- Önceki tedaviler veya cerrahi girişimleri
- Risk durumu
- Örneğin alındığı bölge (serviks, vajen) belirtilmelidir

4. Steril veya tek kullanımlık spekulum kullanılmalıdır.

5. Lubrikan kullanılmamalıdır (kayganlaştırıcı olarak ılık su kullanılabilir).

6. Hücrelerin spatula üzerinde kalmaması amacıyla tahta spatula veya pamuklu çubuk yerine plastik spatula kullanılmalıdır. Spatula kullanılırken dikkat edilecekler;

- Spatula 360 derece dönüşle kullanılmalıdır
- Transformasyon bölgesi tam olarak görülmelidir
- Fırça 45-90 derece dönüşle kullanılmalıdır;
- İlk olarak spatula ile vajen ve ektoserviks örneği alınmalıdır
- Daha sonra fırça ile endoserviks örneği alınmalıdır
- Smear alınan sahanın dışında şüpheli bölge varsa, buradan ayrıca smear alınmalıdır

- Uzunluğu boyunca camın yarısına fırça ile örnek yayılmalı, daha sonra camın diğer yarısına fırça yuvarlanarak örnek yayımına devam edilmelidir
- Örnek yayımı sırasında fırçanın aşırı basıncı veya ileri geri farklı yönlere hareketlerinden kaçınılmalıdır
- Smear hemen fikse edilmelidir
- Süpürge tarzı fırçalarla hem ektoserviks, hem de endoserviks örneği alınabilir
- Fırça 360 derece ve 5 tur dönüşle kullanılmalıdır

7. Uzunluğu boyunca cam üzerine fırçanın uzun aksı paralel olacak şekilde önce bir yüzü daha sonra aynı trase boyunca diğer yüzü üzerindeki hücreler yayılır.

8. Fiksasyon alkol içeren kap içinde yapılıyorsa;

- Her örnek için ayrı kap ve ayrı solüsyon gerekir.
- Örnek kap içinde sürekli saklanabileceği gibi, 20-30 dk alkol içinde tutulduktan sonra çıkartılıp havada kurutulabilir.

9. Fiksasyon sprey ile yapılıyorsa;

- Bu amaçla üretilmiş spreyleler kullanılmalıdır.
- Saç spreyi kullanılmamalıdır.
- Sprey camdan 15-25 cm uzaklıkta kullanılmalıdır.

10. Preparatlarda, vajinal, ektoservikal ve endoservikal örnekler aynı cama yanyana yayılır.

11. Vajinal ve ektoservikal örnekler aynı preparat üzerine yayılabilir ve endoservikal örnek ayrı bir preparata hazırlanabilir.

12. Tek preparat - çift preparat arasında maliyet ve işgücü dışında, medikal açıdan üstünlük yoktur.

Dünya Sağlık Örgütü, 35 - 40 yaş arası kadınlarda 1 kez yapılacak Paps smear testinin invaziv kanser riskini %65 azaltabileceğini öne sürmüş olsa da, sensitivitesi %50 veya daha az olan bir testin bu başarıyı sağlaması güçtür (307). Bu sınırlı duyarlılığa rağmen arka arkaya yapılan üç test de negatifse hastada servikal anormallik olma şansı %1'den azdır (303). Hakama, 35-64 yaş arası 1 kez negatif servikal smear sonrası taramanın koruyucu etkisini değerlendirdiğinde kümülatif insidanda azalma 1, 2, 3 yıl sonra %93, %92, %91 düzeyindeyken, 5 ve 10 yıl sonra bu oran %84 ve %64'e düşmüştür (304).

2003 yılında American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) üzerinde uzlaşmış servikal smear tarama kriterlerini duyurmuştur (305).

2.5.2. Sıvı Bazlı Teknikler (Thin Prep)

Amerikan Gıda ve İlaç Cemiyeti (FDA) tarafından 1996 yılında Thin Prep'in, 2003 yılında ise SurePath'in onaylanması sıvı bazlı sitolojik yöntemlerin klinik kullanıma girişini hızlandırmıştır. Sıvı bazlı sitolojinin, yüksek grade lezyonların saptanmasında % 16-100 artış ve yetersiz smear raporlanmasında düşüş sağladığı birçok çalışmada rapor edilmiştir (306,307).

Smear klasik tarzda alınır ve lam üzerine yaymak yerine, hücre örneği içeren smear çubuğu, özel bir koruyucu sıvı solüsyonu içine daldırılır. Laboratuvar'a gönderilen bu sıvı, orada kan, müküs ve debristen arındırılarak hücreler özel bir filtrede toplanır ve ince bir tabaka halinde lama yayılır. Hazırlanan preparat klasik Papanicolaou boyası ile boyanır.

Birçok çalışmada, bu teknik sayesinde daha çok tanısal servikal hücrenin toplandığı gösterilmiştir. Böylece daha iyi örnek hazırlanmakta ve daha iyi yorum yapılması sağlanmaktadır (303). Aynı zamanda HPV testi de gerektiğinde bu yöntemde yapılabilir (Refleks Test). Bunun yanında maliyeti yaklaşık 8-10 dolar daha yüksek, uygulaması da konvensiyonel yöntemle göre biraz daha zordur. Bu yöntemlerle LGSIL ve HGSIL in olgularında tanısal doğruluk oranının arttığı gösterilmiştir. Buna karşılık ASCUS da Thinprep in yararının henüz tartışılır olduğu yönünde bulgular mevcuttur.

2.5.3. Komputere Teknikler

Bu Teknikler Autopaps ve Papsnet olmak üzere iki sistem halinde toparlanmaktadır. Esas olarak baktığımızda bu sistemlerin mantığı hücrelerin tanıma yeteneğini veya anormal hücreleri tanıma yeteneğini arttırmaktan geçer. Günümüz fiyatlarına baktığımızda maliyeti yüksek olarak görülmektedir.

Otopaps primer tarama sistemi: Bu bilgisayarlı yeniden tarama sisteminde, yanlış negatif preparatların saptanmasına yardımcı olmayı amaçlamaktadır. Normal sınırlarda ve yeterli kabul edilen tüm smear'leri yeniden tarayarak anormal hücreler içerme olasılığı bulunan lamaları ayırır. Bunlar yeniden manuel olarak taranır (296).

PapsNet sistemi: (Bilgisayarlı yeniden tarama yöntemi) Bu yöntem, daha önce mikroskopla taranmış negatif sitolojik smearlerin bilgisayarlı bir mikroskop ve renkli kamera ile yeniden taranmasına dayanır. Sistemi sayesinde lam üzerindeki en kötü görünümlü 128 alan patoloğun yeniden incelemesine sunulmaktadır. Bu hücreler anormal olarak değerlendirilirse patolog, smear'i yeniden sınıflamaktadır (301).

Kompüterize tarama tekniklerinde konvensiyonel slayt yaymaları kullanılabilceği gibi aynı zamanda sıvı bazlı yayma sistemleri de birlikte kullanılabilir. Bu sistemlerle yanlış negatiflik oranları düşürülmekte fakat bu teknolojilerin biraz daha geliştirilmesi gerekmektedir.

2.5.4. Asetik Asit Testi (Via/Viam)

Özellikle Düşük Gelirli Ülkeler İçin Alternatif Tarama şeklidir. Yüksek dereceli lezyonlar için sensitivitesi ortalama % 76 dır. Spesifitesi daha düşüktür.

Transformasyon zonunda, skuamokolumnar bileşkeye yakın, iyi sınırlı, opak, asetowhite lezyonlar pozitif sonuç; asetowhite alan yokluğu, iyi tanımlanamayan, translusent asetowhite alan, polip, nabothi kisti negatif sonuç olarak değerlendirilir.

Avantajları; Sitolojiden daha basit ve daha kolay öğrenilebilir. Sitoloji ve HPV testlerinden daha ucuzdur. Tek seansta tanı ve tedavi sağlar.

Dezavantajları; Spesifitesi düşüktür (% 70-80). Pozitif test oranı yüksek (% 10-35), PPD düşük (% 10-30) tür. Bu nedenle gereksiz tedavi sorunu vardır. Yalnızca ekto-serviksteki lezyonların tanısı içindir.

VIA pozitif olgularda yönetim;

- Kolposkopi ve biopsi, kolposkopik bulgulara göre tedavi, histopatolojiyi retrospektif değerlendirme.
- Kolposkopi ve biopsi, histolojik bulgulara göre tedavi.
- Magnifiye vizüel inspeksiyon (VIAM) ve biopsi sonrası hemen kryoterapi ile tedavi.
- Kolposkopi ve buna göre tedavi.
- Hemen kryoterapi ile tedavi.

2.5.5. Spektroskopi

Basitçe servikal dokuya gönderilen ve geri gelen ışığın değerlendirilmesidir. Bu muayene sırasında asetik asit kullanılmaz. Yansıyan ışığa göre dokular, normal veya hastalıklı olarak değerlendirilir. Hastalıklı dokuda hemoglobin konsantrasyonu, mukozal kalınlaşma, kapiller perfüzyon, nükleer oran, gibi değişiklikler hastalıkla ilgili optik bir imza oluşturmaktadır. Sensitivite oranları % 62-92 arasındadır.

2.5.6. Spekuloskopi

Serviks yüzeyineasetik asit sürüldükten sonra özel bir ışık kaynağı kullanılarak dokusal değişiklikler değerlendirilir.

2.5.7. Servikografi

Serviks yüzeyineasetik asit sürüldükten sonra serviksin fotoğrafı çekilir. Daha sonra bu resim bir uzman tarafından yorumlanır. Sitolojiye nazaran sensitivitesi daha düşüktür.

2.5.8. Kolposkopi

Kolposkopi, “colpo” ve “scope” kelimelerinin birleşimidir. Anlam olarak vajen içine bakmaktır. Kolposkopi, Hans Hinselman tarafından 1925 yılında icat edilmiştir. 1960’ların sonu ve 1970’lerin başlarında bazı yazarların kolposkopi ile ilgili terminolojiyi genişleterek değiştirmeleri, bu arada eğitim amaçlı kurslar düzenlenip kolposkopinin asistanlık eğitimine sokulmasıyla, serviks, vagina, vulva ve perinedeki lezyonların tanı ve izlenmesinde kolposkopi, giderek artan ölçülerde kullanıma girmiştir (296). Kolposkopi’nin geç kullanıma girmesi nedeni sitolojide daha hızlı bir ilerlemenin olmasından kaynaklanır. Ancak sitoloji ve kolposkopi birbirine rakip değil, tam tersine birbirini tamamlayıcı yöntemlerdir. Kolposkopi, pozitif sitolojik bulguların değerlendirilmesinde kullanılır. Şüpheli alanlardan biyopsi yapılır. Sonuç olarak sitolojik, kolposkopik ve histolojik verilerin birlikte incelenmesiyle hastaya en doğru yaklaşım yapılmış olur. Her kolposkopik incelemenin amacı invazif serviks kanserinin dışlanması olmalıdır.

Kolposkop; parlak ışıkta, serviksin 6-4 G kez büyütülerek direkt incelenmesini sağlayan stereoskopik bir mikroskoptur. Servikal kolposkopinin amacı, transformasyon zonunda, serviks üzerinde ya da servikal kanalda bulunan lezyonların tanımlanması, prekanseröz serviks lezyonlarının varlığının araştırılması ve anormal paps-smear sonucunda biyopsi yapılacak alanların tespit edilmesidir.

Kolposkopi Endikasyonları

- İnvaziv kanser şüphesi olan smearler,
- Altı ay arayla 2 kez LSIL ya da hafif diskaryoz/sınırdaki değişikliklerin olduğu smear,
- HGSIL, orta veya şiddetli diskaryoz,

- Sürekli yetersiz smear,
- Smearde glandüler lezyonların varlığı; özellikle şiddetli glandüler atipi /adenokarsinoma in situ,
- Menstrüasyon arası ve cinsel ilişki sırasında olan kanamalar,
- Daha önce cerrahi veya radyoterapi ile tedavi edilmiş genital kanser hikayesi,
- Fetal hayatta DES'e maruz kalma,
- Kriyoterapi, elektrocerrahi veya lazer cerrahisi gibi yöntemlere yardımcı olmak amaçlı,
- Servikal faktörlere bağlı olduğu düşünülen infertilite tanısında,
- Himenin adli nedenlerle incelenmesi amaçlı,
- Sitolojik değerlendirme imkanı olmayan merkezlerde tanı koymak amaçlı kullanmak.

Kolposkopi Tekniği

Hasta rahat bir şekilde modifiye litotomi pozisyonunda yatırılıp dış genital sistem dikkatlice incelendikten sonra serviksi tamamiyle ortaya koyacak tarzda spekulum vaginaya yerleştirilir. Serviks dikkatlice gözlemlendikten sonra gerekiyorsa papsmear tekrarlanır. Bu aşamadan sonra teknik iki farklı ekole göre değişiklik gösterir. (296)

- 1) Klasik veya uzun kolposkopi tekniği
- 2) Tuzlusu (salin) tekniği

1. Klasik Kolposkopi:

En çok kullanılan tekniktir. Spekulum yerleştirildikten sonra üst vagina ve serviks giderek artan büyütme ile incelenir ve mukus fazlalığı yavaşça alınır. Bu ilk incelemeden sonra % 3-5'lik asetik asit solüsyonu servikse uygulanıp 60-90 saniye kadar beklenir ve serviks ve üst vagina tekrar incelenir. Anormal epitel gri-beyaz bir görünüm alır ki, aseto-beyaz (aceto-white) etki adı verilen bu durum, anormal epitel hücrelerinde artmış olan çekirdek içeriği ve proteinin asetik asit tarafından koagüle edilmesi ve bunun da daha altta yatan stromaya ışığın ulaşmasını engellemesiyle ortaya çıkar. Normal ve anormal alanları birbirinden keskin sınırlarla ayıran bu aseto-beyaz etki 30-40 saniye içinde ortadan kaybolduğundan birkaç kez asetik asit uygulanması gerekebilir.

Klasik teknikte, bu aşamadan sonra serviks ve üst vaginaya Schiller solüsyonu

(lugol solüsyonu; %1 iyot, %3 potasyum iyodür karışımı) uygulanır. Glikojenden zengin yassı hücreleri koyu renkte boyayan Schiller solüsyonu anormal epitelyum hücrelerini, glikojenden fakir oldukları için açık renkli alanlar olarak gösterecektir. Teste göre glikojen içermeyen ve dolayısı ile iyodu tutmayan bölgeler iyot negatif (Schiller Pozitif) olarak isimlendirilirken, iyotu tutan ve koyu kahverengi boyanan bölgeler iyot pozitif (Schiller negatif) olarak isimlendirilir.

2.Tuzlu Su Tekniği:

Klasik teknikte kullanılan asetik asit ve schiller solüsyonu subepitelyal damar yapısını gizlediği için Koller ve Kolstad tarafından geliştirilmiş bir tekniktir (296). Burada servikse asetik asit yerine tuzlu su tatbik edilmekte ve yeşil filtre kullanımıyla da kolposkopik olarak serviksin damarlarını detaylı bir şekilde görmek mümkün olmaktadır.

Kolposkopi Terminolojisi

Genel olarak kolposkopik görünüm ‘normal’, ‘anormal’, ‘başarısız’ olarak değerlendirilmektedir (313).

Normal kolposkopi bulguları:

- Orijinal skuamöz epitelyum
- Kolumnar epitelyum
- Transformasyon zonu

Orijinal skuamöz epitel, düz pembe renkli görülür. Kolumnar epitel tek sıra bir epiteldir. Endoservikse doğru uzanır. Yüzey irregülerdir, uzun stromal papsillalar ve derin yarıklar görülmektedir. Glikojen içermez ve asetik asit uygulanmasından sonra üzüm salkımı gibi bir görünüm alır. Transformasyon zonu, bu iki epitel arasındaki sınır olup, prekanseröz lezyonların en sık görüldüğü bölgedir. Transformasyon zonu damar bakımından oldukça zengindir ve damarlar regüler seyrederek. Bu düzenli damarlanmaya fizyolojik vaskülarizasyon adı verilir. Bu damarlanmayı kolposkopta yeşil ışık filtresi kullanarak net bir biçimde görmek mümkündür. Kolposkopik muayene ile, normal bir transformasyon zonu içinde silindirik epitel adacıkları, bez ağzları, naboth kistleri ve bunun üzerindeki fizyolojik damarlanma görülmelidir (308).

Anormal kolposkopi bulguları;

- Asetik-asit beyazı

- Lökoplaki
- Puntuasyon
- Mosaizm
- Atipik damarlanma şeklinde sıralanabilir

Asetik-Asit Beyazı: Normal kolposkopik muayene ile görülmeyip, serviks üzerinde %3'lük asetik asit emdirilmiş tamponun 60 saniye tutulmasından sonra yüzeyden kabarık veya düz beyaz lezyonlar şeklinde görülür.

Lökoplaki: Kolposkopik terminolojiye göre asetik-asit uygulanmasından önce görülen beyaz plaklardır ve epitel yüzeyindeki keratin tabakası sonucu oluşur. İmmatür skuamöz epitelyal hücrelerin, vagina ve serviksteki farklılaşması glikojene doğrudur. Servikovaginal mukozadaki, keratin üretimi anormaldir. HPV, CIN' in keratinizasyonu, karsinomanın keratinizasyonu, diafram, pesser veya tampon kullanımından doğan kronik travma ve radyoterapi gibi bir çok etken lökoplakiye neden olabilir. Lökoplaki, pamuklu aplikatör yoluyla tamamen temizlenebilen monilial enfeksiyonun beyaz plağıyla karıştırılmamalıdır. *Günümüzde en önemli lökoplaki sebebi HPV enfeksiyonudur.* Keratinleşmiş alandan biyopsi yapılmalıdır (308).

Puntuasyon: Normal epitel düzgün kapillerlerin oluşturduğu bir şebekeyi içerir. Ancak displastik süreç başladığında anormal damarlar ortaya çıkmaya başlar. Epitelin yüzeyine doğru çıkıntı yapan bu anormal vasküler demetlerin uçları, kolposkopik olarak nokta nokta bir görünüm alırlar ki buna puntuasyon adı verilir.

Mosaizm: Bir araya gelen aseto-beyaz epitel bloklarını dairesel veya çok yönlü çevreleyen terminal kapillere mozaik adı verilir. Anormal epitel blokları etrafında bir 'ağ' oluşturan bu damarlar, birçok puntuasyon gösteren terminal damarın birleşmesinden veya servikal salgı bezi ağızlarını çevreleyen damarlardan meydana gelebilir (308).

Atipik Damarlanma: Fizyolojik damarlanmanın tersine, damar yapıları irregüler olup simetritlerini kaybetmiştir. Kapiller damarlar çoğunlukla bir ağ oluşturarak yumak şeklinde görülür. Atipik damarlanma diğer anormal kolposkopik bulgu olan puntuasyon ve mosaizm ile birlikte bulunabilir.

Başarısız kolposkopi;

Transformasyon zonunun tam görülemediği durumlar için kullanılan bir

terimdir. Özellikle postmenopozal hastalarda transformasyon zonu iyice servikal kanalın içlerine doğru yükselmiş olabilir. Bu durumlarda servikal kanalı açmak için küçük endoservikal spekulumlar kullanılmalı, gene de zon görülemiyorsa kolposkopi yapılmış sayılmamalı ve bu hastalarda gerekirse endoservikal küretaj gibi daha agresif yöntemler uygulanmalıdır (314). (Tablo 2.7)

Tablo 2.7. Kolposkopi Terminolojisi

Kolposkopi	Kolposkopik Terim	Kolposkopik Görünüm
Normal Bulgular	Orijinal çok katlı yassı epitel	Pembe yüzeyle alan Asetik asit uygulamasından sonra değişiklik yok
	Orijinal silindirik epitel	Asetik uygulamasından sonra üzüme benzer yapılar
	Fizyolojik transformasyon zonu	Nabothi kistleri Düzenli damarlar
Anormal Bulgular	Asetik asit beyazı	Yüzeyden kabarık olmayan Yüzeyden kabarık
	Punktasyon	Kırmızı beneklenme Asetik asit uygulamasından sonra keskin sınırlı lezyon, iyot negatif alanlar vardır.
	Mozaizm	Mozaik görünümlü düzensiz damarlanma Asetik asit uygulamasından sonra belirginleşir, iyot negatif alanlar vardır.
	Lökoplaki	Asetik asit uygulamasından sonra beyaz, keskin sınırlı lezyon, iyot negatif alanlar vardır.
	İyot negatif epitel	İyot negatif alanlar bulunur.
	Atipik damarlanma	Asetik asit uygulamasından sonra beyazlaşma Spiral, düzensiz damarlanma
Şüpheli İnvaziv Kanser		Damar atipileri Ekzofitik veya endofitik görünüm Chorobak bulgusu
Diğer Bulgular	Beyaz olmayan mikropapsiller yüzey	
	Ekzofilik kondilom	
	İnflamasyon	Diffüz veya lokal ödemli ve kızamık epitelyum Damarlanmanın artması, iyot negatif alanlar
	Atrofi	Lokal veya diffüz kanama odakları, subepitelyal damarlar görülebilir.
	Ülser (Erozyon)	
Yetersiz Bulgular	Görülemeyen transformasyon zonu	Yaşlılarda, kriyocerrahi, stumdorf operasyonunda ve konizasyondan sonra görülür.
	Görülemeyen serviks	Histerektomiden sonra ve yaşlılarda görülür.

Kolposkopide Displastik Olmayan Bulgular

İnflamasyon epitelde anlamlı değişikliklere neden olur. Epitel tabakası içindeki, stromaya ait papsilla yüzeye doğru uzanır ve damarlar her zamankinden daha belirgin hale gelir. Stroma papsillaları içindeki basit kapiller yumaklar genellikle iki veya daha fazla ‘taç’ oluşturarak kolposkopik olarak çatala benzer bir görünüm ortaya çıkmasına yol açarlar. Bu ise punktuasyonu taklit edebilir, ancak gerçek punktuasyonda olay fokal olup sınırlar keskindir. İnflamatuvar değişiklikte ise sınırlar keskin olmayıp yaygın olma eğilimindedir (296).

Menopozda epitel ince olup transparandır. Böylece kapillerler daha belirgin olarak görülür. Aynı zamanda damarlar yüzeye daha yakın olduğundan epitel travmaya ve dolayısıyla kanamaya daha yatkındır. Bu kapiller şebeke punktuasyon görünümü oluşturmaya da çok değişik formlar gösterip anormal damar yapısıyla karıştırılabilir (296).

Granülasyon dokusunda benzer şekilde kan damarlarının yoğunluğunda ve neovaskülarizasyon sahalarının sayısında artış vardır, ancak burada dokunun asetik asite cevabı daha az yoğun olup sınırları daha az belirgindir. Tüm bu farklara rağmen displastik değişikliklerle granülasyon bazen yalnızca, alınacak bir biyopsi ile ayırt edilir (296).

Gebelik serviksin damar ve lenfatik ağında bir artışa yol açar ve stromada da eşlik eden bir ödem söz konusudur. Bu durumda, punktuasyondakine benzer bir görünümün ortaya çıkmasına yol açar, ancak inflamasyonda olduğu gibi burada da değişiklikler yaygın olup tüm vagina ve serviksi içine alacak tarzdadır (296).

Kondilomatöz değişiklikler kolposkopi yardımıyla kolaylıkla görülebilir ki; bunlar çoğunlukla displastik değişikliklerle ilişkili değildir. Kondilomatöz değişiklikler, damarsal değişikliklerin olmayışı ve lezyonların yukarı doğru çıkıntı yapmasıyla displazilerden ayrılırlar (296).

Kolposkopi en tecrübeli ellerde bile kesin tanı yöntemi değildir. Yukarıda bahsedilen anormal bulgular sadece biyopsi alınmasını gösteren şüpheli sahaları belirtme yönünden önemlidir. Onkoloji biliminde tek kesin tanı yolu histopatolojidir (309).

Kolposkopide görülen bir lezyon varsa mutlaka biyopsi yapılmalıdır. Eğer ortada gözle görülen lezyon yoksa ve sitoloji pozitif ise kolposkopi altında şüpheli

bölgeye biyopsi yapılır. Biyopside, alttaki stromadan 3-4 mm ve serviks epitelinden 5mm uzunluğunda doku bulunması gerekir.

Kolposkopik muayenenin yetersiz olduğu veya kolposkopik muayenede pozitif sitolojiyi izah edecek bir bulgu saptanmayan olgularda endoservikal küretaj (ECC) uygulanmaktadır. ECC ile servikal kanal içerisinde bir lezyon saptanması özellikle perimenopoz ve postmenopozdaki hastalarda daha sıktır. Gebelikte ECC kontrendikedir.

Kolposkopinin spesifitesi tarama için çok kötü, %30'un altındadır, yani yanlış pozitiflik oranı yüksektir. Sensitivite nisbeten iyidir, ama endoservikal kanal her zaman görülemediği için yanlış negatif oranı artabilir. Sitolojide yanlış negatiflik oranı % 20 (% 10-35) kadardır. İki yöntem birlikte kullanılacak olursa doğruluk oranı % 98.8' lere çıkacaktır (309).

2.5.9. Polarprobe

Bazı tümörlerde ve kanseröz lezyonlarda tümör hücrelerinin ve atipik hücrelerin dökülmesi yavaştır veya yoktur. 1990 lı yılların ortalarında Polarprobe tanımlamasıyla çıkan dokulara düşük voltajlı elektrik akımı vererek yansıyan elektrik akımını kaydedip, bu kayıt edilen elektriksel değişiklikle daha önce tanımlanan normal doku ve anormal doku değişikliklerini karşılaştırarak sonuca varmak isteyen bir sistemdir. Çalışma sayısı oldukça azdır. LGSIL, HGSIL ve kanser tanısallık doğruluk oranlarının özellikle yüksek lezyonlarda % 90 ları aştığı gösterilmiştir. Günümüzde pratik uygulanmayan ama geleceği olan bir araştırma yöntemi olarak görülmektedir.

2.5.10. HPV Testleri

İlk kez HPV için 1983 yılında dot-blod testi kullanıldıktan sonra 2000 yılında önemli bir yer buldu ve 2001 yılında rehberlere girdi. 2002 yılında da Amerikan kanser derneği bazı testler ile birlikte HPV testi kombinasyonunun taramada kullanılabileceğini ortaya koydu. FDA HPV DNA testini 31.03.2003 tarihinde serviks kanseri taraması için, Paps smear ile birlikte kullanımını onaylamıştır.

30 ve üzeri yaş grubu için konvansiyonel veya likid bazlı paps ile kombine edilerek 3 yıllık aralarla tarama yapılabilir. Çünkü; tarama intervallerinin açılmasına, maliyetin düşmesine katkıda bulunabilir (310).

Uzun zamandan beri yapılan değerlendirmeler bize iki temel sonucu göstermektedir. SIL durumunda yüksek riskli HPV virüsü negatif ise bu olgularda regresyon oranı ileri derecede yüksek olur. Yüksek riskli HPV tiplendirmesi negatif olarak saptanan ASCUS ve LGSIL olgularında yanlış negatiflik oranı çok yüksektir.

Paps smear ve HPV birlikte değerlendirildiğinde sensitivitenin % 96.9'lara çıktığı görülmektedir. HPV infeksiyonlarının çoğunda klinik belirti görülmez, latent veya subklinik infeksiyonlar yaygındır. Genital siğiller HPV ile infekte kişilerin sadece %1'inde gelişir. Bu sebeple HPV infeksiyonlarının tanısında en çok virolojik tanı metotları kullanılır. HPV hücre kültürü veya laboratuvar hayvanlarında üretilemez. Serolojik testler ise yeterince duyarlı değildir. İmmun cevapta major kapsid proteinlerine karşı gelişen antikolar uzun yıllar tespit edilir düzeyde kaldığından serolojik testler akut ve geçirilmiş infeksiyonları ayırt etmek için uygun değildir. HPV ile infekte hücrelerde immunohistokimyasal yöntemlerle HPV kapsid antijenlerinin tespiti ise sadece produktif HPV infeksiyonu varsa mümkündür, ancak yeterince sensitif değildir. Ayrıca sitolojik inceleme ile eksfoliyel hücre ve doku örneklerinde produktif HPV infeksiyonunun oluşturduğu yüzeyel tabakalarda sitoplazmik vakuolizasyon, perinükleer hale ve genellikle büyük, hiperkromatik nukleus ile karakterize "koilositozis" denilen sitopatik etki tespiti edilirse de sensitivitesi düşüktür. Bu sebeple HPV infeksiyonunun tanısı öncelikle viral nükleik asidin tespitine dayanır.

HPV infeksiyonlarının tanısında kullanılan moleküler tanı testleri üç grupta incelenebilir;

1- Hibridizasyon Testleri: İn Situ Hibridizasyon (ISH), Southern Blot Hibridizasyon (SBH), Dot Blot Hibridizasyon (DBH) ve Filter İn Situ Hibridizasyon (FISH).

2- Hybrid Capture (HC1,2): Hibrid yakalama testi olarak adlandırılır. Sinyal amplifikasyon kullanılarak yapılan direk DNA tespiti yapar.

3- Polymerase Chain Reaction (PCR): Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) olarak da adlandırılır. DNA amplifikasyon testidir. HPV'nin tanı metotları arasında PCR en sensitif metottur ve referans test olarak kabul edilir (311). PCR ve Hybrid Capture test tanıda en çok kullanılan testlerdir.

HPV DNA Testi İçin Örneklerin Toplanması;

HPV DNA analizi için en çok eksfoliyeye hücreler veya doku örnekleri kullanılır. Örneklerin kantitesi, kalitesi ve saklama şartları kadar DNA izolasyon prosedürleri de HPV testlerinin performansını etkiler. Servikal örneklerin alınmasında fazla miktarda hücrenin toplanmasını sağlayan özel fırçaların kullanımı tercih edilir. Bu fırçalarla ektoserviks, endoserviks ve özellikle servikal kanserin en çok görüldüğü ektoserviks ve endoserviksin birleştiği skuamo-kolumnar bileşke, transformasyon zondan hücreler alınır. Eküvyon kullanılması durumunda pamuk eküvyonlar yerine Dacron eküvyonlar (Baxter) tercih edilir. Çünkü epitel hücreleri pamuğa tutunarak hücre verimini azaltabilir. Toplanan hücreler PBS (Phosphate Buffer Solution) veya son yıllarda sitolojik inceleme için kullanılan sıvı besiyerine aktarılır. Bu besiyerleri metanol bazlı olup örnekteki DNA, RNA ve proteinleri korur. Böylece HPV DNA testlerinde sitolojik inceleme için toplanan örnek kullanılabilir. Her toplama şişesinde 10-15 ml sıvı bulunur. Sitolojik tanı için lama yayma yapılması işleminden sonra reziduel sıvı birçok moleküler testler için yeterlidir. *Sitoloji için elde edilen örneklerden yapılan HPV testi "refleks DNA" testi olarak bilinmektedir.* Hem virolojik hem de sitolojik analizin yapıldığı preserve Cyt (Cytcec Corp., Boxborough, MA), Universal Collection Medium (UGM, Digene Gaithersburg M) ve SurePath (Tri-Path) gibi ticari metanol bazlı sıvı besiyerleri hücrelerin transportu ve saklanması için kullanılır. Bu besiyerleri, transport sırasında hücrelerin stabilitesini koruduğu gibi uzun süreli (oda ısısında 1 ay) saklanmasına da olanak sağlar.

Konvansiyonel Hibridizasyon Testleri: HPV ile ilgili ilk çalışmalarda kullanılmıştır. FISH ile HPV DNA direk olarak hücre ve biyopsi örneklerinde tespit edilir. Bu metot intrasellüler HPV DNA ile spesifik problemlerin hibridizasyonuna dayanır. HPV DNA direk olarak hücre ve biyopsi örnekleri veya parafine gömülü dokuda tespit edilir. Bu testle virusun hücredeki lokalizasyonu; hücrede integre veya epizomal halde bulunup bulunmadığı tespit edilebilir. Southern Blot Hibridizasyon (SBH) testi PCR ile kıyaslandığında spesifitesi ve sensitivitesi daha düşüktür.

Alternatif olarak HPV DNA, dot blot hibridizasyon ve FISH ile tespit edilebilir. Hibridizasyon testleri PCR ile kıyaslandığında sensitivitesi çok düşüktür. Hibridizasyon testleri genellikle araştırma amacıyla kullanılır, yapılması yorucu ve zaman alıcıdır. Fazla sayıda örneğin incelenmesi için uygun değildir, rutin olarak kullanılmaz.

Sinyal amplifikasyon testi olan Hybrid Capture testinin Hybrid Capture I (HC I, Digene) ve Hybrid Capture II (HC II, Digene) olmak üzere iki tipi mevcuttur. Hybrid Capture Tube (HCT) test olarak da bilinen Hybrid Capture I (HC I) testi tüpte yapılan non-radyoaktif sinyal amplifikasyon metodudur. Bu test ile 5 LR HPV ve 9 HR HPV tipi tanınmaktadır. Eşik değeri 10pg HPV DNA/ml'dir. Hybrid Capture II (HC II) test, HC I testinin mikropalak formatında geliştirilmiş versiyonudur. hr HPV tip sayısı 13'e yükseltilmiştir. Eşik değeri 1 pg HPV DNA/ml'dir. HC II HPV testi HC I'e göre 10 kez daha yüksek sensitiveye sahiptir, spesifitesi de artmıştır. İki farklı RNA prob kokteyli deneyde ayrı ayrı kullanılır ve böylece test, örnekteki HPV DNA'nın sadece düşük veya yüksek risk grubunda olduğu hakkında bilgi verir, ancak spesifik HPV genotipi hakkında bilgi vermez.

HC II testi HPV tanısında FDA (Food and Drug Administration) onayı almış bir metottur. FDA, ilk kez Mart 1999'da ASC-US tanısı alan kadınların yönlendirilmesi için sitolojik teste yardımcı test olarak ve daha sonra 2003 yılında 30 yaş ve üstü kadınlarda servikal sitoloji taramasına yardımcı test olarak HC II testinin kullanımını kabul etmiştir.

Yeni geliştirilen prototip Hybrid Capture III (Digene) testi HC II testine benzer ve HPV DNA ile hibridize olan aynı RNA problemler kullanılır. Bu test için eşik değeri 0.6 RLU (0.6 pg HPV DNA/ml)'dir. Streptavidin ile kaplı mikropalakta DNA-RNA hibridlerini yakalamak için biotinli DNA oligonukleotidleri kullanıldığından HC II'ye göre CIN3 tespiti için biraz daha sensitif bulunmuştur, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir.

PCR en yaygın kullanılan hedef amplifikasyon metodudur. PCR, servikal hücrelerin HPV analizi için araştırmalarda çok yaygın kullanılmasına rağmen laboratuvarlar arası standardizasyon eksiktir. PCR testinin spesifitesi ve sensitivitesi PCR ürünlerinin uzunluğu, reaksiyonda kullanılan DNA polimerazın performansı, kullanılan primer seti ve reaksiyon şartları gibi faktörlere göre değişir.

PCR ile HPV DNA amplifikasyonu için çeşitli konsensus primer sistemleri mevcuttur. Konsensus PCR primerleri ile geniş spektrumda farklı HPV genotipleri amplifiye edilebilir. En çok seçilen protokol HPV genomunun son derece korunaklı bölgesi olan L1 genini hedef alan konsensus veya genel primerlerin kullanımınıdır ve hemen hemen bütün mukozal HPV tipleri tespit edilebilir. E1 bölgesinden genel

primerler ile birçok geniş spektrumlu diğer PCR primerleri bildirilmiştir, fakat bu primerler yaygın olarak kullanılmamaktadır.

HPV PCR Amplifikasyon Ürünlerinin Analizi;

Konsensus HPV primerleri ile yapılan PCR testi sonucu HPV pozitif bulunan örneklerde daha sonra spesifik HPV tipinin tespiti için Hibridizasyon, Dizi Analizi, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ve Type Specific-PCR (TS-PCR) gibi birçok test kullanılır. Ancak servikal mukozayı infekte eden 40'dan fazla HPV tipi bulunduğundan genotip tayini için her örneğe çok sayıda SBH hibridizasyon testi veya tip spesifik PCR testinin ayrı ayrı yapılması gereklidir. Bu işlem zaman alıcı ve yorucudur. Rutin uygulama için pratik değildir. Bu sebeple konsensus PCR ile amplifikasyonundan sonra spesifik HPV tiplerinin tespiti için mikroplakta hibridizasyon (PCR-ELISA), Line Probe Assay (LiPA), microarray/chip gibi alternatif genotipleme sistemleri geliştirilmiştir.

HSIL tespit etmede HPV DNA testinin sensitivitesi %84-100 oranında oldukça yüksek olmasına karşılık pozitif kestirim değeri (PPV) oldukça düşüktür (%15-23). Bu sebeple servikal kanser için risk altında olanların tanısı için HPV viral yük ölçümü, HR HPV E6/E7 mRNA tespiti, HPV DNA integrasyonun tespiti, çoklu HPV infeksiyonlarının varlığı, telomeraz aktivitesinin tespiti ve P16INK4a proteinin tespiti gibi testlerin kullanımı da araştırılmaktadır.

Çoklu HPV tipleri ile infeksiyon, viral persistens ve yüksek grade prekanseröz lezyonlara ilerleme ve servikal kanser gelişmesi için önemli bir gösterge olabilir. HPV PCR- ELISA ve HPV PCR-LiPA gibi testlerle çoklu infeksiyonların tanısı yapılabilir. Ancak testlerin sensitivitesinde farklılıklar görülür. Ancak birçok çalışma çoklu infeksiyonların yüksek grade lezyonlar için tek başına HR HPV infeksiyonuna göre daha fazla risk taşımadığını göstermiştir.

Prekanseroz lezyonların gelişmesi ve servikal kansere progresyon riskini değerlendirmek için yüksek risk HPV 16 ve 18 tiplerinin E6/E7 onkogen transkriptlerin reverse-transkriptaz PCR (RT-PCR) ile tespiti özellikle HR HPV ile infekte displazisi olmayan hastalar ve hafif displazisi olan (CIN 1) hastalarda faydalı olabilir. E6/E7 transkriptlerin tespitinin lezyonun ciddiyeti ile korele olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Ticari olarak mevcut RNA bazlı HPV testleri Pre Tect HPV-Proofer (Norchip AS, Norway), Nuclisens, Aptima olup RNA E6/E7 transkriptlerinin real-time

NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) ile amplifikasyonu esasına dayanır.

Yüksek HPV viral yükün servikal lezyonların gelişmesi ile korele olduğu bildirilmiştir (312). Düşük analitik sensitivitesi olan HC II, sadece yeteri kadar yüksek viral yükü tespit edebilir ki bunların klinik önemi olan infeksiyonları ayırt etmede rolü olabilir. Viral yük miktarı direk olarak örnekteki total hücre miktarına bağlıdır. Bu sebeple hücre yükünün ayarlanması gerekir. Real-time PCR (TaqMan) ile hücre içeriğinin ölçümü de yapılabildiğinden viral yük daha doğru tespit edilir. Yapılan çalışmalarda, HPV E6/E7 mRNA düzeylerinin genel olarak DNA saptama, viral yük ya da integrasyon tespitine göre klinikle daha uyumlu sonuçlar verdiği belirtilmektedir (313). Serviks kanseri olgularında da yüksek E6/E7 mRNA düzeylerinin kötü prognozla ilişkisi saptanmış, E6/E7 mRNA ekspresyonu ile viral yük arasında korelasyon olmadığı ortaya konulmuştur (314, 315). Tüm bu sonuçlar, HPV E6/E7 mRNA saptanmasına yönelik testlerin servikal lezyonun ağırlığı ile daha iyi korelasyon gösterdiğini ve serviks kanseri gelişiminin öngörülmesinde önemli potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir (316).

3. MATERYAL VE METOD

Ocak 2014 - Mart 2015 tarihleri arası İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekoloji Polikliniği'ne başvuran smear sonuçları ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL ve AGC olarak raporlanan ilk defa kolposkopi planlanan 21-65 yaşları arası 77 hasta dahil edilmiştir. Daha önce kolposkopi yapılmış veya anormal smear tanısıyla işlem yapılmış hastalar alınmadı.

Çalışmaya dahil edilen olgularda; smear sonucu, ad soyad, dosya numarası, telefon, yaş, gravite, parite, boy-kilo, doğum sayısı, ilk doğum yaşı, ilk cinsel ilişki yaşı, kaçınıcı eş olduğu, eşinin kaçınıcı eşi olduğu, ailede kanser öyküsü, öz geçmişi, OKS (oral kontraseptif) kullanım öyküsü, sigara kullanımı, eğitim düzeyi, ekonomik düzeyi sorgulandı. Kolposkopi bulguları, alınan örnek çeşitleri ve yerleri not edildi. Tüm bu veriler kayıt edildi.

Sonrasında kolposkopi yapılmak için uygun şekilde hazırlandılar. Jinekolojik masaya litotomi pozisyonunda yatırıldı. Muayene spekulumu kuru olarak vajene yerleştirildi. Işık kaynağı ile serviksin portio vaginalis kısmı net olarak görüldükten sonra digene HC2 DNA Collection Device (Qiagen, Almanya) HPV numune kitinden çıkan swap ile serviks internal os ve posterior forniksten uygun şekilde HPV DNA örnekleri alınıp transport mediumu içine kondu. Kolposkopi yapılırken Olympus OCS-3 kolposkop (Olympus ,America) kullanıldı. Kolposkopi aletiyle normal ışıkta eksternal servikal os 4 kat büyütülüp netleştirildi. Ardından serviksin portio vajinalis kısmı yaklaşık 5 cc % 3 lük asetik asite tabi tutulup 3 dk beklendikten sonra kolposkopla incelendi. Anormal kolposkopi bulgusu (Asetobeyaz, mozaik, punktuasyon, erezyon, lökoplaki, atipik damarlanma vb.) olan bölgelerden punç biyopsi makasıyla biyopsi örnekleri alındı. Bu örnekler biyopsi alınan yerin saat kadranı tarifine uygun şekilde numaralandıktan sonra içinde 50cc %10 formaldehit olan numune kaplarına alındı. Sonrasında HPV mRNA çalışılması için yine serviksten anormal kolposkopik

lezyonlara yakın bölgeden biyopsi alınıp yaklaşık 1 cc RNA Later Solusyonu içeren ependorf kaplarına alındı. Endikasyonu olan hastalara ECC ve P/C yapıldı. Bu alınan örneklerden serviks biyopsileri, ECC ve P/C materyalleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarına, transport medyumu içine alınan HPV örnekleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırıldı. Ve son olarak HPV E6/E7 gen ekspresyon çalışılması için alınan servikal biopsi örnekleri çalışılana kadar İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında RNA Later Solusyonu içerisinde -80 derecede muhafaza edildi. Bu alınan örneklerin çalışma şekli aşağıdaki sıra ile anlatılacaktır.

1. Servikal biyopsi örneklerinin çalışılması
2. HPV DNA tespit edilmesi ve HPV tiplerinin çalışılması
3. HPV pozitif örneklerden E6 ve E7 gen ekspresyonu bakılması

3.1. SERVİKAL BİYOPSİ ÖRNEKLERİNİN ÇALIŞILMASI

Servikal biyopsi örnekleri Displazi/CIN sınıflandırma sistemine göre patoloji uzmanı tarafından değerlendirildi ve raporlandı.

3.2. HPV DNA TESPİT EDİLMESİ VE HPV TİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Servikal örneklerin alınması ve saklanması: Servikal örneklerin alınması ve saklanmasında HC2 DNA Collection Device (Qiagen,Germany) transport medyumu kullanıldı.

Servikal örneklerinden nükleik asit izolasyonu: Transport medium saklanmış servikal örneklerden HPV DNA ekstraksiyonu için QIASymphony SP (Qiagen, Almanya) cihazı ve QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti (Qiagen, Almanya) kullanıldı.

HPV-DNA'nın tespit ve HPV tiplerinin belirlenmesi: Bu amaçla HPV sign® Q24 complete kiti, RotorGene ve PyroMark Q24 (Qiagen, Almanya) sistemleri ile kullanıldı. Bu sistem SybrGreen ile gerçekleştirilen real-time PCR (gerçek zamanlı

PZR) aşamasını (HPV'nin tespiti) ve PCR ürünlerinden pirosekanslama ile HPV tiplerinin belirlenmesi aşamalarını kapsar.

Real-time PCR aşamasında her bir amplifikasyon karışımını kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı (Tablo 3.1). Hazırlanan amplifikasyon karışımı, Tablo 3.2 verilen koşullar uygulanarak RotorGene cihazı ile Real-Time PCR gerçekleştirildi. Erime eğrisi analizinde pozitif tespit edilen örneklerde HPV tiplerinin belirlenebilmesi amacıyla HPV sign® Q24 complete kiti kullanılarak pirosekanslama ile PCR ürünlerinin dizi analizi yapıldı. Bu kit; yüksek riskli olan HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, ve -59 genotiplerini, orta riskli olan HPV-26, -30, -53, -66, -67, -68a, -70, -73, -82, ve -85 genotiplerini ve düşük riskli olan HPV-6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -55, -61, ve -69 genotiplerini tespit edebilmektedir. Bunlara ek olarak, yapılan çalışmalar bu sistemin; HPV-3, -7, -10, -13, -29, -32, -57, -72, -74, -75, -77, -81, -84, -86, -87, -89, -90, -91, -94, -97, -102, -106, -114, -117 ve -125 gibi daha farklı genotipleri de tanımlayabildiğini göstermiştir.

Tablo 3.1. Amplifikasyon Kontrolü İçin Gerekli Karışım

Amp-Mix	Her bir reaksiyon için ayıraç hacmi (µl)
AMP tampon	20,0
AMP nükleotit karışım	4,0
AMP dye	2,5
HPV sign® primerleri	1,5
AMP enzim	0,8
CLEAN enzimi	1,2
H2O	10,0
Toplam Hacim	40,0

Tablo 3.2. Rotor - Gene Talimatnamesi Sıcaklık Ayarları

Sıcaklık	37°C, 15 dakika boyunca
Denatürasyon	95°C, 10 dakika boyunca
50 Döngü	95°C, 30 saniye boyunca 51°C, 30 saniye boyunca
Erime Eğrisi Analizi	95 °C ila 65 °C sıcaklık, 1 ° C artışlarla Birinci aşamada erime öncesi süre: 90 saniye; Takip eden adımlar için süre: 5 saniye;

3.3. HPV POZİTİF ÖRNEKLERDE E6/E7 GEN EKSPRESYONUN TESPİT EDİLMESİ

HPV E6/E7 gen ekspresyon çalışılması için alınan ve RNA Later Solusyonu içerisinde -80 derecede muhafaza edilen servikal doku biyopsi örnekleri uygun şekilde çalışmaya hazır hale getirildi. Fragment analiz yöntemiyle yüksek riskli HPV tipleri saptanan hasta örneklerinde E6 ve E7 gen ekspresyonu varlığı NASBA yöntemiyle, NucliSENS® EasyQ Genetic Analyzer cihazı (Biomerieux, Fransa) kullanılarak araştırıldı. Bu amaçla aşağıdaki adımlar izlendi.

1. Cihazda örnekler 8'li gruplar halinde çalışıldı.
2. İlk olarak reaktif, reaktif dilüenti ile sulandırıldı ve içindeki sıvı homojen berrak olana kadar beklendi.
3. Bu arada enzim 170 µl enzim dilüenti ile sulandırıldı ve vortekslenmeden 30 dakika inkübe edildi.
4. Miks hazırlamak için tip 16 (kapak rengi pembe), tip 33-45 (kırmızı kapaklı) ve tip 18-31 (mavi kapaklı) için olan tüplere 16 µl KCl ve 14 µl NASBA® solüsyonu eklendi. Bu tüplere kendi kapak rengiyle aynı kapak renkli tüplerden 10 mikrolitre primer prob ilave edildi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S17	S25	S1	S9	S17	S25	S1	S9	S17	S25
B	S2	S10	S18	S26	S2	S10	S18	S26	S2	S10	S18	S26
C	S3	S11	S19	S27	S3	S11	S19	S27	S3	S11	S19	S27
D	S4	S12	S20	S28	S4	S12	S20	S28	S4	S12	S20	S28
E	S5	S13	S21	S29	S5	S13	S21	S29	S5	S13	S21	S29
F	S6	S14	S22	S30	S6	S14	S22	S30	S6	S14	S22	S30
G	S7	S15	S23		S7	S15	S23		S7	S15	S23	
H	S8	S16	S24		S8	S16	S24		S8	S16	S24	

HPV 16 HPV 18/31 HPV 33/45

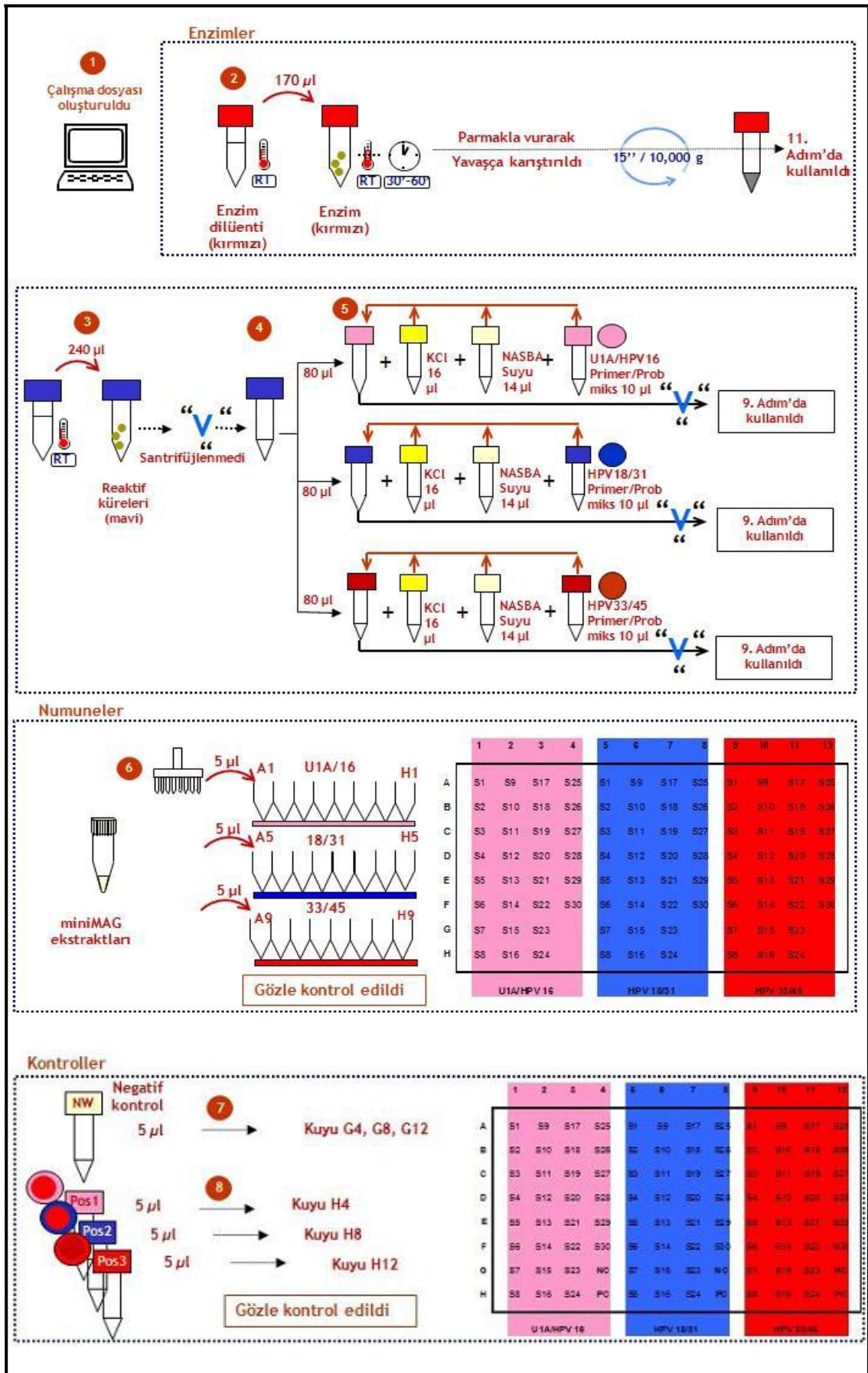
Şekil 3.1. Nuclisens EasyQ Genetic Analyzer Cihazı Çalışma Rakının Şematik Görünümü (S= Örnek).

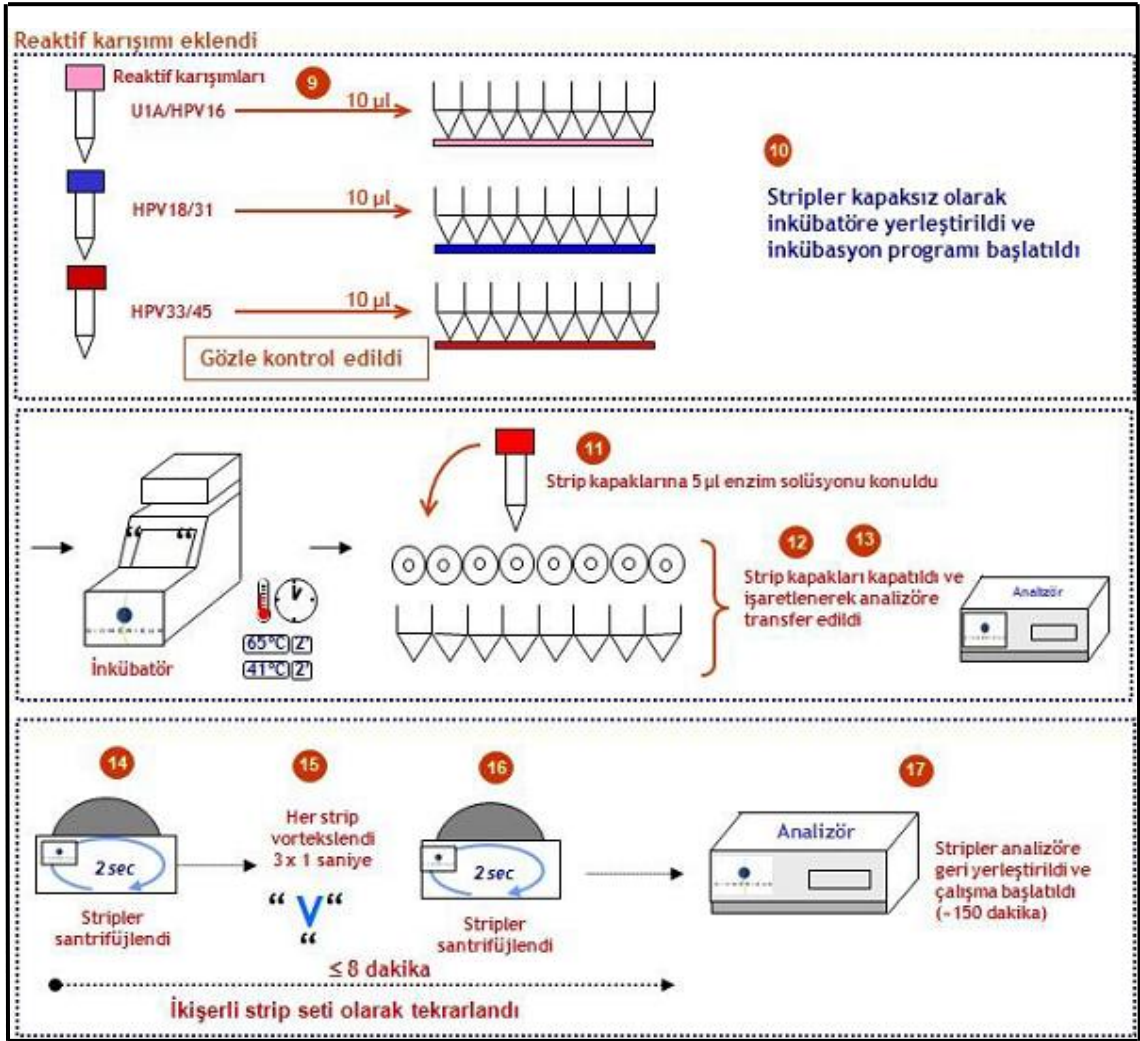
Yukarıdaki şekilde belirtildiği gibi örnekler için strip tüpler tüp port (rack=rak)'larına 8'er örnek için ve 8'er kontrol için olmak üzere yerleştirildi (Şekil 3.1). Bu işlem, pembe, mavi ve kırmızı alanlar için ayrı ayrı üç kez yapıldı. Kontrol için yerleştirilen tüplerin sadece son 2'ser tanesi kontrol için kullanıldı (ilki negatif, ikincisi pozitif kontrol olmak üzere). Tüm tiplerin negatif kontrolleri için ayrılan kuyucuklara ise 5 µl NASBA® solüsyonundan ilave edildi.

Ekstraksiyon ürünleri vorteksenip 5'er µl pembe, mavi ve kırmızı tüplere dağıtıldı. Daha önce hazırlanmış olan pembe, mavi ve kırmızı mikslerin içine önceden dilüe edilmiş reajenden 80'er µl eklenip vortekslendi. Boş bir eppendorf tüpüne 195 µl NASBA® solüsyonu ve bunun da üzerine daha önce sulandırılmış olan pozitif kontrolden 5'er µl pozitif kontrol kuyucuklarına konuldu. Sonra tüm örneklerle hazırlanmış olan pembe, mavi ve kırmızı mikslere renklerine uygun gelecek şekilde 10'ar µl dağıtıldı. Benzer şekilde pozitif ve negatif kontrol kuyucuklarına da aynı miktar dağıtıldı.

Kitin içerisinde bulunan enzimden konulmadan önce enzim 1000 g'de 15 saniye santrifüj (spin) edildi. Mikslerin dağıtıldığı kuyucuklar 65 °C'de 2 dakika ve 41 °C'de 2 dakika olacak şekilde inkübatörde (NucliSens® incubator Biomerieux, Fransa) bekletildi. Bu arada strip kuyucukların kapaklarına 5'er µl enzim dağıtıldı.

İnkübasyon sonunda strip kuyucukların kapakları kapatılıp mini santrifüjde (VWR Mini Star Silverline Mini Centrifüje, Kore) 2 saniye santrifüj edildi. Sonra örnekler E6, E7 onkoprotein analiz cihazına yerleştirilerek E6 ve E7 gen ekspresyonunun varlığı incelendi (Şekil 3.2).





Şekil 3.2 E6/E7 Onkoprotein Çalışma Prosedürü (Biomerieux, Fransa)

3.4. İSTATİKSEL ANALİZ

Araştırma verilerimizin istatistiksel değerlendirilmelerinde SPSS(Statistical Package For Social Sciences) for Windows Version 22.0 yazılımı kullanıldı. Nicel değişkenlerin tanımlanmasında Ortalama(ort.) \pm Standart Sapma (SS) ile nitel değişkenlerin tanımlanması ise sayı ve yüzde olarak yapıldı. Verilerimizin normal dağılım ölçütleri hesaplanırken *Kolmogorov Smirnov* ve *Shapiro-Wilks* testleri kullanılmıştır. İstatistiksel değerlendirmede *Pearson Ki-Kare* ve *Fisherin Kesin Ki-Kare* Analizi kullanıldı. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Çalışmamıza Ocak 2014 - Mart 2015 tarihleri arası İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekoloji Polikliniği'ne başvuran smear sonuçları ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL ve AGC olarak raporlanan ve ilk defa kolposkopi planlanan 21-65 yaşları arası 77 hasta dahil edilmiştir. Daha önce kolposkopi yapılmış veya anormal smear tanısıyla işlem yapılmış hastalar alınmamıştır. Olguların demografik özellikleri Tablo 4.1'de özetlenmektedir.

Çalışmaya alınan 77 olgunun yaş ortalaması $43,09 \pm 10,36$ 'dır. Olguların 20 tanesi (%26) 35 yaş ve altında iken, 57 olgu (%74) 35 yaşından büyüktür. Gebelik sayısı ortalaması $4 \pm 2,61$ 'dir. Doğum sayısı ortalaması $2.74 \pm 1,93$ 'tür. Hiç doğum yapmayanların sayısı 5 (%6,5) iken, 3'ten az doğum yapanların sayısı 34 (%44,2), 3 ve üzerinde doğum yapanların sayısı ise 38(%49,4)' tür. İlk cinsel ilişki yaşı 20 yaş öncesi 45 (%58,4),20 yaş sonrası 32 (%41,6) dir. Olgularımızın 72 (%93,5) 'i tek eş ile cinsel birliktelik yaşadığı görülürken, 2.evlilik yapan 5 (%6,5) olgu vardı.

Eğitim durumu incelendiğinde olguların 62 (%80,5) tanesi okur-yazar değil veya ilköğretim mezunu, 9 (%11,7) tanesi lise mezunu, üniversite mezunu 6 (%7,8) tanesi olduğu görülmektedir. Olguların gelir düzeyi sorgulandığında 19 (%24,7) düşük, 52 (%67,5) orta, 6 (%7,8) yüksek gelir düzeyine sahip oldukları tespit edildi. Olguların 16 (%20,8)'inin OKS kullandığı görülmektedir. Anormal sitolojisi olan olgularımızın 20 (%26)'sı sigara içmektedir. 29 (%37,7) olguda ailesinde herhangi bir kanser öyküsü bulunmaktadır.

Tablo 4.1 Anormal Smear Sonucu Olan Hastaların Demografik Özellikleri

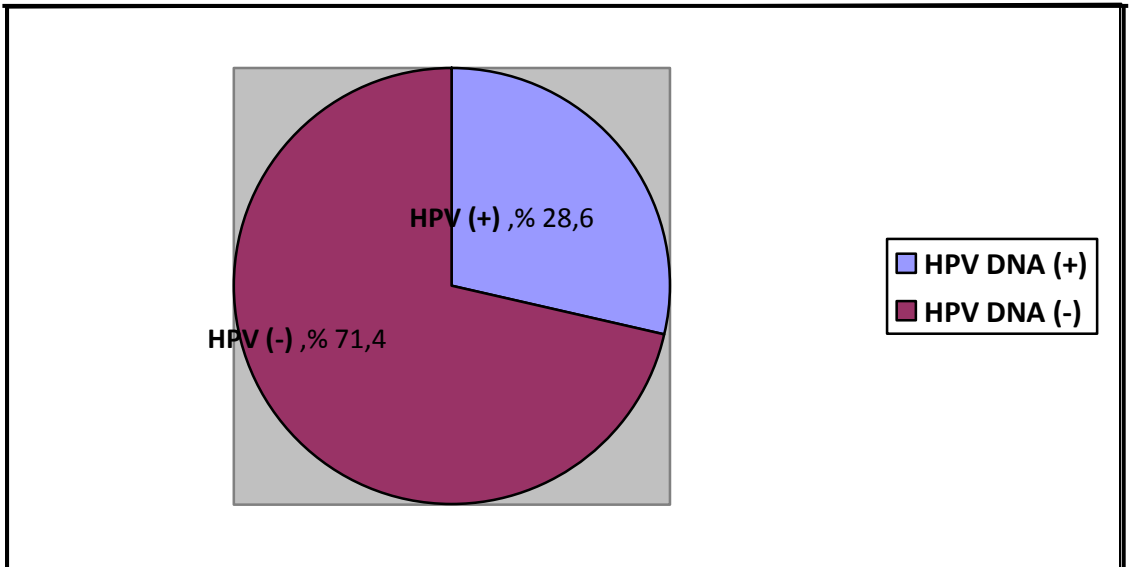
Özellikler	Ortalama, Sayı, Yüzde
Yaş (n (%))	
< 35 yaş	20 (%26)
> 35 yaş	57 (%74)
Yaş ortalaması (ort. ± SS)	43,09±10,36
Gebelik sayısı (ort. ± SS)	4±2,61
Doğum sayısı (n ,%)	
Hiç doğum yapmayan	5(%6,5)
3'ten az	34(%44,2)
3'ten fazla	38(%49,4)
Doğum sayısı ortalaması (ort. ± SS)	2.74±1,93
İlk cinsel ilişki yaşı (n ,%)	
20 yaş öncesi	45(%58,4)
20 yaş sonrası	32(%41,6)
Cinsel partner sayıları (n ,%)	
Tek Partner	72(%93,5)
İki Partner	5(%6,5)
Oral kontraseptif (n, %)	
OKS kullanan	16(%20,8)
OKS kullanmayan	61(%79,2)
Sigara öyküsü (n, %)	
İçen	57(%74)
İçmeyen	20(%26)
Eğitim durumu (n, %)	
Okur-yazar değil veya ilköretim	62(%80,5)
Ortaöğretim	9(%11,7)
Üniversite	6(%7,8)
Sosyo-ekonomik düzey (n, %)	
Düşük	19(%24,7)
Orta	52(%67,5)
Yüksek	6(%7,8)
Ailede kanser öyküsü (n, %)	
Pozitif	29(%37,7)
Negatif	48(%62,3)

Çalışmadaki 77 olgunun anormal smear sonuçlarının dağılımı Tablo 4.2’da gösterilmektedir. Buna göre olgularımızdaki anormal smear sonuçlarının dağılımı; 46 olgu (%59,7) ASC-US, 8 olgu (%10,4) ASC-H, 15 olgu (%19,5) LGSIL, 5 olgu (%6,5) HGSIL ve 3 olgu (%3,9) ise AGC şeklinde bulundu.

Tablo 4.2 Anormal Smear Sonuçlarının Dağılımı

Anormal Smear Sonucu	n(%)
▪ ASCUS	46 (%59,7)
▪ ASC-H	8 (%10,4)
▪ LGSIL	15 (%19,5)
▪ HGSIL	5 (%6,5)
▪ AGC	3 (%3,9)
Toplam	77 (%100)

Anormal sitolojisi olan 77 (%100) olguda HPV DNA çalıştığımızda 22 (%28,6) olguda HPV DNA pozitif, 55 (%71,4) olguda HPV DNA negatif bulundu. (Şekil 4. 1)



Şekil 4.1. HPV DNA Pozitiflik ve Negatiflik Oranı

HPV DNA pozitif olguların tip dağılımı; Tip-16; 13(%59,9) olguda, Tip-18; 2(%9,09) olguda, Tip-33; 1 (%4,54) olguda, Tip-35; 1(%4,54) olguda, Tip-39 ; 1(%4,54) olguda, Tip-67; 2(%9,09) olguda, Tip-73; 1(%4,54) olguda, Tip-83; 1(%4,54) olguda pozitif bulundu. (Tablo 4.3)

Tablo 4.3 HPV DNA Pozitif Olguların Tip Dağılımı

HPV TİP	n(%)
▪ Tip-16	12(%54,54)
▪ Tip-18	2(%9,09)
▪ Tip-33	1 (%4,54)
▪ Tip-35	1(%4,54)
▪ Tip-39	1(%4,54)
▪ Tip-67	2(%9,09)
▪ Tip-73	1(%4,54)
▪ Tip-83	1(%4,54)
▪ Tip-16 + Tip-39	1(%4,54)
Toplam	22 (%100)

Anormal smear sonucuna göre HPV DNA pozitiflik oranları; 46 ASCUS’lu olgunun 8’inde (%17,39) ,8 ASC-H’li olgunun 4’ünde (%50), 15 LGSİL’li olgunun 8’inde(%53,33), 5 HGSİL’li olgunun 2’sinde (%40) HPV DNA pozitif olarak bulunurken, 3 AGC li olgunun hiç birinde (%0) HPV DNA saptanmamıştır. (Tablo 4.4)

Tablo 4.4 Anormal Smear Sonucuna Göre HPV DNA Pozitiflik Oranları

Anormal Smear Sonucu	HPV DNA Pozitif n(%)	HPV DNA Negatif n(%)
➤ ASCUS (n:46)	8(%17,9)	38(%82,1)
➤ ASC-H (n:8)	4(%50)	4(%50)
➤ <u>LGSİL(n:15)</u>	<u>8(%53,33)</u>	<u>7(%46,67)</u>
➤ HGSİL(n:5)	2(%40)	3(%60)
➤ AGC(n:3)	0(%0)	3(%100)
Toplam(n:77)(%100)	22(%28,58)	55(%71,42)

77 anormal smear sonucu olan olguların HPV DNA pozitif olanlarında (22 olgu) Tip dağılımı yaptığımızda Tablo 4.5 'teki gibi sıralanmaktadır.

Tablo 4.5 Anormal Smear Sonucuna Göre HPV DNA(+) Tip Dağılımı

HPV DNA Tipleri	ASCUS n(%)	ASCH n(%)	LGSİL n(%)	HGSİL n(%)	AGC n(%)	Toplam n(%)
HPV DNA Tip-16	4(%8,6)	3(37,5)	4(26,6)	1(%20)	0	12(%54,54)
HPV DNA Tip-18	1(%2,1)	0	0	1(%20)	0	2(%9,09)
HPV DNA Tip-33	0	0	1(%6,6)	0	0	1(%4,54)
HPV DNA Tip-35	0	1(%12,5)	0	0	0	1(%4,54)
HPV DNA Tip-39	0	0	1(%6,6)	0	0	1(%4,54)
HPV DNA Tip-67	1(%2,1)	0	1(%6,6)	0	0	2(%9,09)
HPV DNA Tip-73	0	0	1(%6,6)	0	0	1(%4,54)
HPV DNA Tip-83	1(%2,1)	0	0	0	0	1(%4,54)
HPV DNA Tip-16 + Tip-39	1(%2,1)	0	0	0	0	1(%4,54)
Toplam HPV DNA pozitifliği	8(%17,9)	4(%50)	8(%53,33)	2(%40)	0(%0)	22(%100)

HPV DNA pozitif 22 olguda HPV E6/E7 mRNA çalışılmış olup sonuçlar aşağıdaki gibidir. (Tablo 4.6) Bu HPV DNA pozitif olgulardan; 8 olgu ASCUS olup 3 (%37,5) olguda E6/E7 mRNA pozitif bulunmuştur. 4 olgu ASC-H olup 3 (%75) olguda E6/E7 mRNA pozitif bulunmuştur. 8 olgu LGSİL olup 4 (%50) olguda E6/E7 mRNA pozitif bulunmuştur. 2 olgu HGSİL olup 1 (%50) olguda E6/E7 mRNA pozitif bulunmuştur.

Tablo 4.6 HPV DNA Pozitif Hastalarda HPV E6/E7 mRNA Dağılımı

HPV E6/E7 mRNA tipleri	HPV DNA(+) ASCUS	HPV DNA(+) ASCH	HPV DNA(+) LGSİL	HPV DNA(+) HGSİL	Toplam HPV DNA(+)
HPV mRNA Tip-16	2 (%25)	1(%25)	3(%37,5)	0	6(%27,27)
HPV mRNA Tip-18	1(%12,5)	0	0	0	1(%4,54)
HPV mRNA Tip-31	0	0	0	0	0
HPV mRNA Tip-33	0	0	1(%12,5)	0	1(%4,54)
HPV mRNA Tip-45	0	0	0	0	0
HPV mRNA Tip-16 + mRNA Tip-18	0	1(%25)	0	1(%50)	2(%9,09)
HPV mRNA Tip-16 + mRNA Tip-33	0	1(%25)	0	0	1(%4,54)
Toplam HPV E6/E7 mRNA Pozitifliği	3(%37,5)	<u>3(%75)</u>	<u>4(%50)</u>	<u>1(%50)</u>	11(%50)

Anormal sitoloji sonuçlarına göre en sık HPV E6/E7 mRNA pozitifliği %75 oranında ASC-H 'de görülmüştür. Anormal sitoloji sonucu LGSİL olan olgularda HPV E6/E7 mRNA pozitifliği %50 oranında görülmüştür. Anormal sitoloji sonucu HGSİL olan olgularda HPV E6/E7 mRNA pozitifliği %50 oranında görülmüştür. Anormal sitoloji sonucu ASCUS olan olgularda HPV E6/E7 mRNA pozitifliği %37,5 oranında görülmüştür.

HPV DNA Tip-16 pozitif olgulardaki servikal biyopsi sonuçlarını aşağıdaki tablodaki gibidir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7 HPV DNA Tip-16 Pozitif Olgulardaki Servikal Biyopsi Sonuçları

HPV DNA Tip-16 Pozitif	Servikal Biyopsi Sonuçları	n(%)
	Normal	8(%61,5)
	CIN1	1(%7,7)
	CIN2	1(%7,7)
	CIN3	3(%23,1)
	Toplam	13(%100)

Anormal smear sonucu ASCUS olan olguların servikal biyopsi sonuçları aşağıdaki görülmektedir (Tablo 4. 8).

Tablo 4.8 ASCUS Olan Olgularda Servikal Biyopsi Sonuçları

ASCUS	Servikal Biyopsi Sonuçları	n(%)
	Normal	41(%89,1)
	CIN1	2(%4,3)
	CIN2	2(%4,3)
	CIN3	1(%2,2)
	Toplam	46(%100)

Anormal smear sonucu ASCH olan olguların servikal biyopsi sonuçları aşağıdaki görülmektedir (Tablo 4. 9).

Tablo 4.9 ASCH Olan Olgularda Servikal Biyopsi Sonuçları

ASCH	Servikal Biyopsi Sonuçları	n(%)
	Normal	7(%87,5)
	CIN1	0(%0)
	CIN2	1(%12,5)
	CIN3	0(%0)
	Toplam	8(%100)

Anormal smear sonucu LGSİL olan olgularda servikal biyopsi sonuçları aşağıdaki görülmektedir. (Tablo 4. 10)

Tablo 4.10 LGSİL Olan Olgularda Servikal Biyopsi Sonuçları

LGSİL	Servikal Biyopsi Sonuçları	n(%)
	Normal	6(%40)
	CIN1	4(%26,7)
	CIN2	2(%13,3)
	CIN3	3(%20)
	Toplam	15(%100)

Anormal smear sonucu HGSİL olan olgularda servikal biyopsi aşağıdaki görülmektedir. (Tablo 4. 11)

Tablo 4.11. HGSİL Olan Olgularda Servikal Biyopsi Sonuçları

HGSİL	Servikal Biyopsi Sonuçları	n(%)
	Normal	3(%60)
	CIN1	0(%0)
	CIN2	1(%20)
	CIN3	1(%20)
	Toplam	5(%100)

Servikal biyopsi sonuçlarını HPV DNA sonuçlarıyla kıyasladığımızda sonuçlar aşağıdaki gibidir. (Tablo 4.12)

Tablo 4.12. Servikal Biyopsi Sonuçlarının HPV DNA Sonuçları

		Servikal Biyopsi Sonuçları				Toplam
		Normal	CIN1	CIN2	CIN3	
HPV DNA	Negatif	48(%87,27)	3(%5,45)	2(%3,63)	2(%3,63)	55(%100)
	Pozitif	12(%54,54)	3(%13,63)	4(%18,18)	3(%13,63)	22(%100)
Toplam		60(%77,92)	6(%7,79)	6(%7,79)	5(%6,49)	77(%100)

Servikal biyopsi sonuçlarını HPV DNA sonuçlarıyla normal ve anormal (CIN1,CIN2,CIN3) olarak sınıflandırdığımızda sonuçlar aşağıdaki gibidir. (Tablo 4.13)

Tablo 4.13. Servikal Biyopsi Sonuçlarını Normal - Anormal Olarak Sınıfladığımızda HPV DNA sonuçları

		Servikal Biyopsi Sonuçları		Toplam
		Normal	Anormal (CIN1,CIN2,CIN3)	
HPV DNA	Negatif	48(%87,2)	7(%12,8)	55(%100)
	Pozitif	12(%54,5)	10(%45,5)	22(%100)
Toplam		60(%77,9)	17(22,1)	77(%100)

($p=0,002$)

Servikal biyopsi sonuçlarını HPV E6/E7 mRNA sonuçlarıyla karşılaştırıldığında sonuçlar aşağıdaki gibidir (Tablo 4.14.).

Tablo 4.14. Servikal Biyopsi Sonuçlarının E6/E7 mRNA Sonuçları

		Servikal Biyopsi Sonuçları				Toplam
		Normal	CIN1	CIN2	CIN3	
E6/E7 mRNA	Negatif	54(%81,8)	5(%7,6)	5(%7,6)	2(%3)	66(%100)
	Pozitif	6(%54)	1(%9)	1(%9)	3(%27)	11(%100)
Toplam		60(%78)	6(%7,8)	6(%7,8)	5(%6,5)	77(%100)

Servikal biyopsi sonuçlarını HPV E6/E7 mRNA sonuçlarıyla normal ve anormal (CİN1,CİN2,CİN3) olarak kıyasladığımızda sonuçlar aşağıdaki gibidir. (Tablo 4.15)

Tablo 4.15. Servikal Biyopsi Sonuçlarını Normal-Anormal Olarak Sınıfladığımızda HPV DNA Sonuçları

		Servikal Biyopsi Sonuçları		Toplam
		Normal	Anormal (CİN1,CİN2,CİN3)	
E6/E7 mRNA	Negatif	54 (%81,8)	12(% 18,2)	66 (%100)
	Pozitif	6(%54,5)	5(%45,5)	11(%100)
Toplam		60(%77,9)	17(22,1)	77(%100)

($p=0,043$)

HPV DNA ve HPV mRNA ikiside pozitif olan gruplar servikal biyopsi sonucu CİN3 olanları kıyasladığımızda sonuçlar aşağıdaki gibidir. (Tablo 4.16)

Tablo 4.16. HPV DNA ve HPV mRNA İkiside Pozitif Olan Grupların CİN3 Yönünden Karşılaştırması

		Servikal Biyopsi Sonuçları		Toplam
		CİN3(+)	CİN3 (-)	
HPV DNA Pozitif		3(%13,63)	19(%86,4)	22(%100)
E6/E7 mRNA Pozitif		3(%27)	8(%73)	11(%100)
Toplam		6(%18,1)	27(%81,9)	33(100)

($p=0,375$)

HPV DNA ve E6/E7 mRNA çapraz olarak karşılaştırdığımızda aşağıdaki sonuçlar karşımıza çıkmaktadır. (Tablo. 4.17)

Tablo 4.17 HPV DNA ve E6/E7 mRNA Çapraz Tablosu

HPV DNA ve E6/E7 mRNA karşılaştırması				
		E6/E7 mRNA		Toplam n(%)
		Pozitif n(%)	Negatif n(%)	
HPV DNA	Negatif n(%)	0(%0)	55(%100)	55(%100)
	Pozitif n(%)	11(%50)	11(%50)	22(%100)
Toplam n(%)		11(%14,3)	66(%85,7)	77(%100)

($p<0,001$)

5.TARTIŞMA

Serviks kanseri dünya genelinde; kadınlarda görülme sıklığı açısından ikinci, kanserin neden olduğu ölümlerde ise üçüncü sırayı almaktadır (317). Serviks kanseri human papilloma virus (HPV)'un onkojenik tiplerinin uzun süren enfeksiyonu sonucu ortaya çıkar. Tüm serviks kanserleri %99,7 HPV DNA'sı içerir (318). Bu nedenle preinvaziv lezyonların servikal smear tarama programları ile erken dönemde yakalanması son derece önemlidir. Ancak başarılı sonuçlara rağmen servikal sitolojinin sensitivitesinin düşük olmasından sitoloji ile birlikte HPV enfeksiyonunun varlığının saptanması ve HPV tipinin tespiti yaklaşımı gündeme gelmiştir (319, 320). Serviks kanseri için bazı faktörler önemli bir risk oluşturmaktadır. Servikal kanserin risk faktörleri arasında; ilk cinsel ilişki yaşının küçük olması, seksüel partner sayısının fazlalığı, yüksek parite, ırk, sigara içimi, düşük sosyoekonomik düzey ve oral kontraseptif (OKS) kullanımı önemli yer tutmaktadır (321). Bugün servikal kanser gelişimi için HPV'nin mutlaka var olması gerektiği, diğer risk faktörlerinin ya virüsle karşılaşma oranlarını artırdığı ya da viral persistansın karsinojenik süreci hızlandırdığı için önemli olduğu üzerinde durulmaktadır (322). Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Daire Başkanlığı tarafından serviks kanseri taraması ulusal standartları belirlenmiş olup özellikle Kanser Erken Teşhis-Tedavi ve Eğitim Merkezinde (KETEM) uygulanmaya başlanmıştır (323). Günümüzde yüksek riskli belirli HPV tiplerine karşı koruma sağlayabilen aşuların geliştirilmesi ve ülkemizde de kullanılmaya başlanması bölgesel HPV sıklığı ve tip dağılımı verilerinin önemini artırmıştır. Ancak ülkemizde HPV sıklığı ve tipleri ile ilgili çalışmalar sınırlı kapsam ve sayıdadır (324, 325).

Serviks kanseri gibi oldukça mortal seyreden bir jinekolojik kanserin etyopatogenezini daha iyi anlamak gerekmektedir. Bu konuda geliştirilen birçok tarama yöntemi kanseri önlemede bir çığır açmıştır. Bir pap's taraması bile serviks kanserine bağlı mortaliteyi ciddi ölçüde azaltmıştır. Ardında geliştirilen diğer yöntemler olan

kolposkopi, HPV DNA ve diğer yöntemler geliştirilmesi serviks kanserinin erken tanısında oldukça önemli katkılar sağlamıştır. HPV subtiplerinin belirlenip risk grubuna göre ileri incelemeler yapılması artık rutin kullanıma girmiştir. İşte bu yüksek veya düşük riskli HPV subgruplarının onkogeneizde temel rol oynayan E6 ve E7 gen ekspresyonunu yapıcı etkilerinin belirlenmesi hem daha güvenilir bir tarama yöntemi olarak karşımıza çıkmakta hem de gereksiz veya gereğinden fazla müdahaleden hastaların korumasını umut etmekteyiz. Bu tez araştırmasının amacı farklı HPV alttiplerinin yapmış olduğu E6 ve E7 kanser yapıcı protein tespiti ve servikal displaziler (PAPS anormallikleri) üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Amacımız yüksek riskli HPV subtiplerindeki E6 ve E7 gen ekspresyonu yapıcı etkilerinin servikal displazi üzerindeki etkilerini araştırmak ve ayrıca bu ekspresyonun servikal displazi şiddeti üzerine etkisini belirlemektir.

HPV sıklığını normal kadınlarda araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda HPV DNA saptanmasına dayalı test yöntemleri kullanılmıştır. HPV sıklığı toplumun çeşitli kesimlerinde farklılık gösterebilmektedir. Ülkemizde HPV prevalansının araştırıldığı ve HPV DNA testleri ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu çalışmaların çoğu toplum taraması şeklinde olmayıp hastaneye gelen hastalar üzerinde yapılan çalışmalardır. Bu çalışmalar belirli bir popülasyonu içermekte olup oldukça yetersizdir. Bu nedenle HPV oranları %2-80 arasında değişmektedir (326, 327). Ülkemize ait HPV tip dağılımı verileri incelendiğinde ise, en sık tip 16 (%37.8-54.5)'ya rastlandığı, bunu tip 18 (%9.2-45)'in izlediği görülmektedir (328, 329, 330). Tüm dünyada normal veya atipi izlenen örneklerde en sık rastlanılan tipin genellikle tip 16 olduğu; coğrafi bölgeler arasındaki farklılıkların HPV-16 sıklığında ve bunu izleyen tiplerin sıralamasında olduğu vurgulanmaktadır (331, 332).

Dünyada artık servikal kanserlerin %100 nünde HPV pozitif olarak bulunmakta ve servikal kanserlerin en önemli nedeni olduğu bilinmektedir. Özellikle HPV tiplerinden Tip-16 ve Tip-18 servikal kanserlerdeki HPV pozitifliğinin %70 ni oluşturmaktadır. %20 lik kalan kısımda da 31, 33, 35, 45, 52 and 58 tipleri oluşturmaktadır. Ayrıca HPV Tip-16 ve Tip-18 yüksek dereceli servikal lezyonlarda %41-67 oranında, düşük dereceli servikal lezyonlarda %16-32 oranında bulunmaktadır (333).

Bizim çalışmamızda da en sık görülen tip HPV Tip-16 olmuştur. Anormal sitolojisi olan 77(%100) olguda HPV DNA bakıldığında 22 (%28,6) olguda HPV DNA

pozitif, 55 (%71,4) olguda HPV DNA negatif bulundu. HPV Tip dağılımına baktığımızda Tip-16; 13(%59,9) olguda, Tip-18; 2(%9,09) olguda, Tip-33; 1 (%4,54) olguda, Tip-35; 1(%4,54) olguda, Tip-39; 1(%4,54) olguda, Tip-67; 2(%9,09) olguda, Tip-73; 1(%4,54) olguda, Tip-83; 1(%4,54) olguda pozitif bulunmuştur. En sık görülen HPV tipi HPV DNA pozitif 22 (%100) olgunun 12 (%54,54)'sinde tespit edilen Tip-16 olmuştur. *Bu oranlar dünyadaki oranlarla benzerlik göstermektedir.*

Türk Jinekolojik Onkoloji grubuna üye hastanelerde HPV analizi yapılan hastaların sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi ve sitolojik anormalliklerdeki HPV tiplerinin belirlenmesi şeklinde yapılan bir çalışmada 2006 ve 2010 yılları arasında 12 ayrı merkeze başvuran, smear ve HPV analizi yapılan toplam 6388 hastayı retrospektif olarak incelenmişler. Hastaların demografik bilgileri, smear sonuçları, HPV tipleri online olarak toplanıp analiz edilmiş. Tüm grup değerlendirildiğinde, %25 hastada HPV pozitif olarak saptanmış. Anormal sitolojisi olanlarda HPV pozitifliği %57 iken, normal pap testi olanlarda HPV pozitifliği %27 oranında tespit edilmiş. Hastaların yaşam dekadları ile HPV pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki bulunmuş ($p<0,05$). HPV pozitifliği: ASCUS için %37,ASC-H için %9, LSIL için %27,HSIL için %20,glandüler anormallikler için %22 ve skuamöz hücreli karsinom için %41 olarak bulunmuş. En sık görülen HPV tipleri sırasıyla HPV 16 (%32), HPV 18 (%8), HPV 31 (%6), HPV 51 (%5), HPV 33 (%3) , HPV 6 (%17), HPV 11 (%9) olarak bulunmuş (334).

Yine Türkiyede yapılan bir çalışmada Toplam 77 servikal örneğin 47 (prevalans %61)'si HPV DNA pozitif tespit edilmiş. Yetmiş yedi örneğin %52'si HPV16; %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 rastlanmamış. Smear sonucuna göre HPV DNA pozitifliklerine baktığımızda; ASCUS'luların %64'ünde, ASC-H'lilerin %60'ında, LSIL'lilerin %25'inde ve HSIL'lilerin %100'ünde HPV DNA pozitif olarak bulunmuştur (335).

Bizim çalışmamızda anormal smear sonucuna göre HPV DNA pozitiflik oranları; ASCUS %17,39, ASC-H %50, LGSİL %53,33, HGSİL %40, AGC %0 olarak saptanmıştır. Anormal smear sonucuna göre HPV DNA pozitiflik oranlarının tümünde farklılık tespit ettik. Bu farklılığın bizim çalışmamızdaki olgu sayısından kaynaklanmış olabileceği şeklinde yorumladık. *En sık HPV DNA pozitifliği gösteren smear anormalliği LGSİL(%53,33) sıklığı dikkat çekmektedir ve LGSİL grubunu diğer smear*

anormalliklerin toplamının Fisherin Kesin Ki-Kare testi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur(p=0,027).

Yine bizim çalışmamızda HPV Tip dağılımına baktığımızda; Tip-16 (%59,9), Tip-18(%9,09), Tip-33(%4,54), Tip-35 (%4,54), Tip-39(%4,54), Tip-67 (%9,09), Tip-73(%4,54), Tip-83(%4,54) olarak bulunmuştur. HPV DNA pozitif olgularda en sık rastlanılan HPV Tip-16 olmuştur. Yine en sık HPV DNA pozitifliğine sahip olan anormal smear grubu LGSİL'de en sık HPV Tip-16 tespit edilmiştir. Sıklık sırası benzer şekilde bulundu. Ancak gerek örneklem sayısı gerekse çalışılan HPV tipi farklılığı bu çalışmalardan ayrılan noktalaradır.

Fransanda Halfon P ve arkadaşlarının 140 anormal sitolojisi olan olguda, bizim kullandığımız NucliSENS EasyQ HPV testini kullanarak ThinPrep yöntemiyle alınmış örneklerde HPV E6/E7 mRNA pozitifliğini incelemişler ve olguların %46'sında HPV E6/E7 mRNA pozitifliği saptamışlardır (336). Yine Norveçte Sorbye S.W. ve arkadaşlarının 2006-2008 yılları arasında 1798 minor servikal lezyonu olan olgular üzerinde PreTect yöntemiyle alınmış örneklerle HPV mRNA taraması yaptıkları çalışmalarında; olguların %18'inde HPV E6/E7 mRNA pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca HPV mRNA testinin orta ve şiddetli displazi ile servikal kanser tespit etmekteki sensitivitesi %81 spesifitesi %91 bulunmuştur (337).

Türkiyede yapılan ilk benzer çalışmalardan olan Ardiç N ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada, yüksek riskli HPV tipleri olan tip 16, 18, 31, 33 ve 45'e ait E6/E7 mRNA'larını kalitatif olarak saptayan ticari bir nükleik asit dizi temelli çoğaltma (Nucleic Acid Sequence Based Amplification, NASBA) sistemi (NucliSENS EasyQ HPV; bioMérieux, Fransa) kullanılarak servikal örneklerde HPV varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya jinekolojik muayenede şüpheli lezyonları bulunan 57 kadından sıvı bazlı inceleme sistemi (ThinPrep™ Pap Smear Method, Cytoc, ABD) ile alınan servikal sürüntü örnekleri dahil edilmiş ve nükleik asit saflaştırma işlemleri otomatize ticari bir sistem (NucliSENS easy- MAG, bioMérieux, Fransa) kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada, örneklerin %38.6'sında (22/57) HPV E6/E7 mRNA pozitifliği bulunmuş, pozitif örneklerde %50 (11/22) oranı ile tip 33 en sık rastlanılan tip olmuş, bunu %41 (9/22) ile tip 16, %22.7 (5/22) ile tip 31, %18.2 (4/22) ile tip 45 ve %4.5 (1/22) ile tip 18 izlemiştir. Pozitif bulunan örneklerin %63.6'sında (14/22) tek HPV tipiyle, %36.4'ünde (8/22) ise 2 HPV tipiyle enfeksiyon saptanmış. Koenfeksiyonların %13.6 (3/22) oranıyla en sık tip 16 ve tip 33 birlikteliği ile ortaya çıktığı izlenmiştir.

Bizim çalışmamızda anormal smear sonucu olan 77 olguda HPV DNA çalışıldı. Olguların %28,6(22/77)'sında HPV DNA pozitif, %71,4(55/77) olguda HPV DNA negatif bulundu. HPV DNA pozitif olan 22 olguda E6 ve E7 gen ekspresyonu varlığı yüksek riskli HPV tipleri olan tip 16, 18, 31, 33 ve 45'e ait E6/E7 mRNA'larını kalitatif olarak belirleyen nükleik asit dizi temelli çoğaltma (NASBA) yöntemiyle, NucliSENS® EasyQ Genetic Analyzer cihazı (Biomerieux, Fransa) kullanılarak **servikal doku biyopsilerinden** hazırlanmış örneklerle çalışıldı. Olguların %50(11/22)'sinde HPV E6/E7 mRNA pozitif, %50(11/22)'sinde de HPV E6/E7 mRNA negatif bulundu. HPV E6/E7 mRNA pozitif olguların tip dağılımı; tip 16 %27,27 (6/22), tip 18 %4,54 (1/22), tip 33 %4,54(1/22), tip-16+tip-18 %9,09 (2/22), tip-16+tip-33 %4,54(1/22) şeklinde tespit edildi. En sık rastlanılan HPV subtipi tip-16 bulunmuştur. *Ardıç N ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadan temel farkı örneklerin sıvı bazlı sitoloji değil servikal biopsilerden çalışılmasıdır. Biz sadece HPV DNA pozitif hastalarda HPV E6/E7 mRNA çalıştık ayrıca yukardaki çalışmalarda Thin Prep yöntemi ile bakılırken biz direk servikal doku meteryalinden hazırlanmış örneklerle HPV E6/E7 mRNA çalıştık. Bizim çalışma sonuçlarımız dünya literatürü ile örtüşmektedir (338).*

Anormal sitoloji sonuçlarına göre en sık HPV E6/E7 mRNA pozitifliği %75 oranında ASC-H 'de görülmüştür. Anormal sitoloji sonucu LGSİL olan olgularda HPV E6/E7 mRNA pozitifliği %50 oranında görülmüştür. Anormal sitoloji sonucu HGSİL olan olgularda HPV E6/E7 mRNA pozitifliği %50 oranında görülmüştür. Anormal sitoloji sonucu ASCUS olan olgularda HPV E6/E7 mRNA pozitifliği %37,5 oranında görülmüştür. Bu veriler ışığında anormal smear sonucu olan hastalarda HPV E6/E7 mRNA gen transkripsiyonunun pozitifliği ve displazi derecesi arasında korolesyon görülmektedir. Yani şiddetli servikal displazi olan lezyonlarda (ASCH,LGSİL ve HGSİL), daha az servikal displazi olan lezyonlanlardan (ASCUS,AGC) E6/E7 mRNA pozitifliğinin fazla olduğu dikkat çekmektedir.Yine E6/E7 mRNA pozitif olan 11 olgunun 6 (%27,27) sı HPV Tip-16 'dır.Yani E6/E7 mRNA pozitif olan olgularda HPV Tip-16'nın diğer HPV tiplerinden daha sık görülmüştür.

Servikal biopsi sonuçları incelendiğinde;HPV DNA Tip-16 pozitif olgulardaki servikal biyopsi sonuçlarını karşılaştırdığımızda anormal servikal biyopsilerde CİN3 sıklığı armaktadır.

Anormal smear sonucu ASCUS olan 46 olgunun servikal biyopsi sonucu; 41 (%89,1) olguda normal, 5 (%10,9) olguda anormal servikal lezyon (CIN 1,2,3)

saptanmıştır. (Tablo 4.8.) *Normal olguların fazlalığı bu farkı meydana getirmiş olup dünya literatürü ile uyumludur.*

Anormal smear sonucu ASC-H olan 8 olgunun servikal biyopsi sonucu ; 7(%87,5) olguda normal, 1(%12,5) olguda anormal servikal lezyon(CIN 1,2,3) saptanmıştır. Normal olguların fazlalığı bu farkı meydana getirmiş olup dünya literatürü ile uyumludur. *Bizim çalışmamızda en fazla olarak HPV pozitifliğine sahip olan bu grupta ilginç bir şekilde servikal biyopsi sonuçları normalliği daha fazla tespit edilmiştir.* (Tablo 4.9)

Anormal smear sonucu LGSİL olan 15 olgunun servikal biyopsi sonucu; 6(%40) olguda normal, 9(%60) olguda anormal servikal lezyon(CIN 1,2,3) saptanmıştır. Sonuçları değerlendirdiğimizde anormal (CİN1,CİN2,CİN3) patoloji sonuçları daha fazla görülmektedir. *Bu anormal biyopsi sonucu dünya literatürleri ile paraleldir.* (Tablo 4.10)

Anormal smear sonucu HGSİL olan 5 olguların servikal biyopsi sonucu; 3 (%60) olguda normal, 2 (%40) olguda anormal servikal lezyon(CIN 1, 2, 3) saptanmıştır. *Normal olguların fazlalığı bu farkı meydana getirmiş olup dünya literatürü ile uyumlu değildir. Bunun da sebebi elimizdeki HGSİL olgu sayısıdır.* (Tablo 4.11)

HPV DNA negatif 55 olguda servikal biopsi sonucu %87,3(48/55)'ünde normal bulunmuştur. Gerikalan %12,7(7/55)'inde anormal servikal lezyon(CIN1,2,3) saptanmıştır. HPV DNA pozitif 22 olgunun servikal biyopsi sonucu %54,5 (12/22)'inde normal olup, % 45,5 (10/22)'inde anormal servikal lezyon (CIN 1,2,3) saptanmıştır. *HPV DNA negatif grup ile HPV DNA pozitif grup arasındaki anormal servikal biyopsi sonucu oranları Pearson Ki-Kare Testi kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0,002). (Tablo 4.13.) Yani HPV DNA pozitifliği anormal servikal lezyon sıklığını artırmaktadır. Bu sonuç dünya literatürüyle uyumlu olmuş olup artık klasik bir bilgi halini almıştır. Servikal HPV varlığının anormal servikal lezyonlar ve serviks kanseri ile ilişkisi kanıtlanmıştır.*

E6/E7 mRNA negatif 66 olgunun servikal biopsi sonucu incelendiğinde %81,8 (54/66)'inde normal bulunmuştur, gerikalan %18,2(12/66)'inde anormal servikal lezyon(CIN1,2,3) saptanmıştır. E6/E7 mRNA pozitif 11 olgunun servikal biopsi sonucu %54,5 (6/11)'inde normal olup, % 45,5(5/11)'inde servikal lezyon(CIN

1,2,3) saptanmıştır. HPV E6/E7 mRNA negatif grup ile HPV E6/E7 mRNA pozitif grup arasındaki anormal servikal biyopsi sonucu oranları Pearson Ki-Kare Testi ile karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,043$). (Tablo 4.15.) Yani HPV E6/E7 mRNA pozitifliğide HPV DNA gibi anormal servikal lezyon sıklığını artırmaktadır. Buradan çıkardığımız sonuca göre E6/E7 mRNA ve HPV DNA pozitifliği anormal servikal lezyonların varlığı üzerine benzer etkisi olduğu tespit edilmiştir. HPV DNA ve HPV mRNA ikiside pozitif olan grupta CIN3 yönünden istatistiksel olarak farklılık bulunamamıştır ($p=0,375$). (Tablo 4.16) Ancak HPV mRNA pozitif olan olgularda CIN3 daha yüksek oranda(%27) bulunduğu dikkat çekmektedir. Yani sadece E6/E7 mRNA pozitifliğinin lezyonun şiddeti üzerine etkili olabileceğini düşündürür.

Fransada yapılan bir çalışmada HPV DNA pozitifliği ile E6/E7 mRNA ile viral yük kantitatif tespiti arasındaki korelasyon araştırılmış. Kanserli olgularda %78 oranında tespit edilirken normal olgularda %0 oranında bulunmuştur ($p<0,001$). HPV DNA ve E6/E7 mRNA(HPV16, 18, 31, 33, 45) karşılaştırıldığında olguların %45,4'ünde HPV DNA negatif / HPV mRNA negatif , %46'sında HPV DNA pozitif / HPV mRNA pozitif ve %8,5'inde HPV DNA pozitif / HPV mRNA negatif olarak tespit edilmiştir($p<0,001$). HPV DNA pozitif / HPV mRNA pozitif oranı lezyonun şiddetiyle artmış olarak tespit edilmiş. Tüm normal servikal örneklerde HPV DNA negatif / HPV mRNA negatif tespit edilmiştir. Sonuç olarak E6 / E7 mRNA pozitifliği ve lezyonların şiddeti HPV DNA yükü ile uyumlu olarak artar sonucuna varılmıştır (339).

Bizim çalışmamızda toplam 77 olgunun 55(%71,4)'inde HPV DNA negatif / HPV mRNA negatif, 11(%14,3)'inde HPV DNA pozitif / HPV mRNA negatif, 11(%14,3)'inde HPV DNA pozitif / HPV mRNA pozitif olarak saptandı. Bu bulgular istatistiksel olarak gruplar birbirinden farklı bulundu ($p<0,001$). HPV DNA ve HPV mRNA ikiside pozitif olan grupların servikal biyopsi sonuçları CIN3 oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılık bulunamamıştır ($p=0,375$). (Tablo 4.16.) Ancak HPV mRNA pozitif olan olgularda CIN3 daha yüksek oranda(%27) bulunduğu dikkat çekmektedir. Yani sadece E6/E7 mRNA pozitifliğinin lezyonun şiddeti üzerine etkili olabileceğini düşündürür.

Anormal servikal lezyon şiddetini (CIN1,2,3) belirlemede HPV E6/E7 mRNA'nın karsinogenezde önemi bilinmekte olup bu çalışmamızın dokudan HPV E6/E7 mRNA çalışılması ile dünya ve ülkemiz literatürüne katkıda bulunduğunu düşünüyoruz.

Servikal biyopsi metaryallerinden hazırlanan örneklerde sıvı bazlı sitoloji ile hazırlanan örneklerle göre daha fazla hücre içermekte olup daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Dokudan hazırlanan örneklerde HPV E6/E7 mRNA çalışmak daha doğru veriler verdiğini düşünmekteyiz. Servikal kanser taramasında güvenilir bir tarama ve tanı yöntemi önem arz etmektedir. Amaç mümkün olan en az girişimsel müdahale ile minimum yalancı negatifliği olan tarama testi arasındaki dengeyi yakalamamaktır.

İlerleyen zamanlarda daha geniş popülasyonlarda yapılacak çalışmalarla önemli sonuçlar elde edileceğini umut etmekteyiz.



6. SONUÇ

Yüksek HPV viral yükün servikal lezyonların gelişmesi ile korele olduğu bildirilmiştir (312). Yapılan çalışmalarda, HPV E6/E7 mRNA düzeylerinin genel olarak DNA saptama, viral yük ya da integrasyon tespitine göre klinikle daha uyumlu sonuçlar verdiği belirtilmektedir (313). Serviks kanseri olgularında da yüksek E6/E7 mRNA düzeylerinin kötü prognozla ilişkisi saptanmış, E6/E7 mRNA ekspresyonu ile viral yük arasında korelasyon olmadığı ortaya konulmuştur (314, 315). Tüm bu sonuçlar, HPV E6/E7 mRNA saptanmasına yönelik testlerin servikal lezyonun ağırlığı ile daha iyi korelasyon gösterdiğini ve serviks kanseri gelişiminin öngörülmesinde önemli potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir (316).

Sonuç olarak anormal smear oluşumunda ve karsinogeneze ilerleyişte HPV nin rolü aşikardır. HPV DNA pozitifliği ile E6/E7 mRNA ile tespit edilen viral yük oranındaki artış anormal servikal lezyonların şiddetini artırdığı görülmektedir. Ve diğer çalışmalarla benzer sonuçlara varsakta temel olarak kullandığımız metod farklılık arz eder. *Birçok benzer çalışmada aynı kit kullanılsa da sıvı bazlı sitolojilerden E6/E7 mRNA çalışılmış olup, bizim çalışmamızda direkt servikal biyopsilerden çalışılmıştır. Servikal dokudan hazırlanan örnekler daha fazla hücre içermekte olup daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Dokudan hazırlanan örneklerde HPV E6/E7 mRNA çalışmak daha doğru veriler verdiğini düşünmekteyiz. Yani doku tanısı ile referans sonuçlar elde etmeyi umut ediyoruz.* Bu konuda daha geniş kapsamlı çalışmalarla E6/E7 mRNA ile tespit edilen viral yük tayini lezyonun prognozu ve gerekli müdahaleleri ön görme konusunda umut vaad etmektedir. Son yıllarda HPV konusundaki çalışmalar dünya üzerinde hızla artmakla birlikte ülkemizde hala yeterli sayıda ve yeterli örneklem genişliğinde çalışma olmaması bizi düşündürmektedir. Bu çalışmayla ülke ve dünya literatüre katkı sağladığımızı ummaktayız.

7. ÖZET

Amaç: Çalışmamızın amacı farklı HPV alt tiplerinin yapmış olduğu E6 ve E7 kanser yapıcı protein tespiti ve servikal displaziler üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

Materyal-Metod: : Smear sonuçları ASCUS, ASC-H, LSIL, HSIL ve AGC olarak raporlanan 21-65 yaşları arası 77 hasta dahil edilmiştir. HPV DNA'nın tespit ve tiplendirilmesi HPV sign® Q24 complete kiti, RotorGene ve PyroMark Q24 (Qiagen, Almanya) sistemleri ile kullanılarak yapıldı. HPV DNA pozitif olguların *servikal biyopsilerinden hazırlanan örneklerde* HPV E6/E7 mRNA gen ekspresyonu NASBA yöntemiyle, NucliSENS® EasyQ Genetic Analyzer cihazı (Biomerieux, Fransa) kullanılarak araştırıldı.

Tartışma: HPV DNA pozitif olguların servikal biyopsi sonucunda %45,5 (10/22)'inde anormal servikal lezyon (CIN 1,2,3) tespit edilirken, %13,63'ünde CİN 3 servikal lezyon görülmüştür. HPV mRNA pozitif olguların servikal biyopsi sonucunda %45,5 (5/11)'inde anormal servikal lezyon (CIN 1,2,3) tespit edilirken, %27'sinde CİN 3 görülmüştür. HPV DNA ve HPV mRNA markerlarının ikiside pozitif olan grupların servikal biyopsi sonuçları CİN3 olanları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (p=0,375). Ama HPV mRNA pozitif olan gruptaki CİN 3 oranı yüksekliği dikkat çekmektedir.

Sonuç: Servikal dokuda HPV E6/E7 mRNA saptanmasında kullanılan testler, servikal displazi şiddetiyle daha iyi korelasyon gösterir. Bu testler serviks kanserini öngörmeye önemli bir potansiyele sahiptir. Fakat konu üzerinde daha geniş ölçekli çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: HPV, HPV DNA, E6/E7 mRNA, Servikal Displazi,

8. SUMMARY

Objective: The objective of our study is to determine E6 and E7 carcinogenic proteins caused by different sub-types of HPV as well as investigating their effects on cervical dysplasias.

Material-Method: 77 patients aged between 21-65, whose Smear results were reported as ASCUS, ASC-H, LSIL, HSIL and AGC, were incorporated into the study. The identification and typology of HPV DNA were performed by using HPV sign® Q24 complete kit and RotorGene and PyroMark Q24 (Qiagen, Germany) systems. HPV E6/E7 mRNA gene expression within *the samples prepared from the cervical biopsies* of HPV DNA positive cases was investigated through NASBA method (Nucleic acid sequence based amplification) by using NucliSENS® EasyQ Genetic Analyzer device (Biomerieux, France).

Discussion: As the result of the cervical biopsies of HPV DNA positive cases, an abnormal cervical lesion (CIN 1,2,3) was detected in 45,5% (10/22) of these cases, whereas a CIN 3- cervical lesion was seen in 13,63% of them. As the result of the cervical biopsy results of HPV mRNA positive cases, an abnormal cervical lesion (CIN 1,2,3) was detected in 45,5 % (5/11) of these cases, while in 27% of them was CIN 3 seen. When the cervical biopsy results of the groups, the HPV DNA and HPV mRNA markers of which were both positive, were compared with those having CIN 3, no statistically significant difference could be found ($p=0,375$). However, the high rate of CIN 3 within the group that is HPV mRNA-positive attracts attention.

Result: The tests used for determining HPV E6/E7 mRNA in the cervical lesion show a better correlation with the severity of cervical dysplasia. These tests have a significant potential in foreseeing cervical cancer. Yet, studies on a larger scale are required to be performed on this subject.

Key Words: HPV, HPV DNA, E6/E7 mRNA, Cervical Dysplasia.

9. KAYNAKLAR

1. Scotto J, Bailar JC. Rigoni-Stern and medical statistics. A nineteenth-century approach to cancer research. *Hist Med Allied Sei* 1969; 24:65-75.
2. Gagnon F. Contribution to the study of the etiology and prevention of cancer of the cervix of the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1950; 50:516-22.
3. Frazier IH. Chapter 21: Human papillomaviruses. In: Artensen AW, ed. *Vaccines: A Biography*. New York, NY: Springer, 2010:361-73.
4. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976; 20:505-9.
5. Zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, et al. Human papilloma viruses and cancer. *Bibl Haematol* 1975 ;(43):569-71.
6. Zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976; 36(2 pt 2):794.
7. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, et al. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sei USA* 1983; 80(12):3812-5.
8. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 1984; 3(5): 1151-7.
9. Babes A. Diagnostic du cancer du col uterine par les frottis. *La Presse Medicale* 1928;36:451. [Reprinted in English *Acta Cytol* 1967;11:217.]
10. Torres JE, Riopelle MA. History of colposcopy in the United States. In: Wright VC, ed. *Contemporary Colposcopy*. Philadelphia, PA. *Obstet Gynecol Clin N Am* 1993;20: 1-12.
11. Vasilev S. Commentary: Kaiser permanente medicine 50 years ago: the gynecological cancer detection clinic. *Permanente J* 2000; 4 (3).
12. Kitchener HC, Castle PE, Cox JT. Chapter 7: Achievements and limitations of

cervical cytology screening. *Vaccine* 2006; 24(suppl 3):S63-70.

13. Papanicolaou GN. New cancer diagnosis. Proceedings Third Race Betterment Conference, Battle Creek, Michigan. Race Betterment Foundation, 1928.

14. Schiller J. Jodpinselung und abschabung des portioepithels. *Zentralbl Gynakol* 1929; 53:1056.

15. Papanicolaou GN, Traut HF. *Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear*. New York, NY: Commonwealth Fund, 1943.

16. Mayeaux, E. J. Thomas Cox, J. *Modern Colposcopy, Textbook & Atlas*, ASCCP, 2011.

17. Ayre JE. Selective cytologic smear for the diagnosis of cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1947; 53:609-19.

18. Baskett TF. Hysterectomy: evolution and trends. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2005; 19:295-305.

19. Dietel H, Focken A. Das schicksal des atypischen epithels an der portio. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1955;15:593-5.

20. Koss LG, Durfee GR. Cytological changes preceding the appearance of in situ carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1955; 8 (2):295—301.

21. Von Franque, O. Leukoplakia und carcinoma vaginae et uteri. *Z Geburtshilfe* 1907; 60:237-9.

22. Hinselmann H. Zur kenntnis der pracancerösen Veränderungen der portio. *Zentralbl Gynakol* 1927;51:901-2.

23. Hinselmann H. Die atologie, Symptomatologie und diagnostik des uterus carcinoms. In: Veit J, Stockei W, eds. *Handbuch der Gynekologie*. Munich, Germany: Bergmann, 1930:854-856: Vol 6:1.

24. Hinselmann H. Verbesserung der inspektionsmöglichkeiten von vulva, vagina und portio. *Münchener Med Wochenschr* 1925;72:1733-6.

25. Hinselmann H. Ausgewählte gesichtspunkte zur beurteilung des Zusammenhanges der “matrixbezirke” und des karzinoms der sichtbaren abschnitte des weiblichen genitaltraktes. *Z Geburtshilfe* 1933;104:228-30.

26. Hinselmann H. Der begriff der umwandlungszone der portio. *Arch Gynakol* 1927; 131:422-4.

27. Hinselmann H. Die klinische und mikroskopische fruhdiagnose des portiokarzinoms. *Arch Gynakol* 1934:156:239-40.

28. Glatthaar E. Studien Über die Morphogenese des Plattenepithelkarzinoms der Portio

Vaginalis Uteri. Basel, Switzerland: Karger, 1950.

29. Jones DED, Creaseman WT, Dombroski RA, et al. Evaluation of the atypical Paps smear. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157:544-9.
30. Mayeaux EJ, Harper MB, Abreo F, et al. A comparison of the reliability of repeat cervical smears and colposcopy in patients with abnormal cervical cytology. *J Fam Pract* 1995; 40:57-62.
31. Bogdanich W. Lax Laboratories: The Paps Test Misses Much Cervical Cancer Through Labs Errors. *Wall Street J* 1967.
32. Centers for Medicare & Medicaid Services (CMS) Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) Page. <http://www.cms.gov/CLIA/> (Accessed August 22, 2015).
33. National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. *JAMA* 1989; 262:931-4.
34. Yobs AR, Swanson RA, Lamotte LC. Laboratory reliability of the Papsanicolaou smear. *Obstet Gynecol* 1985; 65:235-43.
35. Gordon P, Hatch K. Survey of colposcopy practices by obstetricians gynecologists. *Reprod Med* 1992; 37:861-3.
36. Robertson AJ, Anderson JM, Swanson Beck J, et al. Observer variability in histopathological reporting of cervical biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1989; 42:231-8.
37. Isihmail SM, Colclough AB, Dennen JS, et al. Reporting cervical intraepithelial neoplasia (CIN): intra- and interpathologist variation and factors associated with disagreement. *Histol Pathol* 1990; 16:371-6.
38. Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197:346-55.
39. Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 105:386-93.
40. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189:12-9.
41. Zhou J, Sun XY, Davies H, et al. Definition of linear antigenic regions of the HPV16 LI capsid protein using synthetic virion-like particles. *Virology* 1992; 189:592-9.
42. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
43. Münger K, Baldwin A, Edwards KM et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 78: 11451-60.

44. Cronje HS. Screening for cervical cancer in developing countries. *Int J Gynecol Oncol* 2004; 84: 101-108.
45. Alp Avcı G. İnsan Papillomavirusunun Genomik Yapısı ve Proteinleri. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46: 507-15.
46. Motoyama S, Ladines-Llave, Luis Villanueva S et al. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 2004; 50: 9-19.
47. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 2006; 11: 2286–302.
48. Howley PM. The molecular biology of papillomavirus transformation. Warner-Lambert Parke-Davis Award Lecture. *Am J Pathol* 1983; 113: 414-21.
49. Kadaja M, Isok-Paas H, Laos T, et al. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLOS Pathog* 2009; 5: e1000397.
50. Fehrmann F, Laimonis LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003; 22: 5201–7.
51. Robboy SJ, Bernhardt PF, Parmley T. Embryology of the female genital tract and disorders of abnormal sexual development. In: Kurman RJ, ed. *Blausteins Pathology of the Female Genital Tract* (4th ed). New York, NY: Springer-Verlag, 1994:8-10.
52. Larsen WJ. *Human Embryology*. New York, NY: Churchill Livingstone, 1993:253-8.
53. Hendrickson MR, Atkins KA, Kempson RL. Uterus and fallopian tubes. In: Mills SM, ed. *Histology for Pathologists* (3rd ed.). Philadelphia-New York: Lippincott-Raven Publishers, 2007:1011-3.
54. Linhartova A. Extent of columnar epithelium on the ectocervix between the ages of 1 and 13 years. *Obstet Gynecol* 1978; 52:451-6.
55. Ince TA, Cviko AP, Quade BJ, et al. p63 coordinates anogenital modeling and epithelial cell differentiation in the developing female urogenital tract. *Am J Pathol* 2002; 161:1111-7
56. Robboy SJ, Bentley RC. Vagina. In: Mills SM, ed. *Histology for Pathologists* (3rd ed.). Philadelphia-New York: Lippincott-Raven Publishers, 2007:999-1010.
57. Wright TC, Ronnett BM, Ferenczy A. Benign diseases of the cervix. In: Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM, eds. *Blausteins Pathology of the Female Genital Tract* (6th ed). New York, NY: Springer-Verlag, 2011:156-61.
58. Singer A. Anatomy of the cervix and physiological changes in cervical epithelium.

In: Fox H, Well M. eds. *Haines and Taylor Obstetrical and Gynaecological Pathology*. New York, NY: Churchill Livingstone, 1995:225-48.

59. Heilman LM, Pritchard JA. *Williams Obstetrics* (14th ed.). New York, NY: Appleton-Century-Crofts, 1970:19-30.

60. Kurman RJ, Norris HJ, Wilkinson E. *Tumors of the Cervix, Vagina and Vulva. Atlas of Tumor Pathology* (Series 3, Volume 4). Bethesda, MD: Armed Forces Institute of Pathology (monograph), 1992:1-12.

61. Vooijs GP. Benign proliferative reactions, intraepithelial neoplasia and invasive cancer of the uterine cervix. In: Bibbo M, ed. *Diagnostic Cytopathology* (2nd ed.). Philadelphia, PA: WB Saunders Co., 1997:161—8.

62. Feldman D, Romney SL, Edgcomb J, Valentine T. Ultrastructure of normal, metaplastic, and abnormal human uterine cervix: use of montages to study the topographical relationship of epithelial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 150:573-688.

63. Kupryjanczyk J. Epidermal growth factor receptor expression in the normal and inflamed cervix uteri: a comparison with estrogen receptor expression. *Int J Gynecol Pathol* 1990;9:263-71.

64. Gigi-Leiter O, Geiger B, Levy R, Czernobilsky B. Cytokeratin expression in squamous metaplasia of the human uterine cervix. *Differentiation* 1986; 31:191-205.

65. Maddox P, Szarewski A, Dyson J, Cuzick J. Cytokeratin expression and acetowhite change in cervical epithelium. *Clin Pathol* 1994; 47:15-7.

66. Cullen TS. *Cancer of the Uterus*. New York, NY: D. Appleton and Co., 1900:180-7.

67. Lawrence WD, Shingleton HM. Early physiologic squamous metaplasia of the cervix: light and electron microscopic observation. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137:661-71.

68. Burke L, Antonioli DA, Ducatman BS. *Colposcopy, Text and Atlas*. Norwalk, CT: Appleton and Lange, 1991:29-59.

69. Smedts F, Ramaekers F, Troyanovsky S, et al. Basal-cell keratins in cervical reserve cells and a comparison to their expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 1992; 140:601-12.

70. Szamborski J, Liebhart M. The ultrastructure of squamous metaplasia in endocervix. *Pathol Eur* 1973; 1:13-20.

71. Autier P, Coibion M, Huet F, Grivegnee AR. Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Brj Cancer* 1996; 74:488-90.

- 72.** Moscicki A-B, Burt VG, Kanowitz S, et al. The significance of squamous metaplasia in the development of low grade squamous intraepithelial lesions in young women. *Cancer* 1999; 85:1139-44.
- 73.** Gould PR, Barter RA, Papsadimitriou JM. An ultrastructural, cytochemical and autoradiographic study of the mucous membrane of the human cervical canal with reference to subcolumnar basal cells. *Am J Pathol* 1979;95:1-16.
- 74.** Tsutsumi K, Sun Q, Yasumoto S, et al. In vitro and in vivo analysis of cellular origin of cervical squamous metaplasia. *Am J Pathol* 1993; 143:1150-8
- 75.** Hare MJ, Toone E, Taylor-Robinson D, et al. Follicular cervicitis—colposcopic appearances and association with *Chlamydia trachomatis*. *Br J Obstet Gynaecol* 1981; 88:174-80.
- 76.** Papsanicolaou GN, Traut HF, Marchetti AA. *The Epithelia of Womans Reproductive Organs*. New York, NY: The Commonwealth Fund, 1948:30-6.
- 77.** Kelloff GJ, Sigman CC (2007). Assessing intraepithelial neoplasia and drug safety in cancer-preventative drug development. *Nature Reviews Cancer* 7:508-18.
- 78.** Vilos GA. The history of the papsanicolaou smear and the odyssey of George and Andormache Papsanicolaou. *Obstet Gynecol* 1998; 91:479-83.
- 79.** Christopherson WM, Parker JE, Drye JC. Control of cervical cancer: preliminary report on community program. *JAMA* 1962; 182:179-82.
- 80.** Fujii T, Crum C, Winkler B, Fu YS, Richart RM. Human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: histopathology and DNA content. *Obstet Gynecol* 1984;63:99-104.
- 81.** Loning T, Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, zur Hausen H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. / *Invest Dermatol* 1985;84:417-20.
- 82.** The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Developed and approved at the National Cancer Institute Workshop, Bethesda, Maryland, U.S.A., December 12-13; 1988. *Acta Cytol* 1989;33:567-74
- 83.** Kurman RJ, Solomon D. The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses. *New York: Springer-Verlag, 1994;99:1-81.*
- 84.** Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The Bethesda System 2001: terminology for reporting the results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287:2114-9.
- 85.** The revised Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: report of the 1991 Bethesda workshop. *Acta Cytol* 1992; 36:273-6.

- 86.** Allen KA, Zaleski S, Cohen MB. Laboratory use of the diagnosis “reactive/reparative” in gynecologic smears: impact of CLIA 88. *Mod Pathol* 1995; 8:266-9.
- 87.** Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 2001; 285:1500-5.
- 88.** Geng L, Connolly DC, Isacson C, Ronnett BC, Cho KR. Atypical immature metaplasia (AIM) of the cervix: is it related to high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL)? *Human Pathol* 1999; 30:345-51.
- 89.** Sherman ME, Tabbara SO, Scott DR, et al. “ASCUS, rule out HSIL”: cytologic features, histologic correlates, and human papillomavirus detection. *Mod Pathol* 1999; 12:335-42.
- 90.** Sherman ME, Solomon D, Schiffman M for the ALTS Group. Qualification of ASCUS: a comparison of equivocal LSIL and equivocal HSIL cervical cytology in the ASCUS LSIL Triage Study. *Am J Clin Pathol* 2001; 116:386-94.
- 91.** Jeronimo J, Khan MJ, Schiffman M, Solomon D, ALTS Group. Does the interval between Papanicolaou tests influence the quality of cytology? *Cancer* 2005; 105(3): 133-8.
- 92.** Voorjjs PG. Benign proliferative reactions, intraepithelial neoplasia and invasive cancer of the cervix. In: Bibbo M, ed. *Comprehensive Cytopathology* (2nd ed.). Philadelphia, PA: WB Saunders Company, 1997:161-230.
- 93.** Wright TC, Kurman RJ, Ferenczy A. Precancerous lesions of the cervix. In: Kurman RJ, ed. New York: Springer-Verlag, 1994:245-9.
- 94.** Gupta PK. Microbiology, inflammation and viral infections. In: Bibbo M, ed. *Comprehensive Cytopathology* (2nd ed.). Philadelphia, PA: WB Saunders Co, 1997:125-41.
- 95.** Raab SS, Snider TE, Potts SA, et al. Atypical glandular cells of undetermined significance: diagnostic accuracy and interobserver variability using select cytologic criteria. *Am J Clin Pathol* 1997; 107:299-307.
- 96.** Liao SY, Stanbridge EJ. Expression of MN/CA 9 protein in Papanicolaou smears containing atypical glandular cells of undetermined significance is a diagnostic biomarker of cervical dysplasia and neoplasia. *Cancer* 2000; 88:1108-21.
- 97.** Pacey NF, Ng ABP. Glandular neoplasms of the uterine cervix. In: Bibbo M. *Comprehensive Cytopathology* (2nd ed.). Philadelphia, PA: WB Saunders Co., 1997:231-50.

- 98.** Kurman RJ, Henson DE, Herbst AL, Noller KL, Schiffman MH. Interim guidelines for management of abnormal cervical cytology. The 1992 National Cancer Institute Workshop. *JAMA* 1994; 271(23): 1866-9.
- 99.** Cox JT (lead author). ASCCP practice guideline: management of glandular abnormalities in the cervical smear. *Lower Gen Tract Dis* 1997;1:41-45.
- 100.** Cox JT, Massad LS, Lonky N, Tosh R, Waxman A, Wilkinson E. ASSCP practice guideline: management guidelines for follow-up of low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL). *Low Gen Tract Dis* 2000;4:83-92
- 101.** Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ; ASCCP-Sponsored Consensus Conference. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002;287(16):2120-9.
- 102.** Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D; 2006 ASCCP-Sponsored Consensus Conference. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Low Gen Tract Dis* 2007; 11(4) :201-22.
- 103.** ACOG Practice Bulletin No. 99. Management of abnormal cervical cytology and histology. *Obstet Gynecol* 2008; 112:1419-44.
- 104.** Solomon D, Davey D, Kurman R, et al.; The Forum Group Members; The Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287:2114-19.
- 105.** Davey DD, Austin RM, Birdsong G, et al.; American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. ASCCP patient management guidelines: Paps test specimen adequacy and quality indicators. *Am J Clin Pathol* 2002; 118:714-8
- 106.** Davey D, Cox JT, Austin M, et al. Cervical cytology specimen adequacy: patient management guidelines and optimizing specimen collection. *Low Genit Tract Dis* 2008; 12(2):71-81.
- 107.** Birdsong GG, Davey DD, Darragh TM, Elgert PA, Henry M. Specimen adequacy. In: Solomon D, Nayar R, eds. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology*. New York, NY: Springer-Verlag, 2004:1-20.
- 108.** Lu CH, Chang CC, Chang MC, et al. Clinical parameters associated with unsatisfactory specimens of conventional cervical smears. *Diagn Cytopathol* 2011;39(2):87—91.
- 109.** Lu CH, Chang CC, Ho ES, et al. Should adequacy criteria in cervicovaginal cytology be modified after radiotherapy, chemotherapy, or hysterectomy? *Cancer*

Cytopathol 2010;118(6):474-81.

110. Jeronimo J, Khan MJ, Schiffman M, Solomon D; ALTS Group. Does the interval between Papanicolaou tests influence the quality of cytology? *Cancer* 2005;105:133-8.

111. Martin-Hirsch P, Lilford R, Jarvis G, Kitchener H. Efficacy of cervical- smear collection devices: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 1999;354:1763-70.

112. Mitchell HS. Longitudinal analysis of histologic high-grade disease after negative cervical cytology according to endocervical status. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 2001;93:237-40.

113. Bos AB, van Bellegooijen M, van den Akker-van Marie ME, et al. Endocervical status is not predictive of the incidence of cervical cancer in the years after negative smears. *Am J Clin Pathol* 2001;115:851-5.

114. Cox JT (lead author). ASCCP practice guideline: management issues related to quality of the smear. *Lower Gen Tract Dis* 1997;2:100-106.

115. Curtis P, Mintzer M, Morrell D, Resnick JC, Hendrix S, Qaqish BF. Characteristics and quality of Papanicolaou smears obtained by primary care clinicians using a single commercial laboratory. *Arch Fam Med* 1999;8:407-13.

116. Hamblin JE, Brock CD, Litchfield L, Dias J. Papanicolaou smear adequacy: effect of different techniques in specific fertility states. *J Fam Pract* 1985;20:257-60.

117. Kost ER, Snyder RR, Schwartz LE, Hankins GD. The “less than optimal” cytology: importance in obstetric patients and in a routine gynecologic population. *Obstet Gynecol* 1993;81:127-30.

118. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *CA Cancer J Clin* 2002;52:342-62.

119. Meijer CJ, van den Brule AJ, Snijders PJ, Helmerhorst T, Kenemans P, Walboomers JM. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer screening. *IARC Sci Publ* 1992; (119):271—81.

120. Wright TC Jr, Schiffman M, Solomon D, et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol* 2004; 103: 304-9.

121. Khan MJ, Casade PE, Lorincz AT, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *Natl Cancer Inst*

2005;97:1072-9.

122. Schiffman M, Adriaenza ME. ASCUS-LSIL Triage Study. Design, methods and characteristics of trial participants. *Acta Cytol* 2000;44(5):726-42.

123. Cox JT. Management of atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion by human papillomavirus testing. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2001;15:715-41.

124. Manos MM, Kinney WK, Hurley LB, et al. Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. *JAMA* 1999;281:1605-10.

125. ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:1383-92.

126. Stoler MH, Wright TC Jr, Sharma A, Apple R, Gutekunst K, Wright TL; the ATHENA (Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics) HPV Study Group. High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study. *Am J Clin Pathol* 2011; 135: 468-75.

127. Sherman ME, Solomon D, Schiffman M for the ALTS Group. Qualification of ASCUS. A comparison of equivocal LSIL and equivocal HSIL cervical cytology in the ASCUS LSIL Triage Study. *Am J Clin Pathol* 2001;116: 386-94.

128. Lonky NM, Felix JC, Naidu YM, Wolde-Tsadik G. Triage of atypical squamous cells of undetermined significance with hybrid capture II: colposcopy and histologic human papillomavirus correlation. *Obstet Gynecol* 2003;101(3):481-9.

129. Eltoun IA, Chhieng DC, Roberson J, McMillon D, Partridge EE. Reflex human papilloma virus infection testing detects the same proportion of cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3 in young versus elderly women. *Cancer* 2005;105(4): 194-8.

130. Kulasingam SL, Kim JJ, Lawrence WF, et al. Cost-effectiveness analysis based on the atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesion Triage Study (ALTS). / *Natl Cancer Inst* 2006; 98: 92-100.

131. Massad LS, Jeronimo J, Schiffman M; National Institutes of Health/American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (NIH/ASCCP) Research Group. Interobserver agreement in the assessment of components of colposcopic grading. *Obstet Gynecol* 2008;111(6): 1279-84.

132. Stoler MH, Vichnin MD, Ferenczy A, et al; the FUTURE I, II and III Investigators. The accuracy of colposcopic biopsy: analyses from the placebo arm of the Gardasil

clinical trials. *Int J Cancer* 2011;128(6): 1354—62.

133. Solomon D, Schiffman M, Tarone R; ALTS Study group. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(4):293-9.

134. Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172(3):946-54.

135. Stoler MH, Schiffman M; Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS) Group. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 2001 ;285(11): 1500-5.

136. Wright TC, Lorincz AT, Ferris DG, Richart RM, Ferenczy A, Mielzynska I, Borgatta. Reflex human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing in women with abnormal Pap smears. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178: 962-66.

137. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 2000;132:810-9.

138. Kim JJ, Wright TC and Goldie SJ. Cost effectiveness of alternative triage strategies for atypical squamous cells of undetermined significance. *JAMA* 2002;287:2382-90.

139. ACOG Committee on Practice Bulletins-Gynecology. ACOG Practice Bulletin no. 109: cervical cytology screening. *Obstet Gynecol* 2009; 114(6): 1409-20.

140. Moscicki AB, Cox JT. Practice improvement in cervical screening and management (PICSM): symposium on management of cervical abnormalities in adolescents and young women. *Low Gen Tract Dis* 2010;14(1):73-80.

141. Committee on Adolescent Health Care ACOG Committee Opinion No. 436: evaluation and management of abnormal cervical cytology and histology in adolescents. *Obstet Gynecol* 2009;113(6):1422-5.

142. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA* 2001;285:2995-3002.

143. Winer RL, Feng Q, Hughes JP, et al. Risk of female human papillomavirus acqui-

quisition associated with first male sex partner. *Infect Dis* 2008;197(2):279-82.

144. Moscicki AB, Ma Y, Jonte J, et al. The role of sexual behavior and human papillomavirus persistence in predicting repeated infections with new human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19(8):2055-65.

145. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, et al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* 2004;364(9446): 1678-83.

146. Sherman ME, Schiffman M, Cox JT; Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study Group. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). *Natl Cancer Inst* 2002;94: 102-7.

147. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-8.

148. Monteiro DL, Trajano AJ, Russomano FB, Silva KS. Prognosis of intraepithelial cervical lesion during adolescence in up to two years of follow-up. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2010;23(4):230-6.

149. Chan PG, Sung H-Y, Sawaya G. Changes in cervical cancer incidence after three decades of screening US women less than 30 years old. *Obstet Gynecol* 2003;102: 765-73.

150. Dunn TS, Bajaj JE, Stamm CA, Beaty B. Management of the minimally abnormal Papanicolaou smear in pregnancy. *Low Genit Tract Dis* 2001;5(3): 133-7.

151. Selvaggi SM. Reporting of atypical squamous cells, cannot exclude a high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H) on cervical samples: is it significant? *Diagn Cytopathol* 2003;29:38-41.

152. Alii PM, Ali SZ. Atypical squamous cells of undetermined significance-rule out high-grade squamous intraepithelial lesion: cytopathologic characteristics and clinical correlates. *Diagn Cytopathol* 2003;28:308-12.

153. Liman AK, Giampoli EJ, Bonfiglio TA. Should women with atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion, receive reflex human papillomavirus-DNA testing? *Cancer* 2005;105:457-60.

154. Galliano GE, Moatamed"NA, Lee S, Salami N, Apple SK. Reflex high risk HPV testing in atypical squamous cells, cannot exclude high grade intraepithelial lesion: a large institutions experience with the significance of this often ordered test. *Acta Cytol* 2011;55(2):167-72.

155. Sherman ME, Castle PE, Solomon D. Cervical cytology of atypical squamous cells-

cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H): characteristics and histologic outcomes. *Cancer* 2006; 108: 298-305.

156. ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. A randomized trial on the management of low-grade squamous intraepithelial lesion cytology interpretations. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188: 1393-400.

157. Schiffman M, Solomon D. Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:946-9.

158. Cox JT. The clinicians view: role of human papillomavirus testing in the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology Guidelines for the management of abnormal cervical cytology and cervical cancer precursors. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127: 950-8.

159. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: clinical applications of HPV testing: a summary of metaanalyses. *Vaccine* 2006;24(suppl 3):S78-89.

160. Cuzick J. Cervical screening. *Br J Hosp Med* 1988;39:265.

161. Ferris DG, Wright TC, Litaker MS, et al. Triage of women with ASCUS and LSIL Pap smear reports: management by repeat Pap smear, HPV DNA testing or colposcopy? *J Fam Pract* 1998;46:125-34.

162. Mayeaux EJ, Harper MB, Abreo F, et al. A comparison of the reliability of repeat cervical smears and colposcopy in patients with abnormal cervical cytology. *J Fam Pract* 1995; 40:57-62.

163. Davey DD, Neal MH, Wilbur DC, Colgan TJ, Styer PE, Mody DR. Bethesda 2001 implementation and reporting rates: 2003 practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:1224-9.

164. Insinga RP, Glass AG, Rush BB. Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:105-13.

165. Massad LS, Collins YC, Meyer PM. Biopsy correlates of abnormal cervical cytology classified using the Bethesda system. *Gynecol Oncol* 2001; 82:516-22

166. Dunn TS, Burke M, Shwayder J. A "see and treat" management for high grade squamous intraepithelial lesion Pap smears. *J Low Genit Tract Dis* 2003; 7:104-6.

167. Evans MF, Adamson CS, Papillo JL, St John TL, Leiman G, Cooper K. Distribution of human papillomavirus types in ThinPrep' Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy

outcomes. *Cancer* 2006;10S: 1054-6,4.

168. Jones BA, Davey DD. Quality management in gynecologic cytology using interlaboratory comparison. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:672-81.

169. Ko V, Tambouret RH, Kuebler DL, Black-Schaffer WS, Wilbur DC. Human papillomavirus testing using Hybrid Capture II with Surepath collection: initial evaluation and longitudinal data provide clinical validation for this method. *Cancer* 2006;108:468-74.

170. Cox JT. More questions about the accuracy of colposcopy: what does this mean for cervical cancer prevention? *Obstet Gynecol* 2008;111(6):1266-7.

171. Pretorius RG, Zhang WH, Belinson JL, et al. Colposcopically directed biopsy, random cervical biopsy, and endocervical curettage in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia II or worse. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(2):430-4.

172. Coppleson M, Reid BL. A colposcopic study of the cervix during pregnancy and the puerperium. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1966; 73:575-85.

173. Roberts CH, Dinh TV, Hannigan EV, Yandell RB, Schnadig VJ. Management of cervical intraepithelial neoplasia during pregnancy: a simplified and cost-effective approach. *J Low Genit Tract Dis* 1998; 2:67-70.

174. Boardman LA, Goldman DL, Cooper AS, Heber WW, Weitzen S. CIN in pregnancy: antepartum and postpartum cytology and histology. *Reprod Med* 2005;50:13-8.

175. Lee KR, Darragh TM, Joste NE, et al. Atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS): interobserver reproducibility in cervical smears and corresponding thin-layer preparations. *Am J Clin Pathol* 2002; 117(1):96-102.

176. Diaz-Montes TP, Farinola MA, Zahurak ML, Bristow RE, Rosenthal DL. Clinical utility of atypical glandular cells (AGC) classification: cytohistologic comparison and relationship to HPV results. *Gynecol Oncol* 2007; 104 (21):366-71

177. Krane JF, Granter SR, Trask CE, Hogan CL, Lee KR. Papanicolaou smear sensitivity for the detection of adenocarcinoma of the cervix: a study of 49 cases. *Cancer* 2001; 93:8-15

178. Anderson MC. Glandular lesions of the cervix. In: Jones HW, ed. *Cervical Intraepithelial Neoplasia: Baillieres Clinical Obstetrics and Gynecology*. London, UK: Bailliere Tindall, 1995;9: 105-19.

179. Ostor AG, Duncan A, Quinn M, Rome R. Adenocarcinoma in situ of the uterine cervix; an experience with 100 cases. *Gynecol Oncol* 2000;79(2):207-10.

- 180.** Lee KR, Manna EA, St John T. Atypical endocervical glandular cells: accuracy of cytologic diagnosis. *Diagn Cytopathol* 1995;13:202-8.
- 181.** Kinney W, Sawaya GF, Sung HY, Kearney KA, Miller M, Hiatt RA. Stage at diagnosis and mortality in patients with adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix diagnosed as a consequence of cytologic screening. *Acta Cytol* 2003; 47:167-71.
- 182.** Fetterman B, Shaber R, Pawlick G, Kinney W. Human papillomavirus DNA testing in routine clinical practice for prediction of underlying cervical intra-epithelial neoplasia 2,3 at initial evaluation and in follow-up of women with atypical glandular cell Papanicolaou tests. *J Low Genit Tract Dis* 2006; 3:179.
- 183.** DerChain SF, Rabelo-Santos SH, Sarian LO, et al. Human papillomavirus DNA detection and histological findings in women referred for atypical glandular cells or adenocarcinoma in situ in their Pap smears. *Gynecol Oncol* 2004 ;95:618-23.
- 184.** Krane JF, Lee KR, Sun D, Yuan L, Crum CP. Atypical glandular cells of undetermined significance. Outcome predictions based on human papillomavirus testing. *Am J Clin Pathol* 2004; 121:87-92.
- 185.** Obenson K, Abreo F, Grafton WD. Cytohistologic correlation between AGUS and biopsy-detected lesions in postmenopausal women. *Acta Cytol* 2000; 44:41-5.
- 186.** Eddy GL, Wojtowycz MA, Piraino PS, Mazur MT. Papanicolaou smears by the Bethesda system in endometrial malignancy: utility and prognostic importance. *Obstet Gynecol* 1997; 90:999-1003.
- 187.** Schiffman M, Wentzensen X. From human papillomavirus to cervical cancer. *Obstet Gynecol* 2010;116(1):177-85 Cox JT, Massad LS, Lonky N, Tosh R, Waxman A, Wilkinson E. ASCCP practice guideline: management guidelines for follow-up of low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL). *Low Gen Tract Dis* 2000; 4:83-92.
- 188.** Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008;26(suppl 10): K1-16.
- 189.** Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *Natl Cancer Inst* (monograph) 2003;31:14-9.
- 190.** Morrison EA, Ho GF, Vermund SH, et al. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer* 1991; 49:6-13.
- 191.** Jones CJ, Brinton LA, Hamman RF, et al. Risk factors for in situ cervical cancer:

results from a case-control study. *Cancer Res* 1990; 50:3657-62.

192. Jacobs MV, Zielinski D, Meijer CJ, et al. A simplified and reliable HPV testing on archival Papanicolaou-stained cervical smears: application to cervical smears from cancer. *Br J Cancer* 2000; 82:1421-6.

193. Nobbenhuis M, Walboomers JM, Helmerhorst TI, Rozendaal L. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999; 354:20.

194. Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998 38:423-8.

195. Dunn EF, Unger ER, Sternberg M, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007;297:813-19.

196. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *Natl Cancer Inst* 1995; 87:796-802.

197. Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS* 2010; 118(6-7): 422-49.

198. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002;89(2):213-28.

199. Stanley M. A. (2012). Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 215–222.

200. Fertey J, Hurst J, Straub E, Schenker A, Iftner T, Stubenrauch F. Growth inhibition of HeLa cells is a conserved feature of high-risk human papillomavirus E8-E2C proteins and can also be achieved by an artificial repressor protein. *J Virol* 2011; 85(6) :2918-26.

201. Collins SI, Constandinou-Williams C, Wen K, et al. Disruption of the E2 gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus infection: a longitudinal cohort study. *Cancer Res* 2009; 69(9):3828-32.

202. Lowy DR, Howley PM. Papillomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams&Wilkins, 2001:2231-64

203. Inoue Y, Imamura T. Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci* 2008;99(11):2107-12.

204. Doobar J. An emerging function for E4. *Papillomavirus Rep* 1991;2: 145-7.

205. Schmitt M, Dalstein V, Waterboer T, Clavel C, Gissmann L, Pawlita M. Diagnosing cervical cancer and high-grade precursors by HPV16 transcription patterns. *Cancer Res* 2010;70(1):249-56.

206. Borzacchiello G, Roperto F, Campos MS, Venuti A. 1st International Workshop on

- Papillomavirus E5 oncogene-a report. *Virology* 2010; 408: 135-7.
- 207.** Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* 2009; 19 (2): 97-113.
- 208.** Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields' Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2197-229.
- 209.** Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005; 337:76-84.
- 210.** Ho L, Chan SY, Chow V, et al. Sequence variants of HPV type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenic tree. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1765-72.
- 211.** Chan S-Y, Chew S-H, Kiyafumi E, et al. Phylogenetic analysis of the human papillomavirus type 2 (HPV-2), HPV-27, and HPV-57 group, which is associated with common warts. *Virology* 1997; 239: 296-302.
- 212.** Lowy DR, Howley PM. Papillomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2231-64
- 213.** Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, et al. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res* 2010;70(8):3159-69.
- 214.** Munoz X, Bosch FX, de Sanjose S, et al.; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
- 215.** Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, Iftner T. Type-specific HPV infection and multiple HPV types: prevalence and risk factor profile in nearly 12,000 younger and older Danish women. *Sex Transm Dis* 2008;35(3): 276-82.
- 216.** Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, et al.; CVT Group. Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease. *J Infect Dis* 2011;203(7):910-20.
- 217.** Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:1-3.
- 218.** Lacey CJN, Lowndes C, Shah KV. Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine* 2006;24(3):S3/35-41.

219. Lowy DR, Howley PM. Papillomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields' Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2231-64.
220. Bosch FX, De Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst* (monograph) 2003;31:3-13.
221. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Wentzensen N, Gravitt PE. Human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;19(7):1675-81.
222. Castle PE, Shaber R, Lamere BJ, et al. Human Papillomavirus (HPV) genotypes in women with cervical precancer and cancer at Kaiser Permanente Northern California. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20(5):946-53.
223. Smith JS, Backes DM, Hoots BE, Kurman RJ, Pimenta JM. Human papillomavirus type-distribution in vulvar and vaginal cancers and their associated precursors. *Obstet Gynecol* 2009;113(4):917-24.
224. Nielsen A, Munk C, Kjaer SK. Trends in incidence of anal cancer and highgrade anal intraepithelial neoplasia in Denmark, 1978-2008. *Int J Cancer* 2011;129(3):733—41.
225. Kurman RJ, Schiffman MH, Lancaster WD, et al. Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia: a possible role for type 18 in rapid progression. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:293-6.
226. Castle PE, Rodriguez AC, Burk RD, et al.; Proyecto Epidemiológico Guanacaste Group. Long-term persistence of prevalently detected human papillomavirus infections in the absence of detectable cervical precancer and cancer. *J Infect Dis* 2011;203(6):814-22.
227. Darst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalences- cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:3812-5.
228. Armstrong DL, Roman A. The relative ability of human papillomavirus type 6 and human papillomavirus type 16 E7 proteins to transactivate E2F responsive elements is promoter- and cell-dependent. *Virology* 1997;239:238-46.
229. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50.
230. Munger K, Basile JR, Duensing S, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001;20:7888-98.
231. Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, Scheffner M.

Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1218-23.

232. Gonzalez SL, Stremlau M, He X, Basile JR, Munger K. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol* 2001;75:7583-91.

233. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Dürr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 1996;13:2323-30.

234. Duensing S, Munger K. Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. *Biochim Biophys Acta* 2001;1471:M81-8.

235. Duensing S, Lee LY, Duensing A, et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10002-7.

236. Duensing S, Duensing A, Crum CP, Munger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res* 2001;61:2356-60.

237. Skyldberg B, Fujioka K, Hellstrom AC, Sylvén L, Moberger B, Auer G. Human papillomavirus infection, centrosome aberration, and genetic stability in cervical lesions. *Mod Pathol* 2001;14:279-84.

238. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* 2000;275:6764-9.

239. zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 1991;184:9-13.

240. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *Natl Cancer Inst* (monograph) 2003;31:14-9.

241. Rylander E, Ruusuvaara L, Almstromer MW, Evander M, Wadell G. The absence of vaginal human papillomavirus 16 DNA in women who have not experienced sexual intercourse. *Obstet Gynecol* 1994;83(5, pt 1):735-7.

242. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, et al. Early natural history of incident, type-specific human papillomavirus infections in newly sexually active young women. *Cancer*

Epidemiol Biomarkers Prev 2011;20(4):699-707.

- 243.** Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucourt-Boulch D, Wheeler CM. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis* 2007;195:1582-9.
- 244.** Vaccarella S, Franceschi S, Snijders PJ, Herrero R, Meijer CJ, Plummer M. Concurrent infection with multiple human papillomavirus types: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:503-10.
- 245.** Oriel JD. Natural history of genital warts. *Br / Vener Dis* 1971;47:1-13.
- 246.** Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis* 2005;191(5):731-8.
- 247.** Barasso R, de Brux, Croissant O, Orth G. High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 1987;317:916-23.
- 248.** Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, et al. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2001;10:101-6.
- 249.** Syrjanen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS* 2010;118(6-7):494-509.
- 250.** Castle PE, Wacholder S, Sherman ME, et al. Absolute risk of a subsequent abnormal Pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. *Cancer* 2002;95:2145-51.
- 251.** Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370:890-907.
- 252.** Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* 2010;118(1 suppl):S12-7.
- 253.** Stanley M. Chapter 17: Genital human papillomavirus infections—current and prospective therapies. / *Natl Cancer Inst* (monograph) 2003;31:117-24.
- 254.** Park TJ, Fujihara H, Wright TC. Molecular biology of cervical cancer and its precursors- *Cancer* 1995;76:1890-1907.
- 255.** Miller A, Koutsky LA. Natural history and epidemiological features with HPV infection in the epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus In: Munoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A, eds. *The Epidemiology Human Papillomavirus and Cervical Cancer*. New York, NY: Oxford university Press, 1992:25-

52.

256. Taichman LB, La Porta RE The expression of papillomaviruses in epithelial cells. In: Salzman NP, Howley PM, eds. *The Papovaviridae*. Vol 2. New York, NY: Plenum Press, 1987:109-39.

257. Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R, et al. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *Natl Cancer Inst* 2008;100:513-7.

258. Bongura VR, Hatam LJ, Rosenthal DW, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and 11. *APMIS* 2010;118:455-70.

259. Mitchell MF, Tortolero-Luna G, Cook E. A randomized clinical trial of cryotherapy, loop electrosurgical excision for treatment of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gyneol* 1998;92:737-44.

260. Wang SS, Hildesheim A. Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:35-40.

261. Einstein MH, Burk RD. Persistent human papillomavirus infection: definitions and clinical implications. *Papillomavirus Rep* 2001;12:119-23.

262. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:485-90.

263. Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA, et al. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high- risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:226-36.

264. Meisels A. The story of a cell. *Acta Cytol* 1983;27:584-96.

265. Meijer CJLM, van den Brule AJC, Snijders PJF, et al. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer screening. In: Munoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A, eds. *The Epidemiology of Human Papillomavirus and Cervical Cancer*. Lyon, France: IARC Scientific Publications, 1992:271-81.

266. Ylitaio N, Sorensen P, Josefsson AM, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000;355:2194-8.

267. Moscicki AB, Palefsky J, Smith G, et al. Variability of human papillomavirus DNA testing in a longitudinal cohort of young women. *Obstet Gynecol* 1993;82:578-85.

- 268.** Herrero R, Muñoz N. Human papillomavirus and cancer. *Cancer Surv* 1999;33:75-98.
- 269.** Cox JT, Schiffman M, Solomon D; ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:1406-12.
- 270.** Richart RM. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol* 1968;10:748-84.
- 271.** Kiviat NB, Koutsky LA. Do our current cervical cancer control strategies still make sense? / *Natl Cancer Inst* 1996;88:317-8.
- 272.** Koutsky LA, Holmes KK, Crichtlow CW, et al. Cohort study of risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 associated with cervical papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992;327:1272-8.
- 273.** Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol* 2002;3:11-6.
- 274.** Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001;286:3106-14.
- 275.** Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al.; Females United to Unilaterally Reduce Endo/Ectocervical Disease (FUTURE) I Investigators. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med* 2007;356(19): 1928-43.
- 276.** Woodman CB, Collins S, Winter H, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001;357:1831-6.
- 277.** Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R, et al. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:315-24.
- 278.** Ostor AG. Natural history of CIN: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993;12:186-92.
- 279.** Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. / *Natl Cancer Inst* 2000;92:464-74.
- 280.** Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C, et al. Rate of and risks for regression of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescents and young women. *Obstet Gynecol*

2010; 116(6): 1373-80.

281. Castle PE, Schiifman M, Wheeler CM, Wentzensen N, Gravitt PE. Human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 19(7): 1675-81.

282. Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res* 2002;89:229-40.

283. Wang SS, Bratti MC, Rodriguez AC, et al. Common variants in immune and DNA repair genes and risk for human papillomavirus persistence and progression to cervical cancer. *Infect Dis* 2009;199(1):20-30.

284. Wang SS, Gonzalez P, Yu K, et al. Common genetic variants and risk for HPV persistence and progression to cervical cancer. *PLoS One* 2010;5(1):e8667.

285. Larson AA, Liao S-Y, Stanbridge EJ, et al. Genetic alterations accumulate during cervical tumorigenesis and indicate a common origin for multifocal lesions. *Cancer Res* 1997;57:4171-6.

286. Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer* 1999;80:2008-18.

287. Watanabe T. Flow cytometric evaluation of DNA ploidy pattern and cell heterogeneity in cervical dysplasia and carcinoma in situ. *Nippon Sanka Fujinka GakkaiZasshi* 1993;45:1381-8.

288. Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doe-beritz M. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin Cancer Res* 2004;10(9):3059-63.

289. Garnett GP, Waddell HC. Public health paradoxes and the epidemiological impact of a HPV vaccine. *J Clin Virol* 2000;19:101-11.

290. Levine AJ. P53, cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-31.

291. Sartor MA, Dolinoy DC, Jones TR, et al. Genome-wide methylation and expression differences in HPV(+) and HPV(-) squamous cell carcinoma cell lines are consistent with divergent mechanisms of carcinogenesis. *Epigenetics* 2011;6(6):777-87.

292. Virmani AK, Muller C, Rathi A, et al. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2001;7:584-9.

293. Takizawa S, Nagasaka K, Nakagawa S, et al. Human scribble, a novel tumor suppressor identified as a target of high-risk HPV E6 for ubiquitin-mediated degradation, interacts with adenomatous polyposis coli. *Genes Cells* 2006;11:453-64.

- 294.** Lee C, Laimins LA. Role of the PDZ domain-binding motif of the oncoprotein E6 in the pathogenesis of human papillomavirus type 31. *Virology* 2004;78:12366-77.
- 295.** Doorbar J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Diagnostic Markers* 2007;23:297-313.
- 296.** Patnick J. Cervical cancer control in Europe. *CME Journal of Gynecologic Oncology*. 2000;5:8-12.
- 297.** McCrory DC, Matchan BB, Bastain L. et al. Evaluation of cervical cytology. Evidence Report Technology Assessment (summ). 1999 Jan;(5):1-6
- 298.** Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol*. 1995;141:680-9.
- 299.** DeMay RM. Cytopathology of false negatives preceding cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* .1996;175:1110-3
- 300.** Shingleton HM, Patrick RL, Johnston WW et al. The current status of the Papanicolaou smear. *CA Cancer J Clin*. 1995;45:305-20
- 301.** Hakan Ozan. Pap smear ne zaman? nasıl? kimden? *TJOD - Uzmanlık Sonrası Eğitim ve Güncel Gelişmeler*. 2005;2:35-40.
- 302.** WHO meeting. Control of cancer of the cervix uteri. *Bull World Health Organ*. 1986;64:607-18.
- 303.** Buckley CH, Butler EB, Fox H. Cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol*. 1982;35(1): 1-13.
- 304.** Hakama M. Screening for cancer: for good or for bad. *Duodecim* .1991;107:1148-51.
- 305.** ACOG Practice Bulletin No.45 *Obstet Gynecol*. 2003;102:417-27.
- 306.** Klinkhamer PJ, Meerding WJ, Rosier PF et al. Liquidbased cervical cytology. *Cancer*. 2003;99:259-62.
- 307.** Limaye A, Connor AJ, Huang X et al. Comparative analysis of conventional Papanicolaou tests and a fluid-based thin-layer method. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127:200-4.
- 308.** Berek SJ, Adashi EY, Hillard AP. *Novak Jinekoloji*. 1998; 1:435- 458.
- 309.** Kişnişçi H, Gökşin E, Durukan T. *Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi* 1996; 1:885-887.
- 310.** Onan MA, Taskiran C, Bozdayi G, et al. Assessment of human papilloma viral load of archival cervical intraepithelial neoplasia by real-time polymerase chain reaction in a Turkish population. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 26: 632-5.

- 311.** Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 88: 63-73.
- 312.** Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006; 24: 26-4
- 313.** Halfon P, Benmoura D, Agostini A, Khiri H, Martineau A, Penaranda G, Blanc B. *J Clin Virol.* 2010 Feb;47(2):177-81. Epub 2009 Dec 22. Relevance of HPV mRNA detection in a population of ASCUS plus women using the NucliSENS EasyQ HPV assay.
- 314.** Sorbye SW, Fismen S, Gutteberg TJ, Mortensen ES. *J Virol Methods.* 2010 Oct;169(1):219-22. Epub 2010 Jul 16. HPV mRNA test in women with minor cervical lesions: experience of the University Hospital of North Norway.
- 315.** Ardiç N, Oztürk O, Ergünay K, Sezer O. *Mikrobiyol Bul.* 2009 Jul;43(3):463-9. Turkish. [Investigation of E6/E7 mRNAs of high risk human papilloma virus types by a commercial automatized NASBA assay in cervical swabs].
- 316.** Ergunay K, Misirlioglu M, Pinar F, Tuncer ZS, Tuncer S, Ustacelebi S. Investigation of human papilloma virus DNA in cervical samples with cytological abnormalities and typing of the virus. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41: 219-26.
- 317.** Waxman AG. Guidelines for cervical cancer screening, history and scientific rationale. *Clin Obstet Gynecol* 2005; 48: 77-97.
- 318.** Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-19.
- 319.** Cronje HS. Screening for cervical cancer in developing countries. *Int J Gynecol Oncol* 2004; 84: 101-108.
- 320.** Harper DM, Franco EL, Wheeler C, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 1757-1765.
- 321.** Arvas M, Gezer A. *Genital HPV. 1. Baskı. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, 2007.*
- 322.** Güner H, Taşkiran Ç. Serviks kanseri epidemiyolojisi ve human papilloma virus. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi* 2007; 4: 11-19.
- 323.** Özgül N. Türkiye’de serviks kanserinin durumu ve servikal kanser tarama çalışmaları. Tuncer AM. (eds.) *Türkiye’de Kanser Kontrolü.1. Baskı. Onur Matbaacılık,*

Ankara 2007: 349-358.

324. Ergeneli MH, Duran EH, Ergin T, Demirhan B, Erdogan M. Atypical squamous cells of undetermined significance. Clinical experience in a Turkish university hospital. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 96: 108-110.

325. Ergünay K, Mısırlıoğlu M, Fırat P, ve ark. Sitolojik olarak anomali saptanan serviks örneklerinde insan papilloma virus DNA'sının araştırılması ve virusun tiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bül* 2007; 41: 219-226

326. Ozelik B, Serin IS, Gokahmetoglu S, Basbug M, Erez R. Human papillomavirus frequency of women at low risk of developing cervical cancer: a preliminary study from a Turkish university hospital. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24: 157-9

327. Erensoy S, Erhan Y, Zeytinoglu A, Ozacar T, Ozdemir N, Bilgic A. DNA in situ hybridization in the diagnosis of human papillomavirus infection. *Clin Diagn Virol* 1996; 5: 219-23.

328. Ergunay K, Misirlioglu M, Fırat P, et al. Detection and typing of human papilloma virus by polymerase chain reaction and hybridization assay in cervical samples with cytological abnormalities. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42: 273-82.

329. Ergunay K, Misirlioglu M, Pinar F, Tuncer ZS, Tuncer S, Ustacelebi S. Investigation of human papilloma virus DNA in cervical samples with cytological abnormalities and typing of the virus. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41: 219-26.

330. Onan MA, Taskiran C, Bozdayi G, et al. Assessment of human papilloma viral load of archival cervical intraepithelial neoplasia by real-time polymerase chain reaction in a Turkish population. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 26: 632-5.

331. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 88: 63-73.

332. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006; 24: 26-4

333. Human Papillomavirus and Related Diseases Report - WORLD, Version posted on www.hpvcentre.net in March 20th, 2015

334. P Dursun, A Ayhan , L Mutlu , M Çağlar , A Haberal , T Güngör , M Özat , E Özgü , A Onan , Ç Taşkıran , H Güner , H Yetimalar , B Kasap , K Yüce *Turkish Journal of Pathology*. Volume 29, Issue 3, Pages 210–216, ISSN (Online) 1309-5730

335. G A Avcı, G Bozdayı, C Taskıran, S Ozkan, M A Onan *Türk Jinekoloji ve*

Obstetrik Derneği Dergisi, 2013; Cilt: 10, Sayı: 3, Sayfa: 151- 9

- 336.** Halfon P, Benmoura D, Agostini A, Khiri H, Martineau A, Penaranda G, Blanc B. J Clin Virol. 2010 Feb; 47(2):177-81. Epub 2009 Dec 22. Relevance of HPV mRNA detection in a population of ASCUS plus women using the NucliSENS EasyQ HPV assay.
- 337.** Sorbye SW, Fismen S, Gutteberg TJ, Mortensen ES. J Virol Methods. 2010 Oct; 169(1):219-22. Epub 2010 Jul 16. HPV mRNA test in women with minor cervical lesions: experience of the UniversityHospital of North Norway.
- 338.** Ardig N, Oztürk O, Ergünay K, Sezer O. Mikrobiyol Bul. 2009 Jul;43(3):463-9. Turkish. [Investigation of E6,E7 mRNAs of high risk human papilloma virus types by a commercial automatized NASBA assay in cervical swabs].
- 339.** C Baron, M Henry,C Tamalet,J Villeret,H Richet,X Carcopino J.Med. Virol. 87.1389–1396, 2015.