

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman: Prof. Dr. İlhan ONARAN

LINEAR ARRAY YÖNTEMİ İLE HUMAN PAPİLLOMA VİRÜS'ÜNÜN
(HPV) TİPLENDİRİLMESİNİN ADLİ TIP AÇISINDAN ÖNEMİNİN
ARAŞTIRILMASI

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülçin ŞENYİĞİT

Biyolog

İstanbul – 2014

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman: Prof. Dr. İlhan ONARAN

LINEAR ARRAY YÖNTEMİ İLE HUMAN PAPİLLOMA VİRÜS'ÜNÜN
(HPV) TİPLENDİRİLMESİNİN ADLİ TIP AÇISINDAN ÖNEMİNİN
ARAŞTIRILMASI

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülçin ŞENYİĞİT

Biyolog

İstanbul – 2014

İstanbul, 23 Temmuz 2014

**İ.Ü.ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA**

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 36.maddesi uyarınca Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nın yüksek lisans öğrencisi Gülçin ŞENYİĞİT'in,

'Linear Array Yöntemi ile Human Papilloma Virüs'ünün (HPV) Tiplendirmesinin Adli Tıp Açısından Öneminin Araştırılması'

Adlı tezi jürimizce tetkik edilmiş ve kendisine tez savunması yaptırılmıştır.

Yukarıda adı geçen tezin ve tez savunmasının kabul edilmesine oy birliğiyle karar verilmiştir.

Prof. Dr. Salih CENGİZ
Jüri Başkanı

Prof. Dr. İlhan ONARAN
Danışmanı

Prof. Dr. A. Coşkun YORULMAZ
Üye

Doç. Dr. E. Hülya YÜKSELOĞLU
Üye

Yard. Doç. Dr. Vecdet ÖZ
Üye

**Bu tez çalışması 12446 proje numarasıyla İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.*

TEŞEKKÜR

Prof.Dr. İlhan ONARAN, Prof.Dr. A. Coşkun YORULMAZ, Doç.Dr .E.Hülya YÜKSELOĞLU başta olmak üzere emeği geçen tüm hocalarıma,

Bu zorlu süreçte her zaman yanımda olan ve desteklerini asla esirgemeyen ablama ve anneme,

Varlığından güç aldığım, tüm çıkmazlarımda elimden tutup sabırla beni çözüme ulaştıran canım arkadaşım MSc. Bio.Duygu AYHAN'a,

teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL DİZİNİ	iv
TABLO DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. CİNSEL SALDIRILARDA BİYOLOJİK DELİLLER	3
2.1.1. Semen	4
2.1.2. Tükürük	5
2.1.3 Tırnak	5
2.1.4. Saç ve Kıl Örnekleri	5
2.1.5. Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar	7
2.2. HUMAN PAPİLLOMAVİRUS (HPV)	9
2.2.1. HPV Tanı Yöntemleri	14
2.2.1.1. Mikroskopi	14
2.2.1.2. Antijen Saptama	15
2.2.1.3. HPV L1 DNA InSitu Hibridizasyonu	15
2.2.1.4. HPV E6 ve E7 mRNA in Situ Hibridizasyon	16
2.2.1.5. Nükleik Asit	16
2.2.1.6. HPV RNA Saptanması	18
2.2.1.7. Serolojik Testler	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. ÖRNEK TOPLANMASI	21
3.2. VİRAL DNA'NIN EKSTRAKSİYONU	22
3.3. VİRAL DNA'NIN AMPLİFİKASYONU	24
3.3.1. PCR Hazırlık Aşaması	24
3.3.2. Örneklerin PCR Cihazına Yüklenmesi	24
3.3.3 PCR Döngü Parametreleri	25
3.4. VİRAL DNA'NIN GENOTİPLEMESİ	26
3.4.1. Genotiplemenin Hazırlık Aşaması	26
3.4.2. Deteksiyon Aşaması	27

3.5. VİRÜS DNA'SININ TİPLENDİRİLMESİ	29
3.6. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	29
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ	47
7. KAYNAKLAR	48
<i>Özet</i>	54
<i>Summary</i>	55
EKLER	56
ÖZGEÇMİŞ	62

ŞEKİL DİZİNİ

- Şekil 1** : İnsan saç örnekleri
- Şekil 2** : Human Papillomavirus (HPV)
- Şekil 3** : HPV genomu
- Şekil 4** : HPV enfeksiyonunun geçişi
- Şekil 5** : Biyolojik örneklerin saklandığı Thin-Prep
- Şekil 6** : Kuru ısı bloğu
- Şekil 7** : PCR Cihazı-GeneAmp 9700 (Applied Biosystems)
- Şekil 8** : Sıcak su banyosu
- Şekil 9** : Genotipleme tepsi
- Şekil 10** : Beta globin zincirleri çalışmayan örnekler
- Şekil 11** : A9 kodlu kadın katılımcıya ait test sonucu Tip 18, 62,66
- Şekil 12** : A9 kodlu kadın katılımcının partnerine ait test sonucu HPV negatif
- Şekil 13** : A15 kodlu kadın katılımcıya ait test sonucu HPV Tip 53, 61
- Şekil 14** : A15 kodlu kadın katılımcının partnerine ait test sonucu HPV Tip 53,61
- Şekil 15** : A19 kodlu kadın katılımcıya ait test sonucu HPV Tip 16, 39
- Şekil 16** : A19 kodlu kadın katılımcının partnerine ait test sonucu HPV Tip 16
- Şekil 17** : A13 kodlu kadın katılımcıya ait test sonucu HPV Tip 16
- Şekil 18** : A13 kodlu kadın katılımcının partnerine ait test sonucu HPV Tip 6

TABLO DİZİNİ

- Tablo I** : Spermilerin morfolojik özelliklerinin postkoital süre ile olan ilişkisi
- Tablo II** : HPV tiplerinin yüksek, orta (olası yüksek risk) ve düşük riskli olarak sınıflandırılması
- Tablo III** : PCR Döngü Parametreleri
- Tablo IV** : Çalışmaya Dahil Edilmeyen Örnekler
- Tablo V** : Kadınların HPV (+), Erkeklerin HPV (-) Olduğu Partnerler
- Tablo VI** : HPV Tipleri Uyum Göstermeyen Partnerler
- Tablo VII** : Tüm HPV Tipleri Uyum Gösteren Partnerler
- Tablo VIII** : HPV Tiplerinden Bazılarına Uyum Gösteren Partnerler
- Tablo IX** : Likelihood Ratio
- Tablo X** : Mann Whitney-U Test
- Tablo XI** : Biyolojik partnerler arasında HPV tiplerinin uyumu
- Tablo XII** : Kadın ve erkeklerde karışık gözlemlenen HPV tiplerinin toplam sayı içerisindeki görülme sıklığı
- Tablo XIII** : Hem kadınlarda ve hem erkeklerde birlikte gözlemlenen HPV tiplerinin toplam sayı içerisindeki görülme sıklığı

KISALTMALAR

ABI Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
CYBHCinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar
CMK Ceza Muhakemesi Kanunu
CMV Cytomegalovirüs
DNA Deoksiribonükleik asit
GGT Gama- glutamil transpeptidaz
HBV Hepatit B Virüsü
HCI Hybrid Capture
HCV Hepatit C Virüsü
HIV Human Immunodeficiency Virüs
HPV Human papillomavirüs
HSV Herpes simplex virüs
LCR Locus Control Region
ORFOpen Reading Frame
PAP Prostatik asit fosfataz
PCR Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PID Pelvik İnflamatuvar Hastalığa
RPM Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
RNA Ribonükleik asit
TCK Türk Ceza Kanunu
µl Mikrolitre
ml Mililitre

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Özellikle fizik muayene ve biyolojik delillerin negatif olduğu cinsel saldırı olgularında; çocuk ve yetişkin yaş gruplarında görülen cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların, saldırının delili olarak değerlendirilebileceği bilinmektedir (1-4). Cinsel yolla bulaşan hastalıklara (sexually transmitted diseases- STDs); HIV, Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Trichomonas vaginalis, Treponema pallidum, herpes simplex virus (HSV) ve bu çalışmada ele alınan Human papillomavirus (HPV) örnek verilebilir (5).

HPV; siğil etkeni yapan Papillomaviridae familyasına ait olan bir DNA virüsüdür. Kutanöz ya da mukozal dokuya özgü bilinen yaklaşık 118 genotipi mevcuttur (6). Bunlar arasında; 1- 4 tipleri ciltte yaygın siğiller yaparken, 6 ve 11 tipleri kondiloma aküminata diye adlandırılan anogenital siğillere neden olur. 16 ve 18 tipleri ise kadınlarda görülen servikal kanser ile ilişkilidir (1, 7).

Kondiloma aküminata, pediatrik olgularda daha çok perianal bölgede lokalizedir ve kız çocuklarda görülme oranı erkeklere göre 1.5 kat daha fazladır (1, 8-11). Görülme olasılığı açısından cinsiyet farklılığına yol açan birkaç faktör ileri sürülmüştür. Bunlar arasında kadın mukozasının enfeksiyona yatkınlığı, immün yanıt farklılıkları ve kızların daha sık olarak muayeneye getirilmesi yer almaktadır (9).

Farklı topluluklar içerisinde HPV tiplerinin farklı bir dağılım gösterdiği bildirilmektedir (12). Bu farklı dağılımı bir polimorfizm gibi düşünürsek, cinsel saldırıya maruz kalmış olgularda; istismara uğrayan kişiden alınan HPV örneklerinin, şüpheli kişiden alınan örnekler ile uyumlu olup olmadığının karşılaştırılması ile ilgili beklentiler de anlaşılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı; HPV pozitif olduğu bilinen kadın hastalardan ve biyolojik partnerlerinden alınan servikal smear ve üretral akıntı örneklerinde saptanan HPV'nin tiplendirilmesidir. Böylelikle virüsün 37 farklı tipinin partnerler arası uyumluluğunun bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. Zira klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda söz konusu uyumluluk ile ilgili veriler bulunmasına rağmen bu konunun Türkiye'deki mevcut imkanlar dahilinde adli amaçlı sanığa yönelik kimliklendirmede kullanılabilirliği yeterince araştırılmamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.CİNSEL SALDIRILARDA BİYOLOJİK DELİLLER:

Cinsel saldırı, rızası olmayan veya herhangi bir nedenle (yaşının küçüklüğü veya akıl hastalığı) rızası kabul edilmeyen bir kişinin farklı zorlamalarla cinsel içerik taşıyan bir davranışa maruz kalması olarak tanımlanmakta ve insanın temel hak ve özgürlüklerine, bireysel özerkliğine ve bütünlüğüne yönelmiş en ağır fiziksel saldırı türlerinden biri olarak değerlendirilmektedir (13).

5237 s. TCK'da cinsel dokunulmazlığa karşı suçlar, "cinsel saldırı"(m.102) "çocukların cinsel istismarı"(m.103), "reşit olmayanla cinsel ilişki"(m.104) ve "cinsel taciz"(m.105) başlıkları altında dört ana grupta ele alınmıştır (13).

Adli olgu kapsamında şüpheliden ya da mağdurdan biyolojik ve kimyasal incelemeler yapılabilmesi amacıyla biyolojik materyal alınabilmesi için Mahkeme veya hakim kararı ve kişinin aydınlatılmış onamı alınmış olması gerekmektedir. Ceza Muhakemesi Kanunu'nun (CMK) 75-82. maddeleri şüpheli, sanık veya diğer kişilerin beden muayeneleri, vücuttan örnek alınması, moleküler genetik incelemeler, fizik kimliğin tespiti konularını içermektedir (14).

Adli olayların çözülmesinde delil değeri olan biyolojik lekeler, adli tıbbın ve adli tıp araştırmacılarının en önemli konularından biridir. Olay yerinde tespit edilen bir biyolojik lekenin incelenmesinden, olayın içeriği hakkında bilgi sahibi olunabileceği gibi, olaydaki mağdur ve sanığın kimliklerinin tespiti de yapılabilmektedir. Adli Tıp açısından en önemli biyolojik lekeler; meni, tükürük, tırnak, saç, kan, sümük, kusmuk, balgam, cerahat, mekonyum, gaita, idrar, vajen ifrazatı, verniks kazeoza, amniyon sıvısı, anne sütü ve kolostrum lekesidir (15).

2.1.1. Semen

Seminal plazma olarak bilinen ve spermatozoa içeren sıvı, semen olarak adlandırılmaktadır (15). Cinsel saldırılarda araştırılan tek laboratuvar bulgusu spermiler değildir. Özellikle azospermi varlığında semende bulunan Prostat spesifik antijen (p30), Prostatik asit fosfataz (PAP), Gama- glutamil transpeptidaz (GGT), Çinko gibi spesifik ya da spot testler kullanılmaktadır (13,15). Spermilerin morfolojik özellikleri saldırı sonrası süre konusunda ciddi bulgular elde edilmesini sağlamaktadır (15) (Tablo 1).

Tablo I. Spermilerin morfolojik özelliklerinin postkoital süre ile olan ilişkisi

Hareketli sperm	Vajina	8-12 saat
	Serviks	3-5 gün
	Uterus	48 saat
Hareketsiz sperm	Vajina	24 saat – 5 gün
	Serviks	17 gün
	Rektum	24 saat
	Kumaş	12 – 25 ay
Kuyruklu sperm	Vajina	18 – 26 saat
	Anüs	6 saat
	Rektum	6 saat
	Ağız	3 saat
Spermin baş kısmı	Vajina	24 – 120 saat
	Serviks	179 saat
	Anüs	45 saat
	Rektum	65 saat
	Ağız	6 saat

2.1.2. Tükürük

Olay yerinde ve mağdur ve saldırganların üzerinde bulunması muhtemel vücut sıvılarından biri olan tükürük fail/failler ile olay yeri ve mağdur arasında bağı sağlayan en önemli delillerdendir. Bazı olaylarda tek başına tespit edilebileceği gibi, cinsel saldırı gibi olaylarda semen, kan, ter gibi diğer biyolojik sıvılarla karışmış halde bulunabilmektedir. Emmeye ve ısırmağa bağılı lezyonlara boyunda, kulak altında, omuz üst bölümlerinde, göğüslerde, meme başı etrafında ve gluteal bölgelerde sıklıkla rastlanmaktadır. Bunun yanı sıra vücutta görünen diş izlerinde de yine kolaylıkla tespit edilebilmektedir (15,16).

2.1.3. Tırnak

Cinsel saldırılarda mağdurun kendini savunması amaçlı yaşanan boğuşma esnasında tırnak diplerinde faile ait epitel hücrelere rastlanabilir. Bu bakımdan tırnak dipleri, bir iz olup olmadığının araştırılması için bakılması gereken yerlerden biridir. (15,16)

2.1.4. Saç ve Kıl Örnekleri

Kıllar çok miktarda her yerde bulunabildiği gibi, vücudun değişik bölgelerinden de transfer olabilmektedirler (saç telleri, sakal, bıyık, göğüs, genital bölgeler, koltuk altı kılları gibi). Kıl bulunan materyaller (iç ve dış giyim eşyaları, şapka, başlık, çarşaf, yastık, halı, kilim gibi materyaller) mümkünse olduğu gibi paketlenerek gönderilirse laboratuvar koşullarında incelenerek bulunmaları daha kolay ve sağlıklı olacaktır. Kıl örneklerinin karşılaştırılması hem genetik olarak hem de fiziksel benzerliklerine bakılarak yapılmaktadır. (Şekil 1). Dolayısıyla olay yerinde kıl örneği bulunduysa fiziksel mukayesenin yapılabilmesi için olayla ilgili kişilerden de mutlaka mukayese amaçlı kıl örnekleri alınması gerekmektedir. Cinsel saldırı olaylarında pubik bölge, yabancı kıl aramak için taranmalıdır. Mağdurda bulunan ona ait olmayan yabancı veya şüpheli kıllar bir pensle alınarak zarfa konulur. Kıllarda meni bulaşığı ve yabancı materyaller bulunup bulunmadığı incelenmelidir (15-18).



Şekil 1. İnsan saç örnekleri

Biyolojik delil elde edilemeyen cinsel saldırı olgularında suçun ispatlanması ve zanlının ortaya çıkarılması adli bilimler için büyük bir sorun teşkil etmektedir. Özellikle gebelikle sonuçlanmayan vakalarda delil elde etmek son derece güçleşmektedir. Bu gibi durumlarda adli makamlar destekleyici delillere ihtiyaç duymaktadır. Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların, saldırının delili olarak değerlendirilebileceği bilinmektedir (13).

2.1.5.Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar

Cinsel saldırı olgularında destekleyici fiziksel delillere ulaşamadığı durumlarda, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların laboratuvar analizleri ile belirlenmesi ve incelenmesi tıbbi kanıt olması açısından değer taşımaktadır (19, 20).

En yaygın bulaşma şekli korunmasız cinsel ilişki olan, genellikle üretral, vajinal akıntı ve ülserasyon gibi belirtiler gösteren ancak sıklıkla asemptomatik seyreden veya genital olmayan sistemik bulgular gösteren bir grup hastalık cinsel yolla bulaşan hastalıklar (CYBH) adı altında toplanmaktadır. CYBH son yıllarda giderek artan prevalansı ve etkenleri ile ciddi bir halk sağlığı problemidir. Dünyada her yıl 250 milyonu aşan yeni olgu bildirilmektedir (21). Bildirimi zorunlu hastalıkların izleme sistemleri iyi olan ülkeler için vaka bildirimleri yaklaşık sayıları vermede ve gerçek rakamların tahmininde iyi bir ölçü olmasına rağmen, CYBH alanında gerçek enfeksiyon sayılarını bilmek güçtür, çünkü bu enfeksiyonların birçoğunun özgün ve bariz semptomları yoktur ve asemptomatik seyretmektedir. WHO verilerine göre dünyada 62 milyon gonore, 89 milyon klamidya, 12 milyon sifiliz, 170 milyon trikomoniyazis vakası bulunmakta ve bunların %50'den fazlası Asya ve Afrika'dan bildirilmektedir (21).

CYBH'da semptomlar ortaya çıkmadan önceki latent veya inkübasyon evresi, tipik olarak uzundur ve bunun en önemli sonucu da kişinin hasta olduğunu bilmemesi, dolayısıyla da bulaştırıcı olmasıdır. CYBH'lara neden olan etkenlerin genetik yapılarındaki değişkenlikler nedeniyle, Hepatit B Virüsü (HBV) ve Human Papillomavirüs (HPV) hariç, diğerlerine karşı aşı geliştirilememiştir ve bu hastalıklar sadece yol açtıkları akut sorunlar nedeniyle değil, uzun süreli zararlı etkileri nedeniyle de önemlidirler (21).

CYBH'e neden olan mikroorganizmalar vücuda vajen, serviks, üretra, rektum ve farenks gibi mukoza ile kaplı bölgelerden girerler. Her türlü cinsel temas en önemli bulaş yoludur. CYBH'ler bakteriyel, parazitik, fungal ve viral olmak üzere 4 ana başlıkta incelenmektedir.

Cinsel yolla bulaşan bakteriyel hastalık etkenleri *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Haemophilus ducreyi*, *Calymmatobacterium granulomatis*, *Gardnerella vaginalis*, B grubu

streptokoklar, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., EPEC, *Mobiluncus* sp.'dir. Bunların arasından en yaygın olarak görülen *Chlamydia trachomatis*; insan göz ve genital organlarında infeksiyona neden olan sık görülen bir patojendir. Sistit, vajinal akıntı, pelvik ağrı, Pelvik İnflamatuar Hastalığa (PID) ve bunun neden olduğu kısırlık, dış gebelik ve düşük gibi sonuçlara sebebiyet vermektedir. Nadir görülmekle birlikte, klamidyä gözleri ve eklemleri etkileyebilir ve bu duruma 'Reiter Sendromu' denir. *Neisseria gonorrhoeae*'nin neden olduğu 'Bel Soğukluğu' ve *Treponema pallidum*'un neden olduğu 'Frengi-Sifiliz' de bakteri kökenli CYBH arasında bulunmaktadır (21, 22).

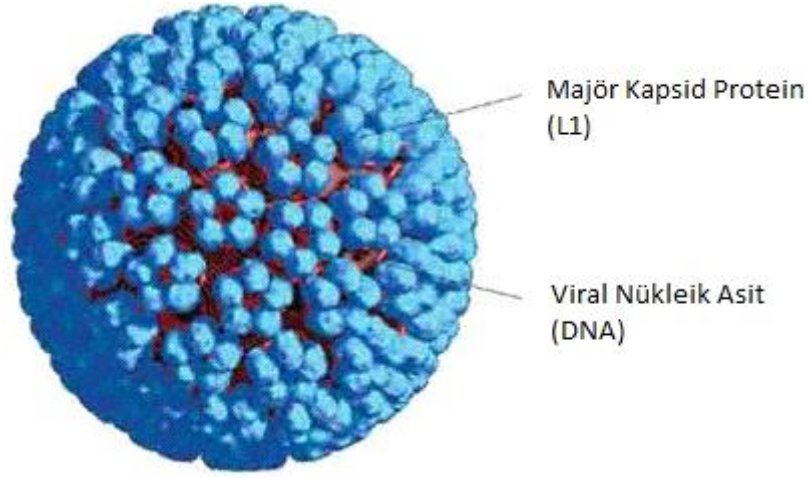
Trichomonas vaginalis, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*, *Phthirus pubis*, *Sarcoptes scabiei*, *Pediculus humanus* ise parazitik etkenler arasında gösterilirken, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum*, *Trichophyton* gibi mantarlar da CYBH içerisinde yer almaktadır (22).

CYBH'lara sebep olan virüsler arasında Herpes simplex virüs (HSV) Tip1 ve Tip2, Hepatit B Virüsü (HBV), Hepatit C Virüsü (HCV), Cytomegalovirüs (CMV), Human Immunodeficiency Virüs (HIV), *Molluscum contagiosum* virüsü, Enterovirus'lar, Adenovirus ve Human Papillomavirüs (HPV) yer almaktadır (1-5, 21, 22).

2.2.HUMAN PAPİLLOMAVİRUS (HPV)

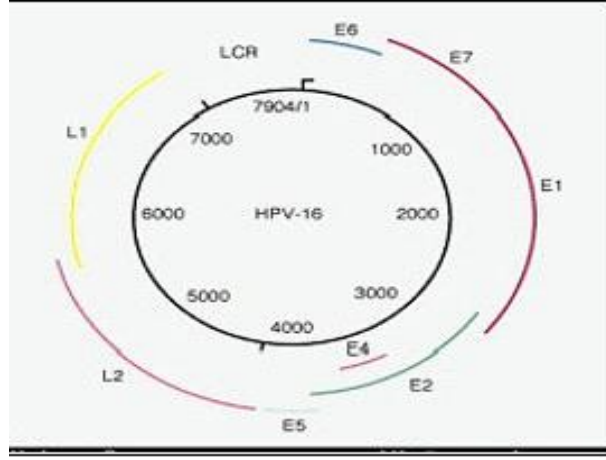
Human Papillomavirüs (HPV) bir konaktan diğere deneysel olarak geçirilen ilk tümör virüsüdür. İlk olarak Licht, (1894) kardeşinden kendisine siğil materyalini inoküle ederek siğilleri geçirmeyi başarmıştır. Ciuffo 1907 yılında, Serra bir yıl sonra (1908) siğil materyalinin hüresiz filtratları ile siğillerin oluşturulabileceğini göstermişlerdir. Steril ekstratlar kullanarak gönüllülere siğilleri başarı ile geçirebilmişlerdir (23). Melrick (1962) papillomavirusları, polyomaviruslarla birlikte papovaviridae familyasına dahil etmiştir (24). Siğillerin geçişi ile ilgili ilk raporlarda insan siğil virüsünün sadece bir tipinin olduğu, enfeksiyon bölgesinin ve muhtemelen hastanın genetik yapısının kutenöz siğil, mukozal condyloma ve papillomaların klinik görünümünü tayin ettiği açıklanmıştır (25). Ancak kanser virüslerini hücre kültürlerinde üretilememesi nedeniyle, 1970'lerde moleküler klonlama tekniklerinin kullanıma girmesine kadar papillomavirüslerle yapılan çalışmalar yavaş ilerlemiştir (26). Buna karşılık son yıllarda human papillomavirüsün farklı tiplerinin tanınması ve özellikle bazı HPV tiplerinin benign, premalign ve malign ve malign skuamoz lezyonların oluşmasında rolünün olduğunun tespiti bu virüslere ilgiyi arttırmıştır (27, 28).

HPV; ikozahedral kapsidi 50-55 nm çapında olan, zarfsız bir DNA virüsüdür ve 72 kapsomer oluşturan iki yapısal proteinden meydana gelmiştir (29). Viral genom çift sarmalı çembersel yapıda olup, yaklaşık 5×10^6 dalton ağırlığındadır ve ortalama 8000 baz çiftinden oluşmuştur (24).



Şekil 2. Human Papillomavirus (HPV)

HPV DNA'sı, sekiz "ORF: open reading frame" kodlayan, birden fazla proteinin aynı mRNA'dan sentezlendiği bir yapıyı da kapsayan DNA genomu içerir (30). HPV gen ürünleri; erken (E) ve geç (L) olarak adlandırılan; sekiz erken gen (E1'den E8'e) ve iki geç gen (L1 ve L2) içerir (Şekil 2). Belirtilen sekiz erken gen ile L1, L2 olarak belirtilen iki geç gen bulunmaktadır. E1 ve E2 ORF'u, viral DNA replikasyonundan sorumludur (23, 31). E2'nin aynı zamanda, E6 ve E7 onkogenlerinin ekspresyonundan sorumlu erken viral düzenleyiciler üzerinde baskılayıcı aktivite gösterdiği belirlenmiştir (32-34). E3'ün gen fonksiyonu hakkında bilgi kısıtlıdır ancak bazı gruplar bu bölgeden yüksek riskli genotiplemede yararlanmaktadır. E4, hücre iskeletinin değişimi ile ilişkilendirilmiştir. E5, zayıf transforme edici aktiviteye sahip bir membran proteini kodlar (35-37). E8E2C'nin amino-terminal 21 amino asidi, persistan enfeksiyon sırasında viral kopya sayısını kontrol eden yeni, transfer edilebilir DNA replikasyonu baskılayıcı bölümüdür (38). L1 ve L2 viral kapsid proteinlerini kodlar. Ek olarak; L1 geni, HPV tiplemesinde kullanılabilecek sekans heterojenitesine sahiptir. L1, ilerideki bölümlerde tartışılacağı gibi moleküler tanı testlerinde kullanılan temel gen bölgesidir. (Şekil 3) Locus Control Region (LCR), HPV genomunun kodlanmayan uzun kontrol bölgesidir (24).



Şekil 3. HPV genomu (www.medscape.com, 2005)

HPV'lerin sınıflandırılması önceleri mukozal ve kutanöz bölgelere olan eğilimlerine göre yapılırken, bugün DNA dizi homolojisi göz önünde bulundurularak yapılmaktadır (39).

Eskiden Papovavirüs olarak isimlendirilen virüs ailesi artık iki virüs ailesine bölünmüştür. Papillomavirüsler, polyomavirüslerden ayrı bir taksonomik aile (Papillomaviridae) olarak ele alınmaktadır. Bilinen papillomavirus tipleri 118'den fazla olup sürekli yeni tipler eklenmektedir (6). Tip, subtip ve varyantlar için taksonomik kriter L1 kapsid geni sekans farklılıkları temeline dayanır. %10 sekans farkı tipleri, %2-10 farklılık subtipleri ve < %2 farklılık varyantları oluşturur (6).

HPV, duyarlı dokular temelinde kutanöz ve mukozal olarak ayrılabilir. Mukozal HPV'ler içerisinde servikal kanserle ilişkili bir grup bulunmaktadır. HPV ile ilişkili serviks kanseri tüm kanserlerin %12'sini oluşturmaktadır. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, onkojenik HPV DNA'sının konak genomuna integrasyonunun servikal neoplaziye yol açan gerekli bir prekürsör olduğunu ortaya koymuştur (40-49). Yapılan epidemiyolojik çalışmada; 1918 serviks kanserli kadın ve kontrol grubu olmak üzere 1928 kanseri olmayan kadından oluşturulan çalışma grubunda HPV varlığı ve tipleri karşılaştırılmıştır (50). Yapılan araştırma sonucunda; kanserli grupta HPV'nin prevalansı %90,7 olarak tespit edilmiş iken, kontrol grubunda %13,4 olarak bulunmuştur.

Tüm kadınlarda yapılan HPV tiplerine göre yüksek, orta (olası yüksek risk) ve düşük riskli olarak sınıflandırılmıştır. (Tablo 2). Önceleri serviks kanserine katkısı olabileceği düşünülen; sigara kullanımı, kontraseptif kullanımı ve ilk menstürasyon yaşı gibi kofaktörlerin, bu çalışmada, serviks kanseri oluşumuna katkısı olmadığı saptanmıştır. İkizler ile yapılan çalışmalarda sözü edilen genetik faktörler henüz aydınlatılmamıştır (51).

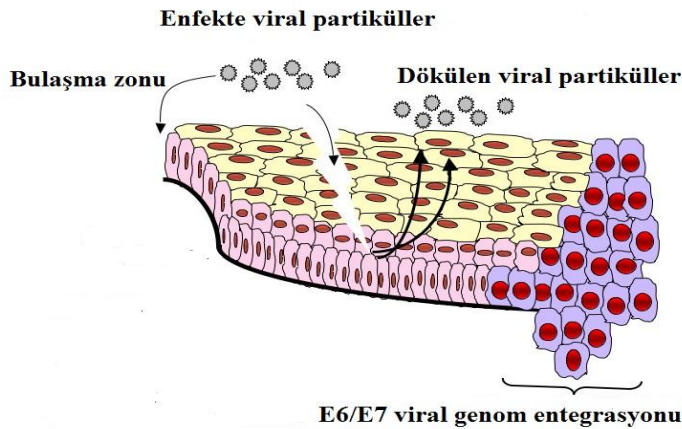
Tablo II. HPV tiplerinin yüksek, orta (olası yüksek risk) ve düşük riskli olarak sınıflandırılması

<i>Klinik belirtileri</i>		<i>Hpv Tipleri</i>
Deri	Siğiller	2, 4, 26, 27, 29, 57
	Plantar siğiller	1, 2, 4
	Flat siğiller	3, 10, 28, 49
	Butcher's siğiller	7
	Epidermodyplasia verruciformisa	2, 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 25, 36, 37, 46, 47, 50
Nongenital mukoza	Oral mukoza	13, 32
	Tekrarlayıcı respiratuvar papillomatoz	6, 11
	Baş ve boyun kanserleri	2, 6, 11, 16, 18, 30
Genital mukoza	Genital siğiller (kondiloma aküminata)	6, 11, 42, 43, 44, 54
	Düşük riskli HPV	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108
	Orta derecede riskli HPV	26, 53, 66
	Yüksek Riskli HPV	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82

HPV; dünyada cinsel yolla bulaşan virüsler arasında görülme sıklığı en yaygın olanıdır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ‘Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) ’ verilerine göre; dünyada seksüel aktif kadın ve erkeklerin yaşam boyu HPV ile enfekte olma olasılığı en az % 50 olarak bildirilmiştir. Önceki çalışmalar biyolojik partnerlerin HPV tip uyumunu %2-%40 olarak verirken, HPV DNA deteksiyon metodlarının devreye girmesi ile bu oran %-37- %68 olarak belirtilmektedir (52). Bilinen HPV'nin 100'den fazla farklı genotipi olduğu ve bunların yaklaşık 40'ının insan genital mukozasını enfekte ettiği bilinmektedir (53).

HPV kolayca bulaşabilen son derece enfeksiyöz bir ajan olarak kabul edilir. Enfeksiyonun viral partiküllerin epitelyumdaki mikroyarıklar yoluyla hücrelere girdiği tahmin edilir. Virüs DNA'sı çoğalır ve transkribe olur. Kapsid proteinlerinin yapımı ile keratinositlerin nükleuslarında viral partiküller oluşmaya başlar. Seksüel partner sayısının fazla olması, seksüel aktivasyonun erken yaşta başlaması, oral kontraseptif kullanılması ve sigara kullanımı HPV enfeksiyonu için risk faktörleridir (24, 54, 55).

HPV inaktivasyona direnç göstermekte ve mobilya yüzeyleri, banyo zeminleri ve havlular gibi cansız nesnelere bulaşabilmektedir. Asemptomatik taşıyıcılık bulaşı kolaylaştırabilmektedir (56). HPV enfeksiyonu deri ya da mukozadaki çatlaklardan doğrudan temasla, seksüel birleşme sırasında ya da bebeğin doğum kanalından geçişi esnasında kazanılmaktadır (Şekil 4).



Şekil 4. HPV enfeksiyonunun geçişi

2.2.1.HPV Tanı Yöntemleri:

HPV standart hücre kültürü sistemlerinde üretilememektedir. Serolojik testlerin ise tanıda kullanımları çok kısıtlıdır. Bu nedenle özellikle servikal örneklerde HPV varlığının gösterilmesi ve etken tiplerin belirlenebilmesi amacıyla hemen hemen sadece moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla farklı moleküler tekniklere dayanan in-house ve ticari birçok tanı testi bulunmaktadır (57).

2.2.1.1. Mikroskopi

Son 20 yılda moleküler biyoloji geliştikçe, HPV enfeksiyonunun morfolojik değerlendirmesi serviks kanser taramasında yetersiz hale gelmiştir. Moleküler tanı yöntemleri, laboratuvarcıların HPV enfeksiyonunu morfolojik değişiklikler öncesinde saptamasına olanak sağlamıştır ve en önemlisi araştırmacıların HPV'nin hücre transformasyonu ve serviks kanseri gelişimindeki rolünü belirlemesine yardımcı olmuştur. Moleküler teknolojiye yakın dönem gelişmeleri, hücresel transformasyona işaret eden moleküler değişiklikler ve serviks kanserine yol açan geç olayları saptamaya olanak sağlamıştır. Bazı klinisyenler, özellikle lezyona ulaşımın az ihtimal olduğu durumlarda servikografi kullanımını önermektedir (58). Servikoskopi, %3-5 asetik asit solüsyonunun veya bazı durumlarda floresan boyaların doğrudan uygulanmasını içerir. Daha sonra serviksin gözlenmesi kolposkop yardımı ile olur. Kesitsel çalışmalar, inspeksiyonun, yüksek dereceli lezyonları saptamada duyarlılığının %66-96, özgüllüğünün %64-98 olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak pozitif prediktif değer %10 ile 20 arasında, negatif prediktif değer %92 ile %97 arasında değişmektedir. Bu çalışmaların sonuçları inspeksiyonun duyarlılığının sitoloji ile benzer olduğunu ancak özgüllüğün sitolojiden daha düşük olduğunu ileri sürülmektedir (59,60).

2.2.1.2. Antijen Saptama

Klinik laboratuvarlarda servikal biyogöstergelerin saptanması, HPV antijenlerinin saptanmasından daha yaygın olarak kullanılmıştır. Bu göstergeler, HPV'nin oluşturduğu hücrenel transformasyon sonucu bozulmuş olan konak proteinleridir. Hücrenel transformasyon, E6 ve E7'nin artmış ekspresyonu ve bunun sonucunda tümör baskılayıcı RB ve p53 genlerinin inaktivasyonu ile oluşur. Bu tümör baskılayıcı genler, çeşitli hücre döngü düzenleyici proteinleri ile etkileşir. E7, siklin bağımlı inhibitör geni p^{16INK4A}'nın negatif düzenleyicisi olan RB'ü inaktive eder p^{16INK4A}'nın artmış ekspresyonu displastik serviks hücrelerinin göstergesidir. P16 göstergesi, klinik olarak hücreler ve dokularda (ağırlıklı) kullanılmaktadır. Bu protein gösterge, LSIL'den invaziv servikal lezyonlara kadar atipik hücreleri saptamada %82 duyarlılık ve %84 özgüllüğe sahiptir (61-63). KI-67, proliferen hücre nükleer antijen, cdc2, cdc6 ve Mcm gibi hücre döngüsüne (DNA replikasyonu) bağımlı antijenler de yaygın klinik kullanımı olmamakla beraber araştırılmaktadır (64, 65). MN transmembran glikoprotein antijeni çalışılmış ve özgüllüğü yüksek olmakla beraber anormal hücrelerdeki duyarlılığının düşük olduğu belirlenmiştir (66, 67). Epidermal büyüme faktörü reseptörü, transferrin reseptörü ve trombosit derive büyüme faktörü reseptörleri, epitelyal hücre transformasyonunda görevli olduğu düşünülen büyüme faktörü reseptörleridir (46). Bu reseptörler, HPV E5 proteini ekspresyonu ile bağlantılı bulunmuştur HPV enfeksiyonu sonucu oluşmuş servikal anomalilerin diğer göstergeleri yoğun araştırma konusudur (37, 46, 68, 69).

2.2.1.3. HPV L1 DNA InSitu Hibridizasyonu

Lamlar üzerinde HPV DNA insitu hibridizasyonu için kullanılan pek çok otomatize sistem bulunmaktadır. Ventana BenchMark Boyama Sistemi immünohistokimya ve floresan / kromojenik in situ hibridizasyonu birleştiren bir sistemdir. INFORM HPV (Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, Ariz.) sistemi yüksek riskli HPV tipleri 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 56, 58, 59, 68 ve 70 ve düşük riskli HPV tipleri 6, 11, 42, 43, ve 44'ü saptayabilmektedir. Test, sıvı temelli Pap örneklerinde ve doku örneklerinde 6 saatten daha kısa sürede uygulanabilmektedir. Testin duyarlılığı

hücrede 25 HPV kopyası olup kromoforun yerleşimi ve boyanmanın paterni (homojen veya noktalı) epizomal ve integre HPV DNA formunun göstergesi olabilir. Birçok çalışma, testin, rapor edilmiş %86 duyarlılık ve %90 özgüllük değerlerine göre pozitif prediktif değerinin yüksek dereceli servikal lezyonlar için %60, negatif prediktif değerinin %97 olduğunu göstermiştir (70). Benzer olarak, GenPoint System (Dako, Glostrup, Denmark) HPV 16,18, 31, 33,35,39,45, 51, 52,56, 58, 59 ve 68'e hedeflenmiş biyotinli hibridizasyon problemlerini saptayan tiramid-bazlı sinyal amplifikasyon stratejisini kullanmaktadır. Bu sistemin avantajlarından biri HPV'yi, formalin-fikse, parafin doku kesitleri veya çeşitli hücre preparatlarında saptayabilmesidir. Yapılan çalışmalarda, testin özgüllüğünün yüksek (>%95) olduğu ancak CİN 2 ve üzerinde duyarlılığın relatif olarak daha zayıf olduğu gösterilmiştir (%75) (70). Yeni donanımlar oldukça zahmetli olan manuel boyama işlemini kolaylaştırmıştır.

2.2.1.4. HPV E6 ve E7 mRNA in Situ Hibridizasyon

Tipe özgü PCR ve Hibrid Yakalama II (HCII) gibi HPV testlerinin çoğu onkojenik genotiplere özgü L1 DNA'nın varlığını saptamakla beraber onkojenik HPV tiplerinin sadece küçük bir bölümü kansere ilerler (71). Lezyonun ağırlığı ile E6 ve E7 gen ekspresyon paterni değişiklik gösterir. Temelde, yüksek dereceli lezyonlarda, düşük dereceli lezyonlara göre E6 ve E7 gen ekspresyon düzeyi artar bu da E6 ve E7 gen ekspresyon düzeyini, normal ve neoplastik hücreler arasında fonksiyonel bir ayırt edici haline getirmektedir. HPV OncoTect (Invirion Diagnostics, LLC) testi flow sitometri kantifasyonu ile E6 ve E7 mRNA'nın artmış ekspresyonunu saptar. Bu testin performansının, yüksek dereceli lezyonların saptanmasında, HPV DNA genotiplemeden (HCII ve tipe özgü PCR) daha iyi olduğu rapor edilmiştir (72).

2.2.1.5. Nükleik Asit

Bu bölümde açıklandığı gibi, HPV nükleik asit (DNA) testlerinin, serviks kanseri tarama algoritmasında yeri vardır. HPV taraması ve /veya hücrelerin HPV ile transformasyonu ile ilişkili biyogöstergeler yoğun araştırma alanlarıdır. HPV testleri

hakkında tartışmalı konular bulunmaktadır. Kadın genital sistemi, çeşitli enfeksiyöz etkenlere karşı yapısal ve fonksiyonel bariyer görevi gören karmaşık hücre topluluklarından oluşur. Kadın genital sistemi, epitelyal hücreler ile kaplıdır; vajina ve ektoservikte skuamöz epitelyal hücre tabakası, endoservikal kanalda kolumnar epitelyal hücrelerine değişir. Geçiş bölgesi transformasyon zonu (T-zone) olarak isimlendirilir. Servikal ve vajinal mukozada T ve B lenfositler, makrofajlar, dendritik hücreler, Langerhans hücreleri ve polimorfonükleer nötrofiller bulunur. Bu kompleks hücre karışımında, HPV, vajina ve ektoserviksin skuamöz hücrelerini ve endoserviksin kolumnar hücrelerini enfekte eder. HPV nükleik asidinin, özellikle L1 geni (DNA) saptanması serviks kanseri tarama algoritmasının en sık uygulanan yöntemidir. Bu yöntemlerden biri olan sıvı hibridizasyon, bir sinyal amplifikasyon hibridizasyon teknolojisi olup servikal sitoloji örneklerinden DNA saflaştırılması ardından komplementer RNA probu ile DNARNA hibridi oluşturulması temeline dayanır (73, 74). Hybrid Capture Testi (HCII; Digene, Gaithersburg, Md.) yüksek risk probu, yüksek riskli HPV tiplerinden 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68'i saptayabilmektedir (50). Çalışmalar testin çok duyarlı olduğunu (%93) ve yüksek negatif prediktif değere (%99) sahip olduğunu göstermiştir (74). Çoğu HPV enfeksiyonun değişken doğası nedeni ile genel popülasyonda CIN 2, CIN 3 veya invaziv kanserde, testin pozitif prediktif değerinin (%17-33) düşük olduğu rapor edilmiştir (62). Yüksek risk probunun bazı düşük riskli HPV tipleri ile çapraz reaksiyonu bildirilmiştir. %5-10 olguda belirsiz sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu testin avantajı FDA onaylı olması ve serviks kanseri taramasında testin kullanılabilirliğini destekleyen pek çok klinik çalışmanın bulunmasıdır (71, 73-75). Bu testin dezavantajları analitik duyarlılığı artırmak için fazla miktarda DNA'ya gereksinim duyması ve göreceli olarak düşük özgüllüğe sahip olmasıdır. Araştırma laboratuvarlarında HPV saptanmasında klasik olarak MYB09 ve MYB11 konsensüs primerlerinin kullanıldığı PCR'dan yararlanılmaktaydı. L1 genindeki sekans farklılıkları temeline dayalı tipe özgü PCR testlerinin, serviks kanseri tarama algoritmasında kullanımı konusunda klinik çalışmalar yapılmaktadır. Ticari olarak mevcut HPV PCR testleri HPV tiplerini saptamak için 2 farklı formattan yararlanmaktadır (Roche Diagnostics, Pleasanton, Calif.). Bu testin mikroplak formatında olanında yüksek riskli HPV tipleri 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59 ve 68 ve line blot assay veya linear array testlerinde yüksek riskli HPV tipleri 16,18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 66,

67, 68, 69, 70, 73 ve 82 ile düşük riskli tipleri saptanabilmektedir. Servikal sitoloji örneklerinden DNA ekstraksiyonu ardından HPV genomu L1 bölgesinin hedef alan biotin işaretli primerler ile PCR amplifikasyonu yapılmaktadır. Tipe özgü PCR'ın avantajı duyarlılığı (10-20 HPV koyası) ve yüksek-risk HPV olumlu yerine özgül tipleri rapor edebilme olanağı sağlamasıdır (örneğin HPV 16 ve HPV 18). Yakın dönem çalışmaları, HPV-16 gibi özgül HPV tiplerinin rapor edilmesinin biyopsi örneklerindeki yüksek dereceli lezyonlarda, pozitif prediktif değeri artırabileceğini göstermiştir.

2.2.1.6. HPV RNA Saptanması

PreTect HPV-Proofer testi (NorChip), en sık görülen beş yüksek riskli HPV tipinin (örneğin 16, 18, 31, 33 ve 45) E6/E7 mRNA ekspresyonunu hedefleyerek HPV tiplerini saptar. PreTect HPV-Proofer testi gerçek zamanlı saptama stratejisine sahip nükleik asit sekans temelli amplifikasyon teknolojisidir. Beş HPV tipi E6 ve E7 genlerinde bulunan genotipik sekans değişikliklerine özgül moleküler “beacon”lar ile saptanır. Yakın dönemde yapılan bir çalışmada, HC II (Digene) histolojik olarak saptanmış yüksek dereceli lezyonların %95'inde pozitif iken, HPV Proofer mRNA testi histolojik olarak kanıtlanmış yüksek dereceli lezyonların %77'sinde pozitif olarak bulunmuştur. HC II benign ve düşük dereceli lezyonlarda, HPV E6 ve E7 mRNA'dan daha sık pozitifdir (36). Sözü edilen bu çalışmada, normal sitoloji ve mRNA testinde pozitiflik saptanan olguların %83'ünde yüksek dereceli histoloji saptanmıştır.

2.2.1.7. Serolojik Testler

HPV enfeksiyonu tanısında serolojik yöntemler sık olarak kullanılmaz. HPV'ye karşı hümmoral yanıt immünoglobulin G (IgG) ve IgA yanıtlarını içerir. Genel olarak IgG yanıtı, HPV ile karşılaşmış olmanın göstergesi iken IgA'nın persistan HPV enfeksiyonunun göstergesi olduğu öne sürülmüştür (76). Diğer çalışmalar, prekanseröz ve kanseröz lezyonlarda IgA yanıtında azalma olduğunu göstermiştir (77). HPV'ye karşı hümmesal immün yanıt, HPV enfeksiyonunun serviks kanserine dönüştüğü geç dönemlerde saptanmıştır. Bu immün yanıt E7 protein epitoplarına karşı gelişmiş CD8 pozitif sitotoksik T hümmelerden oluşmuştur. Hastalığın geç döneminde saptanmasına ek

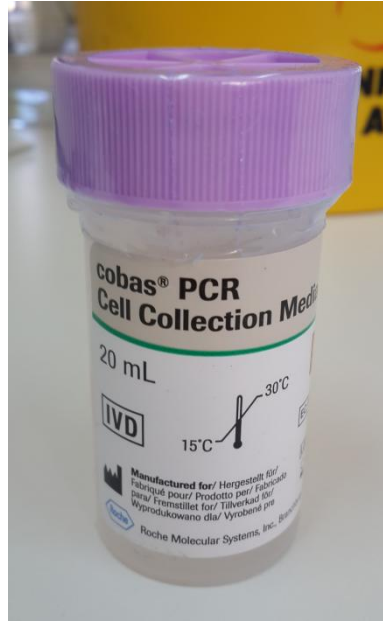
olarak, HPV'ye hedeflenmiş sitotoksik T hücreler serviks kanserli hastalar arasında çok değişkenlik gösterir ve hastalık göstergesi olarak kullanım potansiyelleri düşüktür (78).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

T.C İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 08.06.2012 tarih ve B.30.2.İST.0.30.90.00/16053 sayılı izni, T.C İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nın 26.04.2012 tarih ve B.30.2.İST.0.30.10.08/928 sayılı izni ile ve T.C İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nın 24.04.2012 tarih ve B.30.2.İST.0.30.10.14/176 sayılı izni ile İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na ve Üroloji Anabilim Dalı'na biyolojik örneklerini (servikal smear, üretral akıntı, genital siğil) vermek üzere gelen human papillomavirus (HPV) enfeksiyonuna sahip 20 kadın hastaya ve biyolojik partnerlerine; yapılacak çalışmanın amacı anlatıldı (*Ek 1-3*). Çalışma hakkında bilgilendirilen ve aydınlatılmış onamları alınan hastalardan bir çalışma grubu oluşturuldu (*Ek 3*). Bu çalışmanın laboratuvar kısmı İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Moleküler Biyoloji Öğrenci Laboratuvarı'nda Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Molecular Diagnostics, Inc) ticari kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. ÖRNEK TOPLANMASI

Çalışma grubundaki hastaların ThinPrep'lere alınan biyolojik örneklerinin rutin tetkiklerinden artan kısmı, çalışma zamanına kadar +4 °C'de ve steril koşullarda saklandı (Şekil 5). Saklanan örnekler 10 gün içerisinde çalışmaya dahil edildi. İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Moleküler Biyoloji Öğrenci Laboratuvarı'nda Laboratuvarları'nda incelemeye alındı.



Şekil 5. Biyolojik örneklerin saklandığı Thin-Prep

3.2. VİRAL DNA'NIN EKSTRAKSİYONU

- * 2ml'lik steril ependorf tüplerinin her biri çalışma ve kontroller için işaretlendi.
- *Vortekslenmiş numune ve kontroller uygun tüplere ticari kitin önerdiği protokole uygun olacak şekilde 250 µl ölçüde eklendi. (Erkeklerde örnek, 500 µl olacak şekilde değiştirildi.)
- * Ependorfların her birine 80 µl Buffer ATL ve 20 µl Proteinaz K ilave edildi. (Erkeklerde Proteinaz K 25 µl, ATL 120 µl olacak şekilde değiştirildi.)
- * Vortekslenen tüplerin, 56 °C'lik kuru ısı bloğunda 30 dakika boyunca inkübasyonu gerçekleşti.
- * Boş tüpte her bir hasta için 3,3 µl Carrier RNA ve 330 µl Buffer AL eklenerek çalışma Buffer AL hazırlandı.
- * İnkübasyondan sonra her bir tüpe hazırlanan Çalışma Buffer AL'den 250 µl eklendi. 70 °C'deki kuru ısı bloğunda 15 dakika inkübasyonu gerçekleştirildi.
- * Tüplerin her birine izole edilecek DNA'nın filtrelere tutunmasını sağlamak amacıyla, 300 µl absolut etanol ilave edildi. 15 sn yüksek hızda vortekslenen örnekler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- * Örneklerin her biri filtrelere aktarıldı. 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- * 1 dakika boyunca 12500 rpm hızda santrifüj edildi.
- * Üst filtre alınıp alttaki tüpler yenilendi.
- * Her bir filtrenin üzerine 750 µl Buffer AW2 eklendi.
- * 1 dakika boyunca 12500 rpm hızda santrifüj edildi.
- * Üst filtre alınıp alttaki tüpler yenilendi.
- * Her bir filtrenin üzerine 750 µl absolut etanol eklendi.
- * 1 dakika boyunca 12500 rpm hızda santrifüj edildi.
- * Üst filtre alınıp alttaki tüpler yenilendi.

- * 3 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj edildi.
- * Üst filtre alınıp alttaki tüpler yerine 1,5 ml'lik ependorflar yerleştirildi, kapakları açık şekilde 15 dakika boyunca inkübasyona tabi tutuldu.
- * Filtrelerin üzerine 120 µl Buffer AVE eklendi, kapakları kapalı şekilde 5 dakika inkübe edilip, 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
- *Çalışmaya hazır DNA izolatları ve kontroller 2-8 °C'de 1 hafta süre ile muhafaza edildi.



Şekil 6. Kuru ısı bloğu

3.3. VİRAL DNA'NIN AMPLİFİKASYONU

3.3.1. PCR Hazırlık Aşaması:

- * Tüm numune, kontrolleri ve amplifikasyon reaktifleri oda sıcaklığına getirildi.
- * 125µl magnezyum klorür bir şişe Amplicor HPV MMX'e ilave edildi.(Hazırlanan Master Miks 12 reaksiyon için yeterlidir.)

3.3.2. Örneklerin PCR Cihazına Yüklenmesi:

- * Biri negatif diğeri pozitif olmak üzere kontrol numuneleri ve amplifiye edilecek örnekler için yeterli sayıda tüp temin edildi.
- * Her bir tüpe daha önce hazırlanan Master Miks'ten 50 µl eklendi.
- * Negatif -pozitif kontrol ve çalışılacak örneklerden 50'şer µl tüplere ilave edildi.
- * Tüpler Thermal cyclers'a (Gene Amp 9700 Applied Biosystems) yerleştirildi.
- * Proses sonunda tüplerin her birine 100 µl Denaturation Solution ilave edildi.
- * Denature edilmiş ampliconlar çalışmanın devam edeceği güne kadar 2-8 °C'de 5 gün süre ile muhafaza edildi.

3.3.3. PCR Döngü Parametreleri:

Tablo III. PCR Döngü Parametreleri

Aşama		Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç İnkübasyonu I		50 °C	2 dak.	1
Başlangıç İnkübasyonu II		95 °C	9 dak.	1
Döngü	Denaturasyon	95 °C	30 sn.	40
	Bağlanma	55 °C	1 dak.	
	Uzaman	72 °C	1 dak.	
Son Uzama Aşaması		72 °C	5 dak.	1



Şekil 7. PCR Cihazı-GeneAmp 9700 (Applied Biosystems)

3.4. VİRAL DNA'NIN GENOTİPLEMESİ

3.4.1. Genotiplenmenin Hazırlık Aşaması:

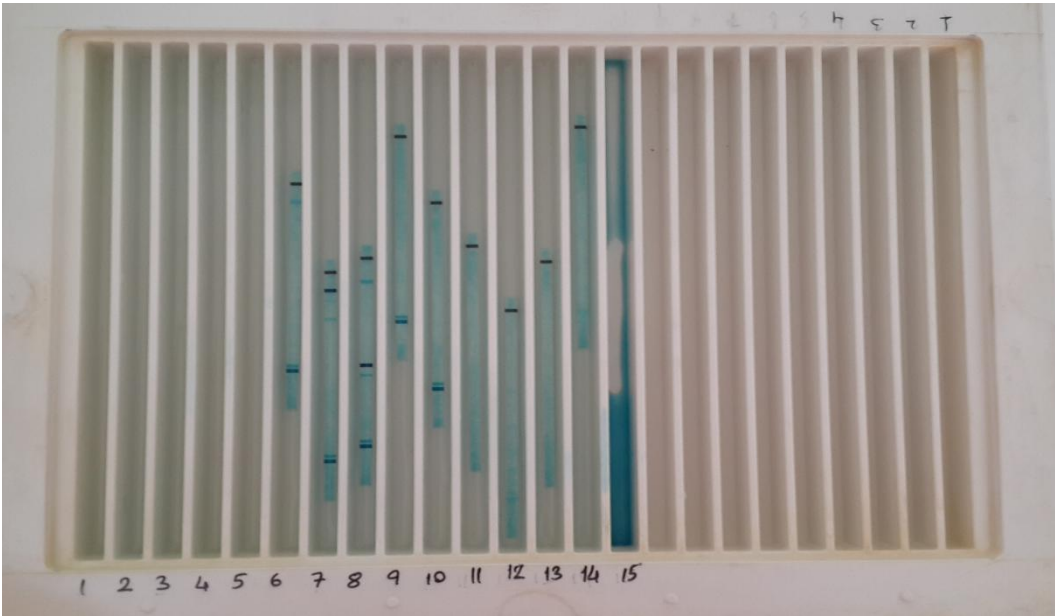
- * Deteksiyon reaktifleri oda ısısına getirildi
- * Hibridizasyon Buffer'ını hazırlarken her bir örnek için 3,8 ml dH₂O, 1 ml 20x SSPE, 125 µl 20% SDS boş bir falkona eklendi.
- * DNA hibridizasyonunun sağlanabilmesi için hazırlanan buffer 53 °C'lik su banyosunda 30 dakika bekletildi.
- * Ambient Wash Buffer'ını hazırlarken her bir örnek için boş bir falkona 25,2 ml dH₂O, 1,33 ml 20x SSPE, 133 µl 20% SDS eklendi.
- * Stringent Wash Buffer'ı hazırlarken her bir örnek için boş bir falkona 5 ml Çalışma Ambient Wash Buffer'ı 53 °C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildi.
- * Konjugat'ını hazırlarken her bir örnek için boş bir falkona 15 µl konjugat ve 5 ml Çalışma Ambient Wash Buffer eklendi.
- * Sitrat Buffer'ını hazırlarken her bir örnek için boş bir falkona 4,75 ml dH₂O, 250 µl 20x sitrat buffer eklendi.
- * Substrat'ı hazırlarken her bir örnek için boş bir falkona 4 ml Substrat A ve 1 ml Substrat B eklendi. İyice çalkalandı.

3.4.2. Deteksiyon Aşaması:

- * Genotipleme tepsinine; pozitif- negatif kontroller ve her bir örnek için birer adet strip yerleştirildi.
- * İşaretli striplerin bulunduğu her bir bölmeye 80 µl denatüre edilmiş PCR ürünü ve 4 ml. Hibridizasyon Buffer'ı konuldu.
- * 53 °C'deki çalkalayıcı su banyosunda
- * 60 rpm'de 30 dakika hibridizasyon için inkübe edildi.
- * Hibridizasyon Buffer'ı vakum aspirasyonu ile boşaltıldı ve her bir bölmeye 4 ml Ambient Wash Buffer'ı (AWB) eklendi. Daha sonra vakum ile aspire edildi.
- * Her bir bölmeye 4 ml Stringent Wash Buffer (SWB) eklendi. 53 °C'deki çalkalayıcı su banyosunda
- * 60 rpm'de 15 dakika inkübe edildi.
- * SWB aspire edildi ve her bir bölmeye 4 ml konjugat eklendi.
- * 60 rpm'de 30 dakika oda sıcaklığında platform çalkalayıcısında inkübe edildi.
- * Konjugat aspire edildi, her bir bölmeye 4 ml AWB eklendi ve aspire edildi.
- * Her bir bölmeye tekrar AWB eklendi.
- * 60 rpm'de 10 dakika oda sıcaklığında platform çalkalayıcısında inkübe edildi.
- * Bir önceki işlem tekrar edildi.
- * Wash buffer aspire edildi, her bir bölmeye 4 ml sitrat buffer eklendi.
- * 60 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında platform çalkalayıcısında inkübe edildi.
- * Sitrat buffer aspire edildikten sonra her bir bölmeye 4 ml substrat eklendi.
- * 60 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında platform çalkalayıcısında inkübe edildi.



Şekil 8. Sıcak su banyosu



Şekil 9. Genotipleme tepsisi

3.5.VİRÜS DNA'SININ TİPLENDİRİLMESİ

Genotiplendirme sonucunda striplerde oluşan bantlar ticari kit içerisinde çıkan cetvelle değerlendirildi.

Çalışmaya katılan partnerlerin sonuçları karşılaştırıldı.

3.6. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

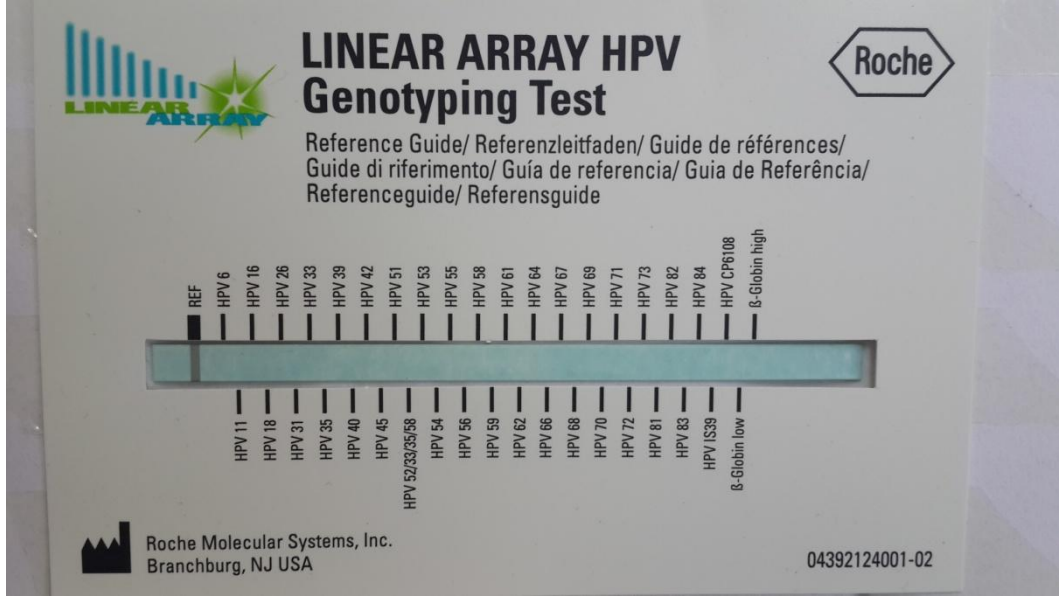
Verilerin istatistiksel analizinde SPSS-16 (Statistical Package for the Social Sciences) paket programı kullanıldı. Betimleyici istatistiklerin yanı sıra, değişkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olup olmadığını değerlendirmek için Mann Whitney-U Test ve Ki-Kare testi uygulandı. Partnerlerin Yaş Farkı ve İlişki Süresi ile Partnerler arası HPV tipinin uyumluluğu arasında anlamlı korelasyonun bulunup bulunmadığı analiz edildi. Tip özgü uyumun beklenen prevalansı kadın ve erkeklerin ayrı ayrı HPV genotip prevalansını çarpma suretiyle hesaplandı.

4. BULGULAR

Çalışma grubunu oluşturan partnerler, en az son 3 aydır birlikte olduğu tek eşli olduklarını beyan etmiştir. Çalışmaya katılan toplam 20 partnerin biyolojik örnekleri alındı ve Linear Array yöntemi ile HPV tipleri çalışıldı. Hücresel beta globin varlığı yönünden negatif bulunan 4 partner çalışmaya dahil edilmedi (Tablo 4) (Şekil 10). 16 partnerden oluşan çalışma grubunda en azından 1 HPV tipi açısından eşleşen örnekler uyumlu olarak değerlendirildi. Striplerde oluşan bantlar ticari kit içerisinde çıkan cetvelle değerlendirildi (Şekil 10-18).

Tablo IV: Çalışmaya Dahil Edilmeyen Örnekler

ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLMEYEN ÖRNEKLER			
KATILIMCILAR			
İlişki süresi	Yaş	Cinsiyet	HPV Tipleri
10 AY	28	K	53,61
	34	E	Çalışmaya dahil edilmedi
4 AY	28	K	54,58
	28	E	Çalışmaya dahil edilmedi
24 AY	29	K	16,52
	32	E	Çalışmaya dahil edilmedi
16 AY	30	K	16,18,52
	33	E	Çalışmaya dahil edilmedi



Şekil 10: Beta globin zincirleri çalışmayan örnekler

Çalışma grubunu oluşturan 16 çiftin 9'unda uyum tespit edilmedi (Tablo 5-6). 7 partnerde uyum gözlemlendi. Uyum gözlemlenen 7 partnerin 4'ünde tüm tipler eşleşti, kalan 3'ünde ise mevcut tiplerin bir kısmı eşleşti (Tablo 7-8).

Çalışılabilen 37 farklı HPV tipinden toplamda 18 farklı tip gözlemlendi. HPV tipleri içerisinde 16, 18, 52, 53, 59 ve 61; uyum gösterenler olarak dikkati çekmektedir (Tablo 7,8-12,13). Çalışmaya katılan partnerler arasında birbirine en çok bulaş gösteren tip HPV 16 olarak belirlendi.

Tablo V: Kadınların HPV (+), Erkeklerin HPV (-) Olduğu Partnerler

KADINLARIN HPV (+), ERKEKLERİN HPV (-) OLDUĞU PARTNERLER			
KATILIMCILAR			
İlişki Süresi	Yaş	Cinsiyet	HPV Tipleri
8 AY	28	K	18,39
	27	E	(-)
36 AY	36	K	6,62
	41	E	(-)
3 AY	28	K	11,18,40
	29	E	(-)
8 AY	30	K	53,45
	33	E	(-)
4 AY	29	K	18,62,66
	32	E	(-)

Tablo VI: HPV Tipleri Uyum Göstermeyen Partnerler

HPV TİPLERİ UYUM GÖSTERMEYEN PARTNERLER			
KATILIMCILAR			
İlişki Süresi	Yaş	Cinsiyet	HPV Tipleri
6 AY	30	K	16,62
	31	E	31
5 AY	34	K	11,16
	35	E	6
4 AY	29	K	18,45
	29	E	6
5 AY	31	K	16
	34	E	6

Tablo VII: Tüm HPV Tipleri Uyum Gösteren Partnerler

TÜM HPV TİPLERİ UYUM GÖSTEREN PARTNERLER			
KATILIMCILAR			
İlişki Süresi	Yaş	Cinsiyet	HPV Tipleri
9 YIL	40	K	18
	42	E	18
8 AY	29	K	53,61
	36	E	53,61
7 AY	30	K	16
	30	E	16
7 AY	32	K	52
	34	E	52

Tablo VIII: HPV Tiplerinden Bazılarına Uyum Gösteren Partnerler

HPV TİPLERİNDEN BAZILARINA UYUM GÖSTEREN PARTNERLER			
KATILIMCILAR			
İlişki Süresi	Yaş	Cinsiyet	HPV Tipleri
4 AY	31	K	16,54,62
	34	E	6,16
3 AY	28	K	16,39
	27	E	16
4 AY	27	K	52,53,59
	28	E	51,53,59,83

HPV tipleri eşleşen partnerlerin viral profilleri incelendiğinde; 2 çiftte 2 tipin birlikte uyum gösterdiği, 5 çiftte de 1 tipin uyum gösterdiği gözlemlenmiştir.

Eşleşme üzerine çiftlerin birliktelik süresinin etkisini inceleyebilmek amacıyla katılımcılar birliktelik sürelerine göre “3 ay – 6 ay (9 partner)”, “7 ay – 12 ay (5 partner)” ve “1 yıl üzeri (2 partner)” olmak üzere üç gruba ayrıldı. Gruplara düşen katılımcı sayısının çok az olması da dikkate alınarak, ilişki süresi açısından partnerler arasındaki HPV tiplerinin uyumlu olanlar ile olmayanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. ($p>0,05$) (Tablo 9-10).

Tablo IX: Likelihood Ratio

		Uyum Yok		Uyum Var		P
		n	%	n	%	
İlişki süresi	3-6 ay	6	66,7	3	42,9	0,616 ^a
	7-12 ay	2	22,2	3	42,9	
	12 ay üzeri	1	11,1	1	14,3	
	Toplam	9	100,0	7	100,0	

Tablo X: Mann Whitney-U Test

	Uyum Yok		Uyum Var		p
	Ort.±Std.Sapma	Medyan	Ort.±Std.Sapma	Medyan	
İlişki Süresi	8,78±10,353	5	20,14±38,788	7	0,918 ^a

Çalışmaya dahil edilen vakaların beklenen ve gözlemlenen uyum değerleri hesaplandığında; tabloda görüldüğü gibi HPV tipine bağlı olarak gözlemlenen eşleşme değerinin beklenene göre 1.60-8.01 kat artmış olduğu tespit edildi (Tablo 11).

Tablo XI: Biyolojik partnerler arasında HPV tiplerinin uyumu

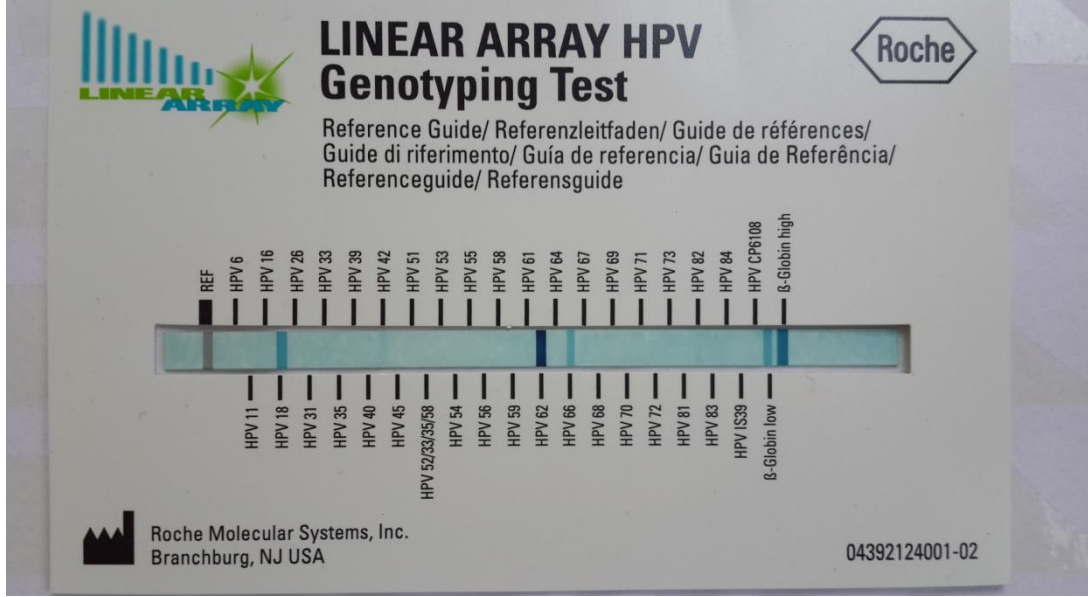
<i>HPV tipleri</i>	<i>HPV'nin prevalansı (%)</i>		<i>Uyum gösteren HPV tipleri (%)</i>		<i>Gözlenen/Beklenen</i>
	<i>Kadın (n = 16)</i>	<i>Erkek (n = 16)</i>	<i>Beklenen</i>	<i>Gözlenen</i>	
6	1 (6.25)	4 (25)	1.56		0
16	6 (37.5)	3 (18.75)	7.03	18.75	2.66
18	5 (31.25)	1 (6.25)	1.95	6.25	3.20
52	2 (12.5)	1 (6.25)	0.78	6.25	8.01
53	3 (18.75)	2 (12.5)	2.34	12.5	5.34
59	1 (6.25)	1 (6.25)	3.9	6.25	1.60
61	1 (6.25)	1 (6.25)	3.9	6.25	1.60

Tablo XII: Kadın ve erkeklerde karışık gözlemlenen HPV tiplerinin toplam sayı içerisindeki görülme sıklığı

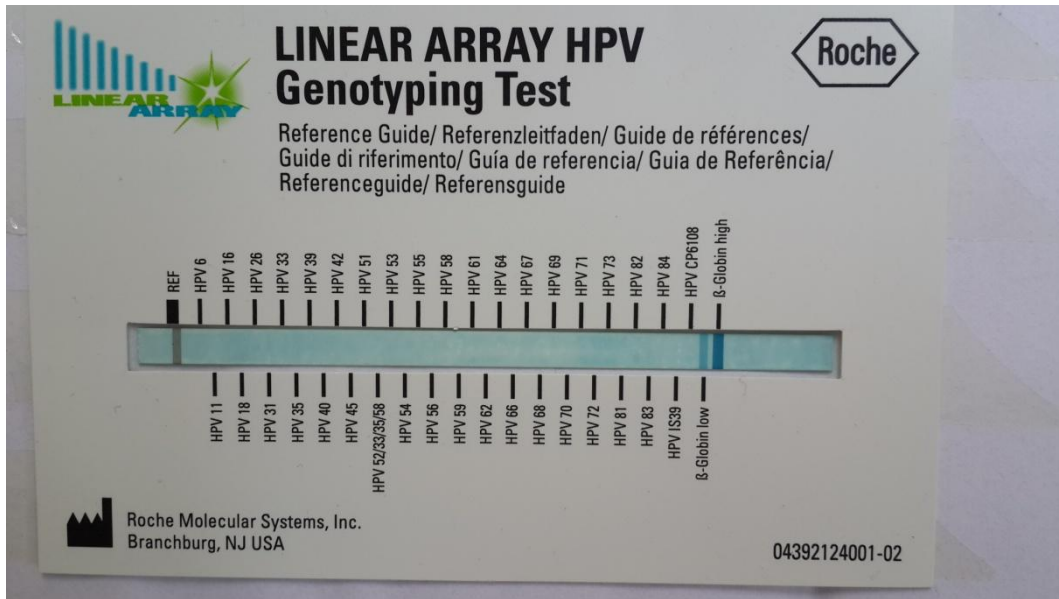
HPV-6	HPV-11	HPV-16	HPV-18	HPV-31	HPV-39	HPV-40	HPV-45	HPV-51
%12.5	%5	%27.5	%17.5	%2.5	%5	%2.5	%5	%2.5
HPV-52	HPV-53	HPV-54	HPV-58	HPV-59	HPV-61	HPV-62	HPV-66	HPV-83
%12.5	%15	%5	%2.5	%5	%7.5	%10	%2.5	%2.5

Tablo XIII: Hem kadınlarda ve hem erkeklerde birlikte gözlemlenen HPV tiplerinin toplam sayı içerisindeki görülme sıklığı

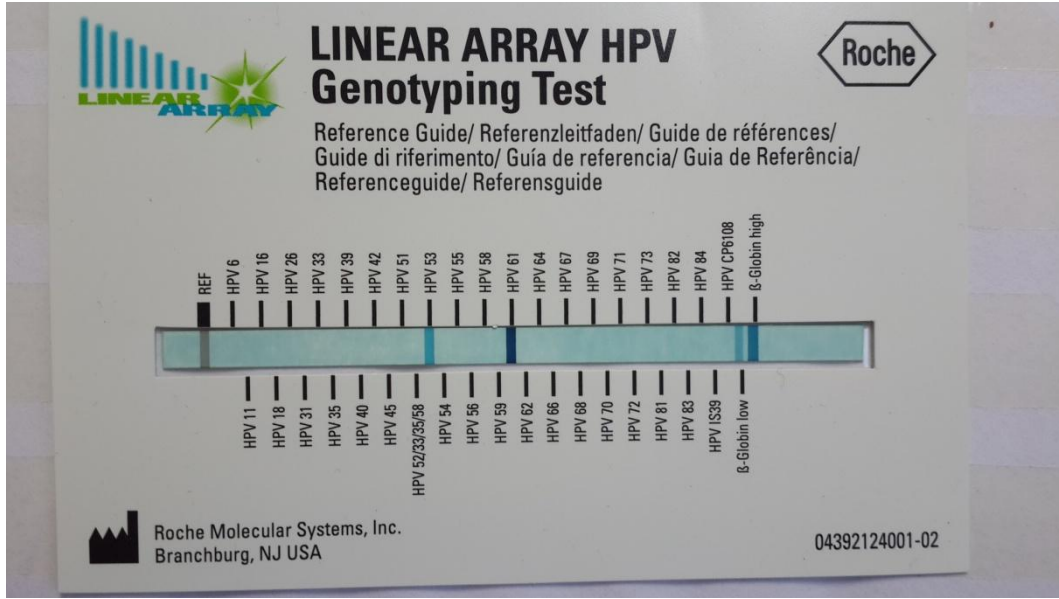
<i>HPV Tipi</i>	<i>Çalışma grubundaki gözlenme oranı</i>
HPV-16	%19.29
HPV-18	%12.28
HPV-53	%10.52
HPV-52	%8.77
HPV-61	%5.26
HPV-59	%3.02



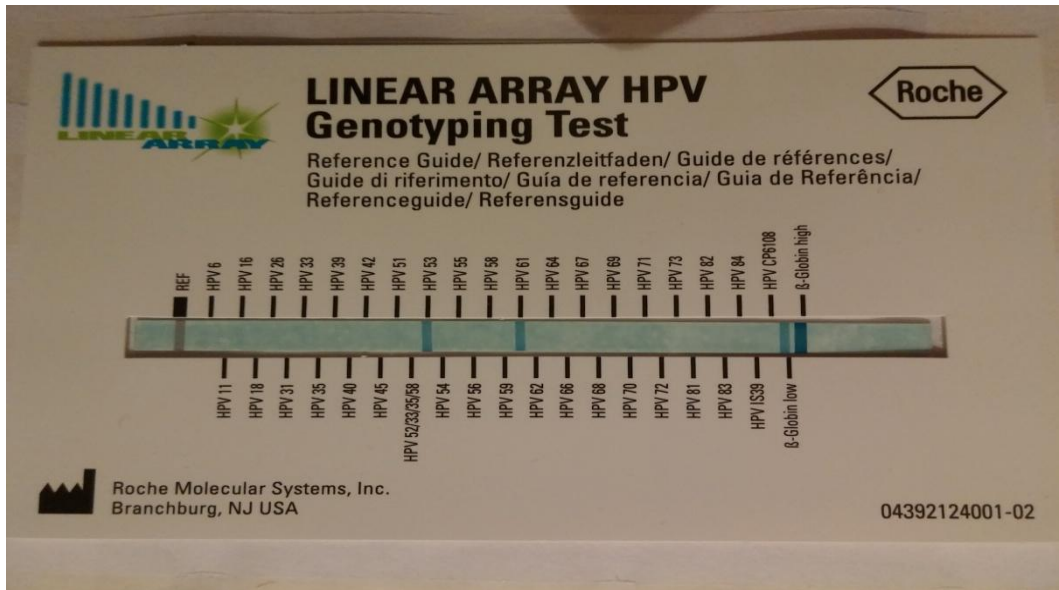
Şekil 11: A9 kodlu kadın katılımcıya ait test sonucu Tip 18, 62,66



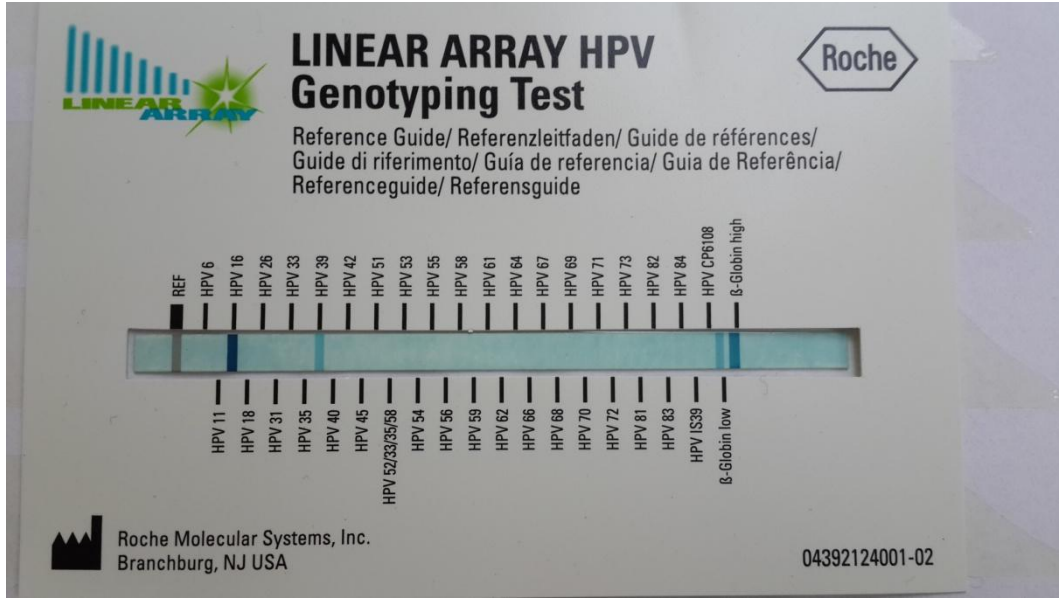
Şekil 12: A9 kodlu kadın katılımcının partnerine ait test sonucu HPV negatif



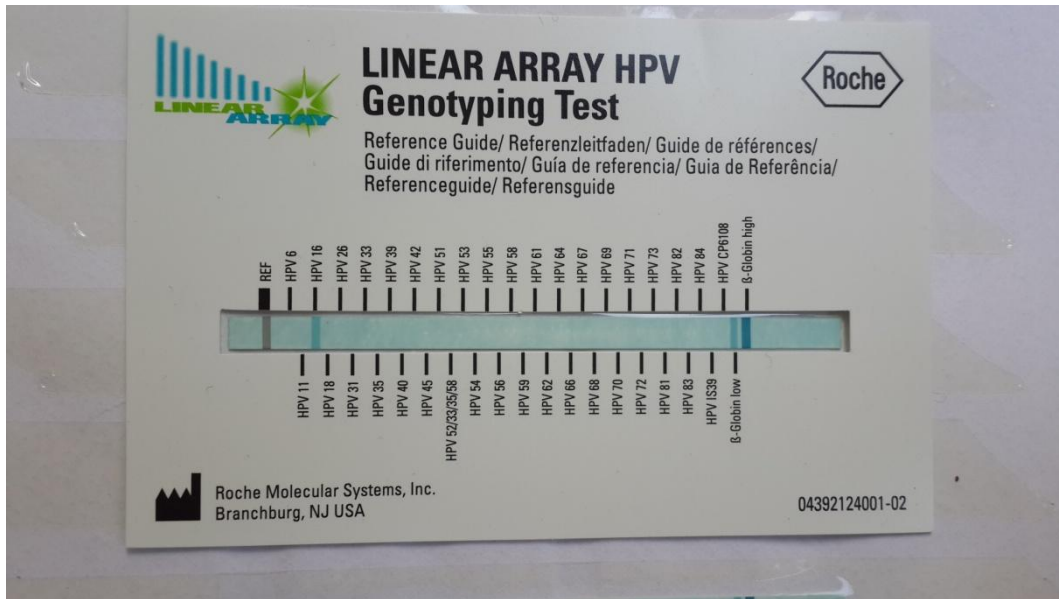
Şekil 13: A15 kodlu kadın katılımcıya ait test sonucu HPV Tip 53, 61



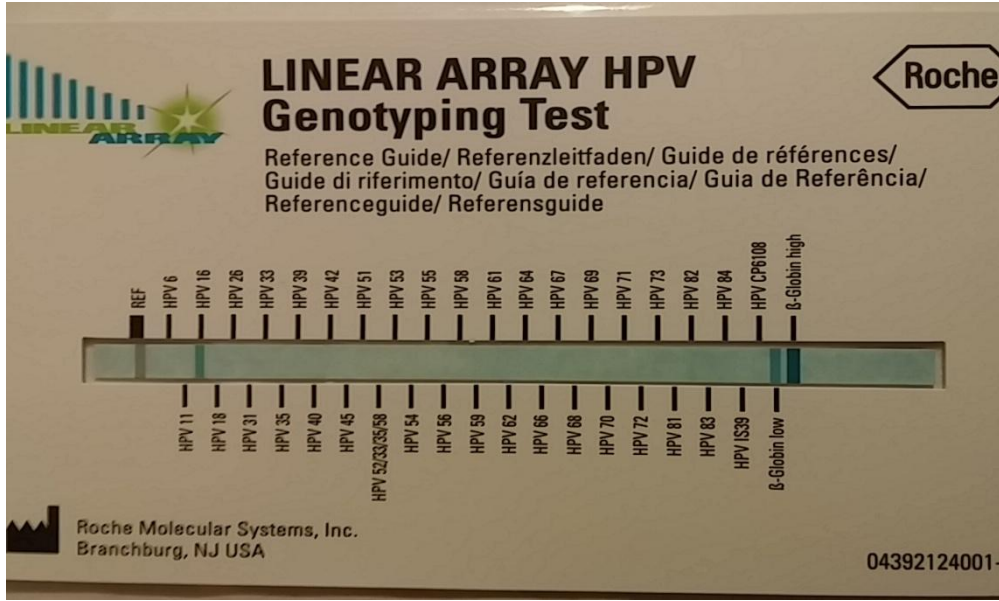
Şekil 14: A15 kodlu kadın katılımcının partnerine ait test sonucu HPV Tip 53,61



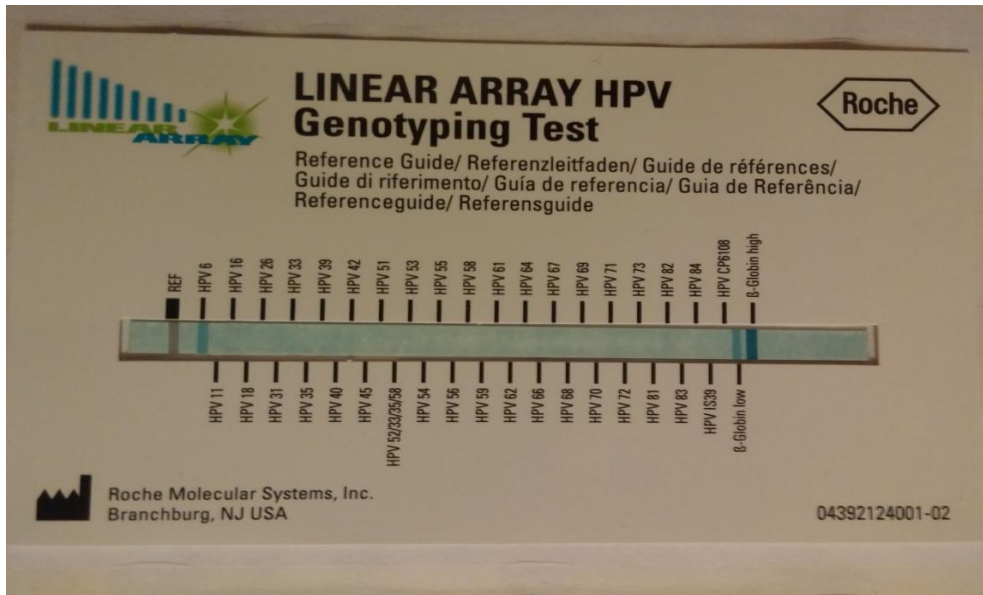
Şekil 15: A19 kodlu kadın katılımcıya ait test sonucu HPV Tip 16, 39



Şekil 16: A19 kodlu kadın katılımcının partnerine ait test sonucu HPV Tip 16



Şekil 17: A13 kodlu kadın katılımcıya ait test sonucu HPV Tip 16



Şekil 18: A13 kodlu kadın katılımcının partnerine ait test sonucu HPV Tip 6

5. TARTIŞMA

Cinsel saldırı olgularında destekleyici fiziksel delillere ulaşamayan durumların olması, araştırmacıları daha farklı delil arayışlarına yönlendirmiştir; bu amaçla cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların laboratuvar analizleri ile belirlenmesi ve incelenmesi tıbbi kanıt olması açısından değer taşımaktadır (79). Cinsel yolla bulaşan patojenlerin bir kısmının bugünkü tekniklerle alt tiplerinin ortaya çıkartılması bu patojenlerin delil olarak kullanılmasını daha da önemli hale getirmiştir. Bu amaçla 2014 yılında yapılan bir çalışmada *Neisseria gonorrhoeae*'nin cinsel saldırı olgularında adli delil olarak kullanışlı bir yaklaşım olacağı bildirilmiştir (80). Diğer cinsel yolla geçen patojenleri düşünürsek; HIV, HSV ve HPV gibi bugün elimizdeki olanaklarla tespit edilebilen ve farklı tipleri bulunduran enfeksiyon etkenleri; fiziksel ve biyolojik delillerin mevcut olmadığı olgularda delil niteliği taşıyan yeni parametreler olabilmektedir. Bilinen 118'den fazla tipinin olması ve bu tiplerin toplum içerisindeki değişen prevalans göstermesi ile HPV; cinsel saldırı olgularında şüpheli ve mağdur arasındaki söz konusu bağlantıyı kuracak, iyi bir marker olarak değerlendirilebilir.

Ancak, İngilizce literatür taramasında, HPV tip eşleşmesini irdeleyen çalışmaların daha çok klinik ve halk sağlığı alanı ile ilgili olduğu görülmektedir. Aynı durum ülkemizdeki çalışmalar için de söz konusudur. Dolayısıyla bu virüsün farklı tiplerinin adli amaçlı sanığa yönelik kimliklendirmede kullanılıp kullanılmayacağı veya adli bilimlere ne kadar katkıda bulunabileceği bilinmemektedir. Bu soruya bir katkıda bulunabilmek için; HPV'si pozitif olan 20 kadından ve biyolojik partnerlerden bir çalışma grubu oluşturuldu. Çalışmaya sınırlı sayıda deneğin dahil edilmesi ve sadece böyle bir grupta çalışılmasının nedenleri arasında; çalışılan ticari kitin maliyetinin yüksek olması ve çalışmaya katılacak gönüllü bulmada yaşanan sıkıntılar ön plana çıktı. Bu durum çalışmadan elde edilecek sonuçları kısmen sınırlamıştır.

Ülkemizde HPV alt tipleri ile yapılan çalışmalar; HPV tiplerinin toplumda farklı oranlarda dağılımının olduğunu göstermektedir. *Altun ve ark.* toplam 460 kadından oluşan çalışma grubunda, genital HPV enfeksiyon prevalansının %5,2 olduğunu ileri sürmüşlerdir. HPV DNA pozitif 24 kadından 14'ünde (%3) tek veya birden fazla tip ile

enfeksiyonu gösteren, multiple enfeksiyon şeklinde ve HR HPV tipi, 10'unda (%2,2) ise tek başına LR HPV pozitifliği tespit edilmiştir. HPV DNA pozitif, 30 yaş ve üstü olan 24 kadında %33,3 oranı ile en sık görülen HR HPV tipi HPV tip 16 olup, bunu sırasıyla HPV 45 (%20,8), HPV 18 (%4,2), HPV 31 (%4,2) izlemiştir (81). Bu sonuçlar farklı ülkelerde yapılan prevalans çalışmaları ile paralellik içerisinde görülmektedir. *Bruni ve ark.* yapmış olduğu meta analiz çalışmasında dünyadaki HPV yaygınlığını %11,7 olarak belirlemiştir. HPV-16'nın görülme sıklığını (3.2%), HPV-18'in (1.4%), HPV-52'nin (0.9%), HPV-31'in (0.8%), ve HPV-58'in (0.7%) olarak ileri sürmektedir (82).

Çalışmada kullanılan ticari kitle bakılabilen 37 ayrı HPV tipleri içerisinde, kadın ve erkeklerde karışık olarak (HPV-6, 11, 16, 18, 31, 39, 40, 45, 51, 52, 53, 54, 58, 59, 61, 62, 66, 83) tipleri saptandı. Ayrıca bu çalışmada 40 katılımcının (20 çift) 11'inde (%27.5) oranında HPV-16 tipi pozitif olarak saptanmıştır. 7 katılımcıda HPV-18 (%17.5), 5 katılımcıda (%12.5) ise HPV-6 gözlemlendi (Tablo 12). Bu sonuç, virüsün farklı tiplerinin dağılımının ülkemizde de değişkenlik içermesi nedeni ile ayırt edici özellik olarak çalışmada bir marker olarak kullanabileceğini düşündürdü.

Kısıtlı sayıdaki veri grubumuzda, mevcut ticari kitle çalışılabilen 37 farklı HPV tipinden 6'sı hem erkeklerde hem de kadınlarda gözlemlenmiştir. Bu tipler, HPV-16 (19.29%), HPV-18 (12.28%), HPV-53 (10.52%), HPV-52 (8.77%), HPV-61 (5.26%) ve HPV-59 (3.02%) olarak belirlendi (Tablo 13). HPV-16 tipinin ülkemizdeki ve uluslararası literatürde belirtilen prevalans çalışmalarına paralel olarak, yüksek oranda saptanması; laboratuvar sonuçlarının uyumluluğunu da teyit etti (83,84). Çalışmaya katılan partnerler arasında birbirine en çok bulaş gösteren tip HPV-16 olarak belirlendi. Ancak çalışmanın sonuçları, tip 16, 18 ve 52 açısından literatüre paralellik göstermekle birlikte, diğer tiplerin dağılımının farklı olduğu görülmektedir (83, 84). Bu farklılığın en muhtemel nedeninin, yukarıda bahsedilen bu tez çalışmasının sınırlılığı olduğu düşünüldü.

Bleeker ve ark. 2005 yılında partnerler arasında yaptıkları çalışmada, 181 olgunun 44'ünde (% 24.3) kadınların HPV pozitif, erkeklerin HPV negatif olduğu bildirilmektedir. (85). Benzer şekilde, *Widdice ve ark'nın* 2010 yılında yaptıkları çalışmada, 25 olgunun 4'ünde (% 16) partnerlerin kadınlarında HPV pozitiflik,

erkeklerinde HPV negatif olduğunun belirlendiği görülmektedir(52). Tablo 5'te belirtildiği gibi, bu çalışmada da çiftlerin %31.25'inde kadın partnerlerin pozitif, buna karşılık erkek partnerlerin negatif olduğu tablo tespit edildi. Bu sonuç, erkek genital temizliğinin hızlı yapılabilmesine bağlanmaktadır. Zira kolay sağlanan hijyen koşullarının, erkeklerin bulaştırma oranını sınırlaması kuvvetle muhtemeldir. Bu durumda HPV negatif erkek oranının yüksek olması sürpriz olmayacaktır(52). Ayrıca HSV gibi başka virüslerin varlığının, HPV enfeksiyonunu baskılayabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (86) Buna ek olarak, HPV virüsünün kuluçka süresi 1,5-8 ay arasında (çoğunlukla 3 ay) değişmektedir. Ancak, bu süre 20 aya kadar uzayabilmektedir (87). Bu son iki etkenin de erkeklerdeki yüksek negatiflik oranını etkileyebileceği görülmektedir.

Partnerler arasındaki HPV tipi uyumluluğunu etkileyebilecek çok sayıda faktör olduğu bilinmektedir (52, 83). Bunlar içerisinde en dikkat çekici olan, partnerlerin birliktelik süresidir. Çalışmada katılımcı çiftlerin birliktelik sürelerinin HPV tipi uyumluluğuna etkisi istatistiksel olarak değerlendirildi. Çiftlerin birliktelik süresinin HPV tipi uyumu üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkisinin olmadığı görüldü (Tablo 9,10). *Widdice ve ark.* yapmış oldukları çalışmada en az 3 aydır birlikte olduğunu beyan eden partnerler arasından oluşan 25 çiftlik bir çalışma grubunda, 25 çiftin 5'inde (%20) HPV pozitif tüm tiplerin eşleştiğini, %56'sında ise en az birinin uyumlu olduğu belirtmektedir.

Diğer yandan, partnerlerin cinsel ilişkiden kısa bir süre sonra alınan biyolojik örneklerde pozitif uyumun daha çok gözlemlendiğini ileri sürülmektedir (52). *Nyitray ve ark.* 88 partnerden oluşan çalışma grubunda 21 partnerde (%23.9) HPV pozitif uyum tespit ettiklerini ve bu partnerlerin 2'sinde HPV pozitif tüm tiplerin eşleştiğini belirtmektedir. Aynı çalışmada, cinsel birliktelik sonrası iki gün içerisinde alınan biyolojik örneklerin pozitif uyumunun, bir haftadır hiç ilişkiye girmemiş partnerlere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ancak bu sonuçlar, tüm olguları içeren istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar şeklinde değildir. Olgu bazında dikkat çeken cinsel ilişki sonrası geçen süreye göre partnerler arası HPV uyumluluğunun, cinsel ilişki sonrası partnerler arası karşılıklı biyolojik materyal transferi esnasındaki viral deposit transferinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (83). Bu çalışmada örnekler alınmadan

önceki ilişki süreleri bilinmediğinden konu ile ilgili yorum yapılamadı. Ancak adli tıp uygulaması açısından çok önemli olabilecek iki hususa dikkat çekilmesi gereklidir.

İlk olarak ilişkiden kısa süre sonra viral depositlerden kaynaklanacak yüksek pozitif uyum avantajından yararlanılabilmesi için, cinsel saldırı olgularında hızla mağdur ve saldırgandan örnek alınması gerektiği vurgulanmalıdır. İkinci olarak ise HPV virüs enfeksiyonunun 1-2 yıl içinde temizlenmesi olasıdır. Diğer taraftan enfeksiyona bağlı intra epitelyal sitolojik değişiklikler de yüksek negatiflik ya da partnerler arası uyumsuz HPV tipi sonucuna yol açmaktadır. Adli tıbbi değerlendirmelerde bu husus da dikkate alınmalıdır(52, 81).

Bu çalışmanın katılımcıları, son 3 aydır birlikte olduğunu ve tek eşli olduğunu beyan eden kişiler tarafından oluşturuldu. Çalışmaya dahil edilen 4 partnerde (% 25) HPV pozitif tüm tiplerin eşleştiği, 16 partnerin 7'sinde (% 43.75) ise en az birinde uyum gösterdiği belirlendi (Tablo 7,8). Bu sonuç *Widdice ve ark(52)*. yapmış oldukları çalışma ile uyumlu bulundu (sırası ile %20 ve %56).

Giovannelli ve arkadaşlarının 45 partnerden oluşan çalışma grubunda da %48.8 oranında sadece bazı tiplerin uyumlu olduğunun tespit edildiği bildirilmektedir (84). *Giovannelli* sadece bazı tiplerin uyumlu olmasını, "bireylerin önceki ilişkilerinden geçen enfeksiyonların etkisi" olarak düşündüğünü belirtmektedir (84). Tablo 8'de de belirtildiği üzere çalışmamıza dahil edilen 16 partnerin 3'ünde %18.75 oranında(%43.75-%25=18.75) pozitif HPV tiplerinin bazılarında uyum gözlemlendi. En az bir HPV tipinin uyumlu olduğu bu grupta da uyumlu olmayan virüs tiplerinin önceki enfeksiyonlardan kaynaklandığı düşünüldü.

Giovannelli ve ark. uyum göstermeyen partnerler ile ilgili olarak ise, "kuluçkadaki virüsün miktarının (viral yük) enfeksiyon süresini ve uyum sonucunu etkileyebileceğini" belirtmektedir. Kantitatif olarak düşük miktardaki viral yükün, partnere bulaşma olasılığını azaltacağı bilinmektedir. Ayrıca önceki ilişkilerden edinilen tipe spesifik immünitinin de uyumsuzluğun bir başka nedeni olabileceği ileri sürülmektedir (84). Partnerler arası HPV uyumunun araştırılabilmesi açısından en az sekiz aylık bir sürenin gerektiğini, daha az süre zarfındaki çalışmalarda çıkabilecek uyumsuzluğun, bir önceki ilişkiden kalan HPV enfeksiyonunun sebebi olabileceği ileri

sürülmektedir (52, 88). Tablo 6’da gösterildiği üzere bu çalışmada 16 partnerin 4’ünde (%25) HPV tiplerinin uyum göstermediği tespit edilmiştir. Bu dört partnerin ilişki süreleri sırasıyla 4-6 ay arasında değişmektedir. Yukarıda sözü edilen en az 8 aylık süre tamamlanmadığından sonuçların yukarıda belirtilen olasılıklar dışında değerlendirilmesi mümkün olmamıştır.

Franceschi ve ark. 2002 yılında yaptıkları çalışmada 533 olgu çalışmış, bu olguların 42’sinde (% 7,9) hücrel beta globin zincirleri çalışmadığı için, -alınan biyolojik örnek yetersiz geldiği için- çalışmalarına dahil etmemişlerdir (89). *Bleeker ve ark.* da yapmış oldukları çalışmada erkek bireylerden örnek almanın morfolojik olarak kadınlara göre daha zor olduğunu belirtmiştir (85). Bu çalışmada da 20 olgu çalışıldı. Partnerlerin 4’ünün erkek bireylerde beta globin zincirleri oluşmadığından ötürü bu olgular çalışmaya dahil edilmedi (Tablo 4).

Erkeklerden alınan üretral akıntı örneklerinde toplanabilen hücrel materyal, kadınlarda servikal smear ile alınabilen materyale göre çok daha az miktardadır. Kadınların morfolojik yapısı ve örnek alımı esnasındaki biyolojik sıvıları bu durumun sebepleri arasında yer almaktadır. Hücrel beta globin zincirleri yeterli biyoloji örnek alınımını denetlemek ve yanlış negatifi engellemek amacıyla kullanılan internal kontrollerdir (90).

Cinsel saldırı olgularının büyük bir bölümünde TCK 103/6 kapsamında mağdurun beden ve ruh sağlığının bozulup bozulmadığı sorulmaktadır. HPV varlığının mağdurun beden sağlığının bozulmasına yol açıp açmadığı konusu hukuk mensupları arasında halen tartışılmakta olan bir husustur. Konu adli tıp uzmanları arasında da nihai bir karara bağlanmamıştır. Eraslan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada cinsel saldırı iddiası ile Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Adli Tıp AD’na başvuran olgunun yapılan değerlendirmesinde, HPV enfeksiyonuna bağlı kondilomların varlığı mağdurun beden sağlığını bozacak mahiyette bulunmuştur. Ancak bazı hukukçular bu konuya katılmadıklarını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, HPV enfeksiyonuna bağlı kondilomların beden sağlığını bozacak mahiyette olup olmadığı kararında, virüsün tipi, lezyonun lokalizasyonu ve yaygınlığı mutlak dikkatle alınması gereken bulgular olduğunu ileri sürmektedir (91). Öneri mahiyetindeki bu sonuç literatür ile uyumludur (92, 93). Bu

nedenle bu çalışmada yapıldığı gibi, cinsel saldırı olgularında virüs tip tayinin yapılması; adli olguların raporlanması açısından önemli bir veri oluşturacaktır.

Bu tür verilerin adli bilimlere amaçlı kullanılmasında beklenen ve gözlenen oranlarının farklı olması, söz konusu verinin ayırt edici gücünü arttırmada önem kazanmaktadır. Bu tez çalışmasında da Tablo 11 'de görüleceği gibi HPV tipine bağlı olarak gözlemlenen eşleşme değerinin beklenene göre 1.60-8.01 kat artmış olduğu belirlendi. *Bleeker ve ark'nın* 2005 yılında 181 vakadan oluşan çalışmasında bu oranın 1.40-17 olduğunu belirtilmiştir (85). Bu artışlar daha önceki biyolojik delillerin olmadığı cinsel saldırı vakalarında bakılan cinsel yolla bulaşan infeksiyonların varlığı yada yokluğuna dayanan delil gücüne göre daha güçlü bir ayırt edicilik sağlayabilir. Özellikle çoklu şüphelilerin bulunduğu durumlarda şüpheli sayısı daha az indirgenebilir (80). Ancak bunun adli vakalar açısından kullanılabilirliğinin ortaya konulabilmesi için çalışmanın çok daha yüksek veri grubunda ve ileri istatistiksel analizlerle değerlendirilmesine ihtiyaç vardır. Ayrıca bu çalışma için belirlenen sınırlayıcı faktörler de dikkate alındığında, ileride yapılacak tamamlayıcı çalışmaların bu konuya daha açıklık getireceği düşünülmektedir.

Bu çalışma sonucu elde edilen bulgular yukarıda belirtilen nedenlerle sınırlıdır. Bu sınırlayıcı faktörler arasında; çalışmada kantitatif bir değerlendirme yapılamaması, oluşturulan çalışma grubunun toplumsal bir yaygınlığı tam olarak yansıtmaması, çalışmanın kişisel beyanlardan elde edilen bilgiler doğrultusunda analiz edilmesi gibi sebepler yer almaktadır.

6. SONUÇ

Biyolojik delillerin bulunmadığı cinsel saldırı vakalarında HPV'nin farklı tip özelliğinden yararlanarak sanığa yönelik kimliklendirmede kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla yapılan çalışma sonucunda;

1. Çalışmada en azından 1 HPV tipi açısından eşleşen örnekler uyumlu olarak değerlendirildiğinde; 16 çiftin 9'unda uyum tespit edilmedi. 7 partnerde uyum gözlemlendi. Uyum gözlemlenen 7 partnerin 4'ünde tüm tipler eşleşti, kalan 3'ünde ise mevcut tiplerin bir kısmı eşleşti.
2. Çalışmamızda 16, 18, 52, 53, 59 ve 61; uyum gösterenler olarak dikkati çekmektedir. Çalışmaya katılan partnerler arasında birbirine en çok bulaş gösteren tip HPV-16 olarak belirlendi.
3. İstatistiksel olarak uyum üzerinde partnerlerin ilişki sürelerinin bir etkisi olmadığı görüldü ($p>0,05$).
4. Çalışılan vakaların beklenen ve gözlemlenen uyum değerleri hesaplandığında; HPV tipine bağlı olarak gözlemlenen eşleşme değerinin beklenene göre 1.60-8.01 kat artmış olduğu belirlendi.
5. İlişkiden kısa süre sonra viral depositlerden kaynaklanacak yüksek pozitif uyum avantajından yararlanılabilmesi için, cinsel saldırı olgularında hızla mağdur ve saldırgandan örnek alınması gerektiği belirlenmiştir.

9. KAYNAKLAR

- 1.Sara B. Babich, D.D.S, Sol D. Haber, D.D.S, Erika Y. Caviedes, D.D.S. And Paul Teplitsky, D.M.D. (2003) Condylomata acuminata in a boy. J Am Dent Assoc , Vol 134, No 3, 331-334
- 2.Shireen Atabaki, MD, MPH, Jan E. Paradise, MD. (1999) The Medical Evaluation of the Sexually Abused Child: Lessons From a Decade of Research. Pediatrics ; 104: 178-86
- 3.Gibbs NF. (1994) Anogenital papillomavirus infections in children. Curr Opin Pediatr. 1998 Aug;10(4):393-7.
- 4 Sinal SH. Sexual abuse of children and adolescents. South Med J. Dec;87(12):1242-58.
- 5.Bechtel K. (2010) Sexual abuse and sexually transmitted infections in children and adolescents. Curr Opin Pediatr. Feb;22(1):94-9.
6. De Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard ve H. (2004) zur Hausen. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.
- 7.Ceyhan M. (2007) İnsan papilloma virusu (HPV) aşısı uygulamasında ülkemizde mevcut problemler. ANKEM Derg; 21(Ek 2):102-104
- 8.Obalek S, Misiewicz J, Jablonska S, Favre M, Orth G. (1993) Childhood condyloma acuminatum: association with genital and cutaneous human papillomaviruses. *Pediatr Dermatol.* Jun;10(2):101-6.
- 9.Allen AL, Siegfried EC. (1998) The natural history of condyloma in children. *J Am Acad Dermatol.* Dec;39(6):951-5.
- 10.Marcoux D, Nadeau K, McCuaig C, Powell J, Oligny LL.(2006) Pediatric anogenital warts: a 7-year review of children referred to a tertiary-care hospital in Montreal, Canada. *Pediatr Dermatol.* May-Jun;23(3):199-207.
- 11.Padel AF, Venning VA, EvansMF, Quantrill AM, Fleming KA. (1990) Human papillomaviruses in anogenital warts in children: typing by in situ hybridisation. *BMJ.* June 9; 300(6738): 1491–1494.
12. Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL et al. Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: the Young Women’s Health Study. *J Infect Dis* 2002; 186:462-9.
- 13.Yorulmaz C, Şanyüz Ö, Ketenci HÇ. (2006) Cinsel Saldırıları. Yeni Yasalar Çerçevesinde Hekimlerin Hukuki ve Cezai Sorumluluğu, Tıbbi Malpraktis ve Adli Raporların Düzenlenmesi. Çetin G, Yorulmaz C (ed) (s. 127-141)
- 14.Karadayı B, Kolusayın MÖ, Kaya A, Karadayı Ş. (2013) Collection and transfer of biological materials from forensic cases in emergency units. *Marmara Medical Journal.* Cilt 26, Sayı 3, Sayfa(lar) 111-117

15. Kobilinsky L, Liotti TF, Sweat JO. (2005) Biological Evidence- Science and Criminal Investigation. DNA: Forensic and Legal Applications (s. 25-44)
16. Saferstain, R. (2001). Forensic Serolog. L. Pawelchak, (Ed.), *Criminalistics An Introduction to Forensic Science, 7th Edition* içinde (345-349). New Jersey: Prentice Hall.
17. Gaensslen R.E., Lee H. C., (2001), Sexual Assault Evidence, *National Assessment and Guidebook*.
18. Tucker S, Claire E, Ledray LE, Werner JS, Claire E. (1990). Sexual assault evidence collection. *Wis Med J*. Jul;89(7):407-11.
19. Larson T, Bryson YJ. (1985) Fomites and herpes simplex virus. *J Infect Dis*;151:746-747
20. Workowski KA, Berman SM. (2006) Sexually Threatment Diseases Threatment Guidelines, Prepared by Division of STD Prevention,
21. Ekizoğlu O, Şevki S, Tüzün B, Korur Ş, Yurtbay T. (2010) Çocuğa yönelik cinsel istismar tanısında, cinsel yolla bulaşan hastalıklar ve çacuğun resim çizimlerinin önemi. *Adli Tıp Bülteni*, 15(1):27-31
22. Elmi Ş. (2007) HIV/Aids, HBV, HCV, Sifiliz ve Genital herpes'in toplumda ve riskli davranış modeli gösteren seks işçilerinde karşılaştırılması. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi
23. Mandell GL, Bennett JE, Dalin R. (1995) Principles and practice of infectious diseases. 4th edit. Churchill Livingstone. USA s:1379-1397
24. Belshe RB. (1991) Textbook of human virology. Mosby year book, INC. ST. Louis, USA s:947-991
25. Krebs HB. (1989) Milestones in HPV research. *Obstet. Gynecol.* 32(1): 107-213
26. zur Hausen (1974) Oncogenic herpes viruses *Biochim. Biophys. Acta*, 417, s. 25-53
27. Boyd RF, (1992) Basic Medical Microbiology. 5th.edit. Little, Brown and Company, USA. S:420
28. Richard RM, Wright TC. (1992) Human papillomavirus. *Curr Opin Obstest Gynecol.* 4(5)s:662-669
29. Baker TS, (1991) et al: *Biophys J* 60: 1445-1456
30. Fehrmann, F. ve L. A. Laimins. 2003. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells formalignant transformation. *Oncogene* 22:5201-5207
31. Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR. 1990. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation vwith the E2 transactivator. *Science* 250:1694-1699
32. Dovvhanick, J. J., A. A. McBride ve P. M. Hovvley. 1995. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein, *I. Virol.* 69:7791-7799.
33. McBride, A. A., H. Romanczuk ve P. M. Hovvley. 1991. The papillomavirus E2 regulatory proteins. */ Biol. Chem.* 266:18411-18414.

34. Schiffman M, Solomon D. (2003) Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study. *Arch. Pathol. Lab Med.* 127:946-949
35. Corkill, M., D. Knapp, J. Martin ve M. L. Hutchinson. 1997. Specimen adequacy of ThinPrep sample reparations in a direct-to-vial study. *Açta Cytol.* 41:39-44.
36. Lie, A. K., B. Risberg, B. Borge, B. Sandstad, J. Delabie, R. Rimala, M. Onsrud ve S. Thoresen. 2005. DNA-versus RNA-based methods for human papiliomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol. Oncol.* 97:908-915.
37. Martin, P, W. C. Vass, J. T. Schiller, D. R. Lovvy ve T. J. Velu. 1989. The bovine papiliomavirus E5 transforming protein can stimulate the transfoi ming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Celi* 59:21-32.
38. Stubenrauch F, Hummel M, Iftner T, Laimins LA. (2000) The E8E2C protein, a negative regülatör of viral transcription and replication, is reqeud for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J. Virol.* 74: 1178-1186
39. De Villers EM. (1994) Human pathogenic papillomavirus types: An update. *Curr Topics in Microbiol and Immunol.* 186:1-12
40. Bosch, F. X., A. Lorincz, N. Munoz, C. J. Meijer ve K. V Shah. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervicai cancer. /. *Clin. Pathol.* 55:244-265.
41. Bosch, F. X. ve N. Munoz. 2002. The viral etiology of cervicai cancer. *Virüs Kes.* 89:183-190.
42. Bosch, F. X. 2003. Cervicai cancer: advances in prevention and knowledge of its etiology. *Salud Publica Mex.* 45 (Suppl. 3):S297-S300.
43. De Villiers, E. M., D. Wagner, A. Schneider, H. Wesch, H. Miklavv, . Wahrendorf, U. Papendick ve H. Zur Hausen. (1987). Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervicai cytology. *Lancet* ii:703-706.
44. De Villiers, E. M., D. Wagner, A. Schneider, H. Wesch, F. Munz, H. Miklavv ve H. Zur Hausen. (1992). Human papillomavirus DNA in women without and with cytological abnormalities: results of a 5-year follow-up study. *Gynecol. Oncol.* 44:33-39.
45. Jeon, S. ve P. F. Lambert. (1995) Integration of human papiliomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Nad. Acad. Sci. USA* 92:1654-1658.
46. Keese, S. K., R. Domanik ve B. Patterson. (2002). Fully automated proteomic detection of cervical dysplasia. *Anal. Quavt. Cytol. Histol.* 24:137-146
47. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. (2001) Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Jama* 286:3106-31144
48. Scwartz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, Zur Hausen H. (1985) structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314:111-114
49. stoler M, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT, Broker TR. (1992) Human papillomavirus type 16 and 18 gene wxpression in cervical neoplasias. *Hum. Pathol.* 23:117-128

50. Munoz, N., F. X. Bosch, S. de Sanjose, R. Herrero, X. Castellsague, K. V. Shah, P. J. Snijders ve C. J. Meijer.(2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348:518-527.
51. Magnusson, P. K., P. Sparen ve U. B. Gyllensten. (1999) Genetic link to cervical tumours. *Nature* 400:29-30.
52. Widdice LE, Breland DJ, Jonte J, Farhat S, Ma Y, Leonard AC, Moscicki AB. (2010) Human papillomavirus (HPV) concordance in heterosexual Couples *J Adolesc Health.* 47(2): 151–159
53. Benevolo M, Mottolise M, Maradino F, Carosi M, Diodoro MG, Sentinelli S, Visca P, Rollo F, Mariani L, Vacoturo G, Sindico R, Giannuario D, Donnorso RP, Pellicciotta M, Vocaturo A. (2007) Hpv genotypes concordance between sex partners *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 26,4,2007 s:609-612
54. Laiminis LA. (1993) The biology of human papillomaviruses in Greek women with high grade cervical carcinoma. *J Med. Virol.* 48(1):80-7
55. Herrington CS. (1995) Human papillomavirus and cervical neoplasia II. Interaction of HPV with other factors. *J. Clin. Pathol.* 48(1): 1-6
56. Unger ER, Fajman NN, Maloney EM, Onyekwuluje J, Swan DC, Howard L, Back-Sague CM, Sawyer MK, Girardet RG, Sautter RL, Hammerschlag MR, Black CM. (2011) Anogenital human papillomavirus in sexually abused and nonabused children: A multicenter study *Pediatrics* Sep;128(3):e658-65
57. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005; 32: 43-51.
58. Ferns, D. G., M. Schinman ve M. S. Litaker. (2001) Cervicography for triage of women with mildly abnormal cervical cytology results. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185:939-943.
59. Wright TC Jr1, Denny L, Kuhn L, Goldie S.(2002) Use of visual screening methods for cervical cancer screening. *Obstet Gynecol Clin North Am.* Dec;29(4):701-34.
60. Wright TC, Menton M, Myrtle JF, Chow C, Singer A. (2002) Visualization techniques (colposcopy, direct visual inspection, and spectroscopic and other visual methods) Summary of task force 7 *Acta Cytol.* 46:763-800
61. Agoff, S. N., P. Un, J. Morihara, C. Mao, N. B. Kiviat ve L. A. Koutsky (2003) p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod. Pathol* 16:665-673.
62. Guo, M., L. Hu, M. Baliga, Z. He ve M. D. Hughson. (2004) The predictive value of p16(INK4a) and hybrid capture 2 human papillomavirus testing for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am. J. Clin. Pathol.* 122:894-901
63. Klaes, R., T. Friedrich, D. Spitkovsky, R. Ridder, W. Rudy, U. Petry, G. Ikenbach-Hellweg, D. Schmidt ve D. M. von Knebel. (2001) Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int.J Cancer* 92:276-284.
64. Al-Saleh, W., P. Delvenne, R. Greimers, V Fridman, J. Doyen ve J. Boniver. (1995) Assessment of Ki-67 antigen immunostaining in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. Correlation with the histologic grade and human papillomavirus type. *Am. J. Clin. Pathol.* 104:154-160

65. McIntyre, M. C., M. N. Ruesch ve L. A. Laimins. (1996) Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* 215:73-82.
66. Liao, S. Y., C. Brewer, J. Zavada, J. Pastorek, S. Pastorekova, A. Manetta, M. L. Berman, P. J. DiSaia ve E. J. Stanbridge. (1994) Identification of the MN antigen as a diagnostic biomarker of cervical intraepithelial squamous and glandular neoplasia and cervical carcinomas. *Am J. Pathol.* 145:598-609.
67. Patterson, B. R. Domanik, P. VVerneke ve M. Gombrich (2001) Molecular biomarker-based screening for early detection of cervical cancer. *Acta Cytol.* 45:36-47.
68. Fehrman, F. D. J. Klumpp ve L. A. Laimins. (2003) Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol.* 77:2819-2831.
69. Riese DJ, DiMaio D. (1995) An intact PDGF signaling pathway is required for efficient growth transformation of Mouse C127 cells by the bovine papillomavirus E5 protein. *Oncogene* 10:1431-1439
70. Hesselink, A. T., A. J. van den Brule, A. A. Brink, J. Berkhof, F. J. van Kemenade, R. H. Verheijen ve E. Snijders. (2004) Comparison of hybrid capture 2 with in situ hybridization for the detection of high-risk human papillomavirus in liquid-based cervical samples. *Cancer* 102:11-18.
71. Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, Wacholder S, Castle PE, Glass AG, Mielzynska-Lohnas I, Rush BB, Schiffmann M. (2003) Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10- year cohort analysis. *J Natl. Cancer Inst.* 95:46-52
72. Narimatsu, R. ve B. K. Patterson. (2005). High-throughput cervical cancer screening using intracellular human papillomavirus E6 and E7 mRNA quantification by flow cytometry. *Am. J. Clin. Pathol.* 123:716-723.
73. Lorincz, A. T. (2003) Screening for cervical cancer: new alternatives and research. *Salud Publica Mex.* 45(Suppl. 3):S376-S387.
74. Lorincz, A. T ve R. M. Richart. (2003) Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127:959-968
75. Belinson J, Qiao YL, Pretorius R, Zhang WH, Elson P, Li L, Pan QJ, Fischer C, Lorincz A, Zahniser D. (2001) Shanxi Province Cervical Cancer Screening Study: a cross-sectional comparative trial of multiple techniques to detect cervical neoplasia. *Gynecol Oncol.* 83:439-444.
76. Wang ZH, Kjellberg L, Abdalla H, Wiklund F, Ekiund C, Knekt P, Lehtinen M, Kallings I, Lenner P, Hallmans G, Mahick CG, Wadell G, Schiller J, Dillner J. (2000) Type specificity and significance of different isotypes of serum antibodies to human papillomavirus capsids. *J. Infect. Dis.* 181:456-462
77. Nguyen. H. H., T. R. Broker, L. T. Chovv, R. D. Alvarez, H. L. Vu, J. Andradi, L. R. Brevver, G. Jin ve J. Mestecky. (2005) Immune responses to human papillomavirus in genital tract of women with cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 96:452- 461
78. Evans, E. M., S. Man, A. S. Evans ve L. K. Borysievicz. (1997). Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res.* 57:2943-2950.

79.<http://www.ttb.org.tr/eweb/adli/5.html> (Erişim tarihi: 10.06.2014)

80.Sakda S, Peerayuh P, Amornrut L, Vitharon BY (2014) The usefulness of Neisseria gonorrhoeae strain typing by Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and DNA detection as the forensic evidence in child sexual abuse cases: a case series. *Int J Legal Med* Apr 16; s0014-014-1007

81. Altun Z, Yarkın F, Vardar MA, Uğuz AH (2010) Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine Başvuran Kadınlarda Genital Human Papilomavirus Enfeksiyon Prevalansı *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2011;31(2):307-14

82. Bruni L 2010 Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings

83. Nyitray AG, Menezes L, Lu B, Lin HY, Smith D, Abrahamsen M, Papenfuss M, Gage C, Giuliano AR (2012) Genital Human Papillomavirus (HPV) Concordance in Heterosexual Couples *The Journal of Infectious Diseases*;206:202–11

84. Giovannelli L, Bellavia C, Capra G, Migliore MC, Caleca M, Giglio M, Perino A, Matranga D, Ammatuna P (2008) HPV Group- and Type-Specific Concordance in HPV Infected Sexual Couples *Journal of Medical Virology* 79:1882–1888

85. Bleeker MC, Hogewoning CJ, Berkhof J, et al. Concordance of specific human papillomavirus types in sex partners is more prevalent than would be expected by chance and is associated with increased viral loads. *Clin Infect Dis* 2005 Sep 1;41(5):612–620.

86. Stephane K, Offord EA, Beard P. (1993) Herpes simplex virions interfere with the expression of human papillomavirus type 18 genes. *Journal of General Virology*, 74, 965-973

87. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB: Nelson's Textbook of Pediatrics. 17th edn. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2004:2334.

88. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, et al. (2003) Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* Feb 1;157(3):218–226.

89. Franceschi S, Castellsague X, Dal Maso L, Smith JS, Plummer M, Ngelangel C, Chichareon S, Eluf-Neto J, Shah KV, Snijders PJF, Meijer JCML, Bosch FX, Munoz N (2002) Prevalence and determinants of human papillomavirus genital infection in men *British Journal of Cancer* 86: 705 – 711

90. Martin IW, Steinmetz HB, Lefferts CL, Dumont LJ, Tafe LJ, Tsongalis GJ (2012) Evaluation of the Cobas 4800 HPV Test for Detecting High-Risk Human Papilloma-Virus in Cervical Cytology Specimens *Pathogens* 1, 30-36; doi:10.3390

91. Eraslan BŞ, Çakı İE, Çetin G, Yorulmaz AC İki Olgu Nedeniyle Cinsel Saldırı Vakalarında Rastlanan Hpv (Human Papilloma Virus) Enfeksiyonunun Medikolegal Olarak Değerlendirilmesi

92. Song ES, Lee HJ, Hwang TS. (2007) Clinical efficacy of human papillomavirus DNA detection in urine from patients with various cervical lesions. *J Korean Med Sci*; 22(1):99-104

93.Hammerschlag MR, Gullen CD. (2010) *Clin Microbiol Rev.* July; 23 (3): 493-506

ÖZET

Cinsel yolla bulaşan patojenlerin bir kısmının bugünkü tekniklerle alt tiplerinin ortaya çıkartılması biyolojik delillerin negatif olduğu cinsel saldırı olgularında bu patojenlerin delil olarak kullanılmasını gündeme getirmiştir. HPV'nin; bilinen 118'den fazla tipinin olması ve bu tiplerinin toplum içerisinde değişen bir prevalans göstermesi, bu virüsü, adli bilimlerde delil amacıyla kullanımı açısından iyi bir aday olarak karşımıza çıkarmaktadır.

Ancak klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda söz konusu uyumluluk ile ilgili veriler bulunmasına rağmen bu konunun Türkiye'deki mevcut imkanlar dahilinde adli amaçlı sanığa yönelik kimliklendirmede kullanılabilirliği yeterince araştırılmamıştır.

Bu amaçla; HPV'si pozitif olan kadınlardan ve biyolojik partnerlerinden yapılabilecek uyum çalışması, adli bilimlere açısından biyolojik delillerin yetersiz kaldığı cinsel saldırı olgularında, HPV'nin delil olarak kullanılıp kullanılmayacağını anlamında bazı ipuçları verebilir.

Bu doğrultuda, HPV'si pozitif olduğu bilinen 20 kadın hasta ve biyolojik partnerlerinden alınan servikal smear ve üretral akıntı örneklerinden Linear Array Yöntemi ile HPV tiplendirilmesi yapıldı.

Çalışmada en azından 1 HPV tipi açısından eşleşen örnekler uyumlu olarak değerlendirildiğinde; 16 çiftin 9'unda uyum tespit edilmedi. 7 partnerde uyum gözlemlendi. Uyum gözlemlenen 7 partnerin 4'ünde tüm tipler eşleşti, kalan 3'ünde ise mevcut tiplerin bir kısmı eşleşti. Bununla birlikte istatistiksel olarak uyum üzerinde partnerlerin ilişki sürelerinin bir etkisi olmadığı görüldü ($p>0,05$).

Çalışılan vakaların beklenen ve gözlemlenen uyum değerleri hesaplandığında; HPV tipine bağlı olarak gözlemlenen eşleşme değerinin beklenene göre 1.60-8.01 kat artmış olduğu görülmekle birlikte, HPV tiplendirilmesinin adli vakalar açısından kullanılabilirliğinin ortaya konulabilmesi için çalışmanın çok daha yüksek veri grubunda ve ileri istatistiksel analizlerle değerlendirilmesine ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

SUMMARY

Sexually transmitted pathogens of some subtypes present techniques that elicit negative of biological evidence in cases of sexual assault as evidence that these pathogens. To be more than 118 type of HPV is easily to used in forensic science evidence.

However, in clinical and epidemiological studies data were not concerned about compatibility issues, despite the existing facilities within the forensic purposes in Turkey for the defendant has not been investigated in identification availability.

Regardless of forensic science is inadequate in in terms of biological evidence in cases of sexual assault, HPV positive woman and his partnership's adjustment may be gave some tips.

In this regard, hpv's 20 female patients known to be positive and biological partners' samples taken the cervical smears and urethral discharge and these samples are performed by Linear Array and HPV typing method.

In these study at least one HPV type considered compatible when matched sample; Concordance was not detected in 9 of 16 pairs. Concordance was observed in seven partner. Concordance observed in 4 of the 7 partners all types were matched, while the remaining third part of the present type matched. However there is no relationship with a statistically significant effect on the alignment of partners time ($p > 0.05$).

Working of cases expected and observed values when calculating concordance; HPV types depending on the observed value match expected based 1.60-8.01 fold increase observed. However using these HPV typing results for forensic cases we have to collect more data and using the advanced statistical methods.

EK (1)



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



Sayı: B.30.2.İST.0.30.90.00/ 16053
Konu:



İSTANBUL
2012

İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü
Müdürlüğüne

İstanbul/...../.....

08 Haziran 2012

İLGİ: 08.05.2012 tarihli, 798 sayılı yazınıza:

Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.İlhan ONARAN'ın danışmanlığında Yüksek Lisans Öğrencisi Gülçin ŞENYİĞİT'in yürütlüçülüğünde "Linear Array Yöntemi İle Human Papilloma Virüs'ünün (HPV) Tiplendirilmesinin Adli Tıp Açısından Öneminin Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 05 Haziran 2012 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir. Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim.




Eki:
1 dosya

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ
Dekan Yardımcısı ve Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Not: Yanıtlarımızda yazımızın gün ve sayısının belirtilmesi rica olunur.
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/İSTANBUL
Telefon 0 (212) 414 32 52 Dahili: 22300 Faks: 0(212) 632 00 40 e-posta: etfetik@istanbul.edu.tr.

EK (2)

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı



İSTANBUL
2012

Sayı :B.30.2.İST.0.30.10.08/ 928
Konu :

26 Ocak 2012


CERRAHI TIP BİLİMLERİ BÖLÜM BAŞKANLIĞINA

İlgi: Dekanlığın, 19/04/2012 tarih ve 11487 sayılı yazısı hk.
ret. Med



İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalının yüksek lisans programına kayıtlı öğrencisi Gülçin ŞENYİĞİT'in "Linear Array Yöntemi ile Human Papilloma Virüsünün (HPV) Tiplendirilmesinin Adli Tıp Açısından Öneminin Araştırılması" başlıklı tez çalışmasını hazırlayabilmesi için Human papillomavirus (HPV) enfeksiyonuna sahip hastaların biyolojik örneklerinin (servikal smear ve üretral akıntı) Anabilim Dalımızdan temin etmesi tarafımızca uygun görülmüştür.

Bilgilerinize saygı ile arz olunur.


Prof.Dr.Velittin YEDİGÖZ
Anabilim Dalı Başkanı



EK (3)



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
CERRAHİ TIP BİLİMLERİ
BÖLÜM BAŞKANLIĞI**

Sayı : B.30. 2.İST.0.30.10.00/ 1961
Konu :
İstanbul/...../.....
24.04. 2012

**İSTANBUL
2012**

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,
İLGİ: Üroloji Anabilim Dalı'nın 176 sayı 24.04.2012 tarihli yazısı hk.
Üroloji Anabilim Dalı'nın 176 sayı 24.04.2012 tarihli yazısı ilişikte sunulmuştur. 26 Nisan 2012
Gereğini saygılarımla arz ederim.

Prof.Dr.İhsan TAŞÇI
Cerrahi Tıp Bilimleri
Bölüm Başkanı
Y. A. per. in. d. işi yer. ile ilgili
26 Nisan 2012
30.04.2012
Büyükdüz

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

Sayı : B.30. 2.İST.0.30.10.14/ 196
Konu :
İstanbul 24/04/2012/.....

**CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜM
BAŞKANLIĞINA**

İlgi.19/04/2012 tarih ve 11487 sayılı yazınız karşılığdır.
Per. in. d. işi

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalının yüksek lisans programına kayıtlı öğrencisi Gülçin Şenyiğit'in Linear Array Yöntemi ile Human Papilloma Virüsünün (HPV) Tiplendirilmesinin Adli Tıp açısından öneminin araştırması başlıklı tez çalışmasını hazırlayabilmesi için Human papillomavirus (HPV) enfeksiyonuna sahip hastaların biyolojik örneklerinin (servikal smear ve üretral akıntı) Anabilim Dalımızdan temin edilmesi uygun görülmüştür.
Durumu ve gereğini bilgilerinize arz ederim.

Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr.N.Ahmet Erözenci
A. Erözenci

EK (3)

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü tarafından yürütülen ve aşağıda adı geçen araştırma projesinde kullanılmak üzere biyolojik örnek (servikal smear, üretral akıntı) verme yoluyla katkıda bulunmanızı dileriz.

Projenin adı : Linear Array Yöntemi ile Human Papilloma Virüs'ünün (HPV) Tiplendirilmesinin Adli Tıp Açısından Öneminin Araştırılması

Proje Yürütücüsü: Gülçin ŞENYİĞİT

Araştırmanın amacı: Bu tez çalışmasında biyolojik örneklerden elde edilen HPV bulgularının adli bilimlerde delil olarak kullanılabilirliği araştırılacaktır. Human Papilloma Virüs; siğil etkeni yapan Papovaviridae familyasına ait olan bir DNA virüsüdür. Kutanöz ya da mukozal dokuya özgü bilinen yaklaşık 100 genotipi mevcuttur. Özellikle 16 ve 18 tipleri kadınlarda görülen servikal kanser ile ilişkilidir.

Yapılacak çalışmada; rutin tetkik amacıyla gelen HPV enfeksiyonuna sahip biyolojik partnerlerin test sonuçlarından elde edilen bulguların, birbirleri ile uyumluluğu değerlendirilecektir. Elde edilen veriler ışığında HPV'nin adli bilimler açısından ayırt edici gücü ortaya konacaktır. Ayrıca bu çalışma daha ileride yapılacak populasyon çalışmalarına temel oluşturacaktır.

Araştırmanın katılımcıya herhangi bir etkisi yoktur. Gönüllü, istediği anda araştırmacıya haber vererek araştırmadan çekilmek isteyebilir. Bu durumda araştırmacı, katılımcının örneklerini derhal imha edecektir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcının araştırma dışı bırakılacağı bildirilebilir.

Yapılacak çalışma bir yöntem oturtma olduğundan, katılımcılara test sonuçları ile ilgili herhangi bir bilgi verilmeyecektir.

Katılımcılardan elde edilen biyolojik materyallerin analizleri yurtiçinde yapılacak olup, söz konusu tez çalışması haricinde başka bir amaçla kullanılmayacaktır.

Gönüllü katılımcının kimlik bilgileri son derece gizli tutulacaktır ve hiçbir surette kimse ile paylaşılmayacaktır. Bilgilerin kullanımında şifre kullanılacaktır. Katılımcının çalışmadan herhangi bir neden ile ayrılması durumunda; tüm kayıtları silinecektir.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verilmektedir.

Bilgilendirilmiş olur: Bilgilendirilmiş olur formunu okudum ve anladım. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya; hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsünün genetik inceleme sonuçlarımı anonim bir şekilde bilimsel yayınlarında kullanmalarını kabul ediyorum.

“Linear Array Yöntemi ile Human Papilloma Virüs’ünün (HPV) Tiplendirilmesinin Adli Tıp Açısından Öneminin Araştırılması” araştırması kapsamında alınan biyolojik örneklerimin;

- Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.
- İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Araştırmacının adı - soyadı: Gülçin ŞENYİĞİT

Araştırmacının mobil telefon numarası: 05532284508

Araştırmaya gönüllü katılan kişinin

Adı – Soyadı:

Doğum yeri:

Yaşı:

İmza

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Gülçin ŞENYİĞİT

Doğum Tarihi : 14/08/1986

Doğum Yeri : İstanbul

Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans : İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü

(2009-bugün)

Üniversite : Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü

(2004-2009)

Lise : Bahçelievler Anadolu Lisesi

(2000-2004)