



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

**SERVİKAL İNTRAEPİTELYAL NEOPLAZİ (CIN) TANILI
HASTALARDA YÜKSEK RİSKLİ HPV PERSİSTANSI OLAN VE
OLMAYAN GRUPLARDA FARKLI MİKRORNA
DEĞERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

HAZIRLAYAN: DR. AYŞENUR AKKOÇ

**DANIŞMAN:
DOÇ. DR. DERYA KILIÇ**

DENİZLİ – 2024



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

**SERVİKAL İNTRAEPİTELYAL NEOPLAZİ (CIN) TANILI
HASTALARDA YÜKSEK RİSKLİ HPV PERSİSTANSI OLAN VE
OLMAYAN GRUPLARDA FARKLI MİKRORNA
DEĞERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

HAZIRLAYAN: DR. AYŞENUR AKKOÇ

DANIŞMAN:

DOÇ. DR. DERYA KILIÇ

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Biriminin 28/12/2022 tarih ve 2022TIPF032 nolu kararı ile desteklenmiştir

ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR

Bu tezi yazmamda beni yönlendiren ve konuyla ilgili bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her zaman ilgi ve desteğini gördüğüm, tezimin planlanmasında, çalışmalarımın yapılmasında ve yazım aşamasında bana destek olan tez danışman hocam Doç. Dr. Derya Kılıç'a ve değerli katkıları için Prof. Dr. Ömer Tolga Güler'e;

Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden itibaren gerek hayata karşı duruşuyla gerekse hekimlik sanatını icra etme şekliyle bana ilham kaynağı olan bize yakınlığını ve desteğini her zaman hissettiren Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam sayın Prof. Dr. İbrahim Veysel Fenkci'ye; bu uzun ve zorlu süreçte elini her zaman omzumda hissettiğim, kendime örnek aldığım Prof. Dr. Babür Kaleli, Prof. Dr. Erkan Alataş, Prof. Dr. Özer Öztekin, Doç. Dr. Cihan Kabukçu'ya; klinikte bütün sorumluluğumuzu üstlenen, abiliğini esirgemeyen Doç. Dr. Ümit Çabuş'a; beraber çalışmaktan keyif aldığım değerli hocalarım Doç. Dr. Özlem Koşar Can ve Doç. Dr. Soner Gök'e;

Asistanlık sürecimde kendimi evimde gibi hissettiren, iyiliğe olan inancımı kaybetmememi sağlayan, klinikteki ailem olan, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndaki sevgili asistan arkadaşlarıma, en başından itibaren yanımda olan ve zor günlerimde dayanağım olarak bana kardeşlik eden sevgili dostum Dr. Dide Almira Şahin'e, ekip olarak keyifle çalıştığım bize her zaman yardımcı olan kliniğimizdeki tüm sağlık çalışanlarına;

Varlığıyla ruhumdaki tüm yoklukları bertaraf eden, yaşama dair her anımda yol gösteren, bana doğru bildiğim yolda yılmadan mücadele etmeyi öğreten canım anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. SERVİKS ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ.....	4
2.1.1 Serviks Anatomisi	4
2.1.2 Serviks Histolojisi	6
2.1.2.1 Çok Katlı Non Keratinize Skuamoz Epitel.....	7
2.1.2.2 Kolumnar Epitel.....	8
2.1.2.3. Skuamokolumnar Junction	9
2.1.2.4 Skuamoz Metaplazi	10
2.1.2.5 Transformasyon Zonu.....	11
2.2 HPV.....	12
2.2.1 Genel Bilgiler.....	12
2.2.2 Risk Faktörleri	16
2.2.3 HPV Persistansı ve HPV Enfeksiyonunun Doğal Seyri	18
2.2.4 HPV Enfeksiyonunun Servikal Kanser Gelişimi ve Progresyonundaki Rolü	19
2.3 SERVİKSİN PREMALİGN LEZYONLARI-CIN.....	23
2.3.1 Tarama Programları	25
2.3.2 CIN Yönetimi.....	26
2.3.3 Doğal Seyir	26
2.4 miRNA.....	27

2.4.1 Hpv İlişkili Servikal Kanser Gelişimi Progresyonu ve Metastazında	
Mirna Nın Rollerı	32
2.4.1.1 HPV ve miRNA.....	32
2.4.1.2 Servikal Kanserde miRNA Disregölasyonu	34
2.4.2 Çalışma Kapsamındaki miRNA'lar	37
2.4.2.1 miR-125b-5p.....	37
3. GEREÇ YÖNTEM	46
4. BULGULAR.....	51
4.1. DEMOGRAFİK VERİLER	51
4.2. miRNA SONUÇLARI.....	52
4.3. miRNA GRAFİKLERİ	53
4.4. KORELASYON ANALİZİ SONUÇLARI	59
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ	69
KAYNAKÇA.....	71

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

AIS	: Adenokarsinoma in situ
ASCCP	: American Society for Colposcopy and Cervical Pathology
CDK	: Cyclin Dependent Kinase
CIN	: Cervical Intraepitelial Neoplazi
CSF-1R	: Colony Stimulating Factor 1 reseptor
DNMT-1	: DNA Metil Transferaz-1
EGF	: Epidermal Growth Factor
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
HR-HPV	: High risk HPV
HSIL	: High Grade Intraepitelial lesion
HSV	: Herpes Simplex virüs
ISCC	: In situ cervical cancer
LCR	: Long Control Region
lncRNA	: Long noncoding RNA
LR-HPV	: Low risk HPV
LSIL	: low grade intraepitelial lesion
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleksi
miRNA	: micro RNA
ncRNA	: Non coding RNA
OK	: Oral Kontraseptif
OncomiR	: Onkojenik miRNA
ORF	: Open Reading Frame
PDGFBR	: Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta

RB	: Retinoblastom
RISC	: RNA Inducing Silencing Complex
SCC	: Skuamoz Hücreli Kanser
SCJ	: Skuamocolumnar Junction
SNP	: Single Nucleotid Polimorfizm
tsmiR	: Tümör Süpresör miRNA
TZ	: Transformasyon Zonu
VEGF	: Vasculer Endotelial Growth Factor

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1. Serviks anatomisi (16)	5
Şekil 2. Kadın reproduktif sistem (17).....	6
Şekil 3. Serviksin squamöz epiteli	8
Şekil 4. Serviksin kolumnar epiteli	8
Şekil 5. Skuamokolumnar junction.....	9
Şekil 6. Transformasyon zonu	11
Şekil 7. Transformasyon zonu çeşitleri.....	12
Şekil 8. HPV genomu	15
Şekil 9. HR-HPV enfeksiyonunun hücredeki etkileri (67)	19
Şekil 10. Servikste lezyonlar	24
Şekil 11. Risk durumuna göre CIN lezyonlarının yönetimi (96).....	26
Şekil 12. miRNA kanonik sentezi (111)	28
Şekil 13. DNMT ve p53 ilişkisi (111)	33
Şekil 14. miR-125 ailesi.....	38
Şekil 16. miR-182-5p'nin etki mekanizması (181).....	41
Şekil 17. hsa-mir-182.....	53
Şekil 18. hsa-mir-18a	54
Şekil 19. hsa-mir-148b.....	54
Şekil 20. hsa-mir-29a-5p.....	55
Şekil 21. hsa-mir-34a	55
Şekil 22. hsa-mir-21-5p	56
Şekil 23. hsa-mir-9-5p	56
Şekil 24. hsa-mir-143-5p	57
Şekil 25. hsa-mir-125b-5p	57
Şekil 26. hsa-mir-125a	58
Şekil 27. hsa-mir-34c-3p.....	58
Şekil 28. hsa-mir-372.....	59
Şekil 29. hsa-mir-375.....	59

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No:
Tablo 1. HPV ilişkili risk faktörleri.....	17
Tablo 2. mRNA İzolasyonu İçin Kullanılan Materyal Bilgileri.....	47
Tablo 3. Demografik veriler	51
Tablo 4. HSIL tanı anındaki ve son kontroldeki saptanan HPV'ler.....	52
Tablo 5. miRNA'ların fold change değerleri ve p değerleri	53
Tablo 6. Demografik verilerle miRNA arasındaki korelasyon	60
Tablo 7. Hastaların medikal durumları ile miRNA değerlerinin analizi	60

ÖZET

Servikal İntraepitelyal Neoplazi Tanılı Hastalarda Yüksek Riskli HPV Persistansı Olan ve Olmayan Gruplarda Farklı mikroRNA Değerlerinin Karşılaştırılması

Dr. Ayşenur AKKOÇ

Serviks kanseri kadınlarda dördüncü en sık görülen jinekolojik kanserdir. Son yıllarda aşı uygulamaları ve tarama programları ile erken teşhis ve önlemede ilerleme kaydedilmiş olsa da hala önemli bir mortalite nedenidir. Serviks kanserinin etyolojisinde en sık neden Human Papilloma Virus (HPV) enfeksiyonudur. Yüksek riskli HPV tipleri ile persiste eden enfeksiyon servikal kanser gelişiminin bir numaralı risk faktörüdür. miRNA'lar ise posttranslasyonel olarak gen ifadesini düzenleyen kısa kodlanmayan RNA molekülleridir. HPV enfeksiyonu konak hücredeki etkisini viral proteinlerin, gen ekspresyonunu düzenleyen miRNA'ların aktivitesini etkileyerek hücrel transformasyona neden olması ile gerçekleşir. miRNA'lar ayrıca hücrelerde proliferasyon, apoptozis, metastaz ve hücrel immün yanıtı düzenleyerek kanser gelişiminde rol oynarlar. HPV enfeksiyonu, serviks kanseri ve miRNA ilişkisinin anlaşılması tanı, prognoz ve tedavi süreçlerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Bizim de amacımız persistan HPV öyküsü olan hastalardan hangilerinde progresyon olacağının belirlenebilmesi ve bu yolda prognostik bir belirteç oluşturabilmektir.

Çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde başlangıçta yüksek riskli HPV enfeksiyonu olan ve yüksek dereceli servikal intraepitelyal neoplazi (HSIL) tanısı konulmuş ve daha önceden tedavisi yapılmış takip altındaki olgular çalışma grubu olarak tanımlandı. Bu olgular rutin takiplerine devam ederken kronolojik sıraya göre çalışmaya katılmaya davet edildi. Çalışmayı kabul eden 100 olgu takipleri sırasında iki ayrı grupta değerlendirildi; HPV pozitif olanlar (HPV persistansı olan grup) ve HPV negatifleşenler (HPV persistansı olmayan grup). Çalışma grubundan, kabul eden bireylerden, rutin jinekolojik muayene sırasında servikal smear örneği alınarak bu spesmenlerden miRNA düzeyleri (miR-125b-5p, miR-125a, miR-21-5p, miR-18a, mi-9-5p, miR-34c-3p, miR-182, miR-148b, miR-34a, miR-29a-5p, miR-375, miR-143-5p, miR-372) çalışıldı. Servikal sürüntü örneklerinden miRNA

çalışılarak HSIL gelişimi ile persiste eden HPV enfeksiyonu arasında miRNA düzeylerinin farklılık gösterip göstermediği araştırıldı. Olguların rutin takip ve gerekli tedavilerine olağan şekilde devam edilmiş ve çalışma kapsamında hastalara deneysel herhangi bir invaziv girişim ya da ilaç uygulaması yapılmamıştır.

HPV negatifleşen grup 62 kişi ve HPV persiste eden grup ise 38 kişi idi. Yapılan miRNA değerlendirmesinde miR-125a ($p<,001$), miR-34c-3p ($p=0,004$), miR-375'de ($p=0,023$) HPV persiste eden grupta persiste etmeyen gruba göre ekspresyon artışı görülürken miR-143-5p'nin ($p=0,027$) ekspresyonunda azalma görüldü. Diğer miRNA'ların ekspresyon değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi. miRNA değerleri ile demografik veriler arasında yapılan korelasyon analizinde de anlamlı bir ilişki tespit edilmedi.

Serviks kanserinde miRNA'ların rolü giderek daha fazla anlaşılmaktadır. HPV persiste eden hastalarda anlamlı çıkan miRNA değerleri ile oluşturulacak bir miRNA paneli mevcut tarama testleri ile kullanımını HPV persistansı olan hastalarda prognostik bir faktör olarak kullanılabilir ve hatta tedaviye yön verebilir. Elde edilen bulgular ışığında miRNA'lar erken tanı, tedavi ve prognozu öngörme gibi süreçlerde kullanılabilir gibi görünmektedir. miRNA tabanlı teşhis çalışmaları için daha çok çalışma ve standardizasyona ihtiyaç vardır. Ayrıca HPV enfeksiyonu, displazi gelişimi ve karsinom gelişimi olan hastalarda miRNA düzeylerini ayırt edebilmek için daha çok hasta sayısının dahil edildiği daha geniş kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: HPV, Serviks Kanseri, miRNA, Gen Ekspresyonu, Hedefe Yönelik Tedavi

ABSTRACT

COMPARISON OF DIFFERENT MICRORNA LEVELS IN PATIENTS DIAGNOSED WITH CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA (CIN) WITH AND WITHOUT HIGH-RISK HPV PERSISTENCE

Dr. Ayşenur Akkoç

Cervical cancer is the fourth most common gynecological cancer in women. Despite advancements in vaccination and screening programs for early detection and prevention in recent years, it remains a significant cause of mortality. The most common etiological factor for cervical cancer is HPV (Human Papillomavirus). Persistent infection with high-risk HPV types is the primary risk factor for the development of cervical cancer. miRNAs (microRNAs) are short non-coding RNA molecules that regulate gene expression post-transcriptionally. HPV infection exerts its effects on host cells by inducing cellular transformation through modulation of the activity of miRNAs that regulate gene expression. Additionally, miRNAs play a role in regulating cellular processes such as proliferation, apoptosis, metastasis, and cellular immune response, thereby influencing cancer development. Understanding the relationship between HPV infection, cervical cancer, and miRNAs will facilitate the development of diagnostic, prognostic, and therapeutic strategies. Our aim is to identify which patients with a history of persistent HPV infection will progress, and to establish a prognostic marker in this regard.

The study included cases diagnosed with high-grade cervical intraepithelial neoplasia (HSIL) at the Department of Obstetrics and Gynecology, Pamukkale University Hospital, who had previously undergone treatment and were under follow-up. These cases were defined as the study group, and they were invited to participate in the study in chronological order during their routine follow-up visits. Among the 100 cases who agreed to participate in the study, they were evaluated in two separate groups: those who were HPV positive (the group with HPV persistence) and those whose HPV status turned negative (the group without HPV persistence). During routine gynecological examinations, cervical smear samples were obtained from consenting individuals, and miRNA levels (miR-125b-5p, miR-125a, miR-21-5p, miR-18a, mi-9-

5p, miR-34c-3p, miR-182, miR-148b, miR-34a, miR-29a-5p, miR-375, miR-143-5p, miR-372) were analyzed from these specimens. The study aimed to investigate whether there were differences in miRNA levels between HSIL development and persistent HPV infection by analyzing miRNAs from cervical smear samples. Routine follow-up and necessary treatments of the cases were continued as usual, and no experimental invasive procedures or drug applications were performed on the patients as part of the study.

In the study, there were 62 individuals in the group where HPV became negative and 38 individuals in the group where HPV persisted. In the evaluation of miRNA, an increase in expression was observed in miR-125a ($p < 0.001$), miR-34c-3p ($p = 0.004$), and miR-375 ($p = 0.023$) in the group with persistent HPV compared to the group without persistence, while a decrease in expression was observed in miR-143-5p ($p = 0.027$). There was no statistically significant difference in the expression values of other miRNAs. Correlation analysis between miRNA values and demographic data did not reveal a significant relationship.

The role of miRNAs in cervical cancer is increasingly understood. A miRNA panel generated from significant miRNA values identified in patients with persistent HPV infection could be used alongside existing screening tests as a prognostic factor in patients with HPV persistence and may even guide treatment decisions. In light of the findings, miRNAs appear to have potential applications in processes such as early diagnosis, treatment, and prognosis prediction. However, more research and standardization are needed for miRNA-based diagnostic studies. Additionally, larger-scale studies involving more patients are required to differentiate miRNA levels in patients with HPV infection, dysplasia, and carcinoma development.

Key Words: HPV, Cervical Cancer, miRNA, Gene Expression, Targeted Therapy

1. GİRİŞ

Serviks kanseri, gelişmekte olan ülkelerdeki kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerindedir. 2020 yılında dünya çapında 604.127 yeni vaka tespit edilmiş ve 341.831 kadın serviks kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiştir (1). HPV virüsünün yüksek riskli tipleri (HR-HPV) servikal kanser gelişimi için birincil risk faktörüdür (2). HPV enfeksiyonu sonucu gelişen servikal skuamöz hücreli kanser ve adenokanser histolojik tipleri tüm invaziv servikal kanserlerin %95'ini oluşturur (3). Son yıllarda tarama programları ve HPV aşısı nedeniyle servikal kanser indisansı azalmış olsa da kırsal bölgede yaşayan veya soskoekonomik durumu kötü olan hastalarda bu imkanlara erişmekte zorlanabilmektedir (4). Bu nedenle tarama programları servikal karsinom gelişimini önlemede ve erken tedavi etmede önem arz etmektedir.

Servikal kanserin en sık görülen tipi HPV ilişkili skuamöz hücreli kanser diğeri yine HPV ilişkili adenokanserdir. Yaklaşık 200 adet HPV türü tanımlanmış olsa da Uluslararası Kanser araştırma ajansı tarafından 12 tanesi yüksek riskli onkojen olarak belirlenmiştir. Ancak vakaların yarısını HPV 16 ve %10'unu HPV 18 oluşturmaktadır (5). Dünya çapındaki serviks kanserlerinin %99'unda HR-HPV tespit edilmektedir. HR-HPV ile persiste enfeksiyon serviks kanserinin birincil nedenidir (6).

Servikal skuamöz hücreli karsinom gelişiminden önce genellikle HPV enfeksiyonuna bağlı olarak skuamöz intraepitelyal lezyonlar (CIN) gelişir, bu nedenle viral nükleik asitlerin tespiti, onkolojik tarama programları ile servikal kanser gelişiminin etkili bir şekilde önlenmesinde kullanılır. HR-HPV'ler tarafından persiste eden enfeksiyon olmasına karşın az sayıda kadın invaziv serviks kanserine ilerler (7). HPV enfeksiyonunu kapsayan Düşük Dereceli Skuamöz İntraepitelyal Lezyonlar (LSIL) veya CIN1 (servikal intraepitelyal neoplazi derece 1) olarak adlandırılır. Orta (CIN-2) ve şiddetli (CIN-3) displaziler ise Yüksek Dereceli Skuamöz İntraepitelyal Lezyonlar (HSIL) olarak sınıflandırılır. CIN1'de anormal proliferatif hücreler sadece epitelin alt üçte birinde bulunur. CIN2 ve CIN3, neoplazinin epitelin alt üçte ikisine (CIN2) veya daha fazlasına (CIN3) genişlemesi ile karakterize edilir. Bazen, CIN3 epitelin tüm kalınlığını içerir ve aynı zamanda in situ karsinom (ISCC) olarak da

bilinir. Düşük dereceli lezyonu olan kadınların yalnızca %10-20'sinde yüksek dereceli lezyon gelişir ve ISCC hastalarının %30'undan azı, neoplazi alttaki stromaya invaze olarak invaziv servikal tümörlere ilerleyebilir (8). Bu nedenle, diğer tümör promotör faktörleri kanser patogenezinin dahil edilmelidir. Bu faktörlerin belirlenmesi erken tanı için çok önemlidir ve serviks kanserinin daha etkin tedavisi ve prognozu için faydalı olabilir.

HPV genomları altı erken (E1, E2, E4, E5, E6 ve E7) ve iki geç proteini (L1 ve L2) kodlar (9). Yüksek riskli HPV'ler tarafından kodlanan E6 ve E7 onkoproteinleri, enfekte servikal hücreleri etkileyen çok aşamalı karsinoma dönüşüm sürecinin ana oyuncularını olarak kabul edilir (10). E6; p53 ve hücre PDZ proteinlerini bağlayarak bozulmasına neden olur ve telomeraz aktivitesini başlatır. Böylece konak hücrede p53 aracılı apoptozu ve yaşlanmayı inhibe eder. E7 ise retinoblastoma proteinini (pRB) bağlar ve yapısını bozar, bu durum genomik kararsızlığı indükleyerek anormal ve sürekli konak hücre proliferasyonu ile malign ilerlemeye katkıda bulunan sürekli mitotik hücre döngüsüne neden olur (8). Çoğu çalışma, genellikle servikal karsinogenezin desteklenmesiyle ilişkili konak hücre proteinlerinin genetik düzensizliğine odaklanır. Son yıllarda, araştırmalar kodlamayan RNA'lara (ncRNA'lar), özellikle mikroRNA'lara (miRNA'lar) yönelmiştir. miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3'-UTR'sinde tamamlayıcı veya tamamlayıcıya yakın sekanslarla hibridizasyon yoluyla kodlama genlerinin ekspresyonunu negatif olarak düzenleyen, 19 ila 24 nükleotid uzunluğunda yüksek oranda korunmuş küçük çift sarmallı ncRNA'lardır (11).

Kansere özgü spesifik vakalarda, miRNA disfonksiyonunun, tümöral gelişimin başlaması, ilerlemesi ve yayılmasında çok önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. miRNA'lar; proliferasyon kapasitesinde artış, apoptoz direnci, invazyon ve metastaz, artan anjiyogenez ve büyüme inhibitör sinyallerinden kaçınma gibi kanserojen sürecin ana özelliklerini etkileyebilir (12). Çeşitli tümör tiplerinde miRNA'lar, tümör baskılayıcılardan veya proto-onkogenlerden gelen transkripsiyon faktörlerini hedefleyerek işlev görür (13). Kanser türlerinde anormal miRNA ekspresyonu farklılık göstermektedir. Herhangi bir tümör tipindeki miRNA profili, terapötik hedefler veya tanısal ve prognostik belirteçler gibi çeşitli uygulamalar sağlayabilir. Ancak tanı veya

tedavide kullanılabilmesi için onkojenik veya tümör süpresör rollerinin anlaşılması ve fonksiyon kaybının veya artışının tümör ilerlemesini nasıl etkilediğinin bilinmesi gerekmektedir. OncomiR'ler baskılama ve düzenleme ile tsmiR'ler ise aşırı ekspresyon ile tedavide anlamlı rol oynayabilirler (14). Bununla birlikte, miRNA'ların tanı veya tedavi için kullanılması için onkojenik veya tümör baskılayıcı rollerinin ve disfonksiyonlarının tümör ilerlemesini nasıl etkilediğinin anlaşılmasına ihtiyaç vardır. OncomiR'ler, susturma veya modülasyon yoluyla ekspresyonlarına müdahale edilerek kanser tedavisinde anlamlı bir rol oynayabilme ihtimali mümkünken, tsmiR'lerin yönlendirilmiş aşırı ekspresyonu terapötik etkiler sergileyebilir (14). Serviks kanseri, HPV enfeksiyonu ve patogenezinde etkili miRNA'larla ilgili yapılan çalışmalarda çok sayıda miRNA'nın bu yolda rol aldığı gösterilmiştir.

Biz de serviks kanseri ve HPV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu düşünülen 13 adet miRNA (miR-125b5p, miR-125a, miR-21-5p, miR-18a, mi-9-5p, miR-34c-3p, miR-182, miR-148b, miR-34a, miR-29a, miR-375, miR-143-5p, miR-372) varlığını ve ekspresyon seviyelerini karşılaştırdık. Daha önce CIN tanısı almış ve tedavi sonrası persiste eden ve etmeyen hastalar arasında bu karşılaştırmayı gerçekleştirdik. Amacımız persistan HPV öyküsü olan hastalarda uzun takip süresine ve yüksek maliyetli tarama protokollerine maruz bırakılmadan, progresyon olacağının belirlenebilmesi ve dolayısı ile de kanser gelişimi açısından erken tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesine yönelik katkı sağlamaktır. Bu birlikteliğin saptanması hastaların taranma programı ve önleyici tıp müdahaleleri açısından son derece önemlidir. Servikal HPV persistansı olan olgularda miRNA varlığının belirlenmesi risk gruplarının belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Aynı zamanda çalışma sonuçlarının hasta takip protokollerinde risk bazlı yönetime imkân verme ve maliyetleri düşürme potansiyeli açısından önemlidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SERVIKS ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

2.1.1 Serviks Anatomisi

Serviks; uterin istmus ile vajen arasındaki silindirik şeklindeki uterus bölümüdür. Uterin kaviteyi vajene bağlayan fibromuskuler bir organdır. Yaklaşık 2-2,5 cm uzunluğunda -bazı kaynaklara göre 3-4 cm- 2,5 cm genişliğinde olup uterusun alt 1/3'lük kısmını oluşturur. Serviksin iç boşluğunda servikal kanal denilen bir kanal bulunmaktadır. Alt kısmı vajenin içine doğru uzanmıştır. Bu nedenle supravajinal ve vajinal olmak üzere iki bölümden oluşur.

Portio supravajinalis; Serviks'in vajen üst kısmında kalan 2/3'lük üst bölümünü oluşturur. Ön ve arka olmak üzere iki yüzü ve iki kenarı vardır. Ön yüzü mesanenin arka üst yüzü ile komşuluk yapar. Aralarında fibröz bağ dokusu bulunur ve peritonsuzdur. Parametrial bağ dokusu içinde uterin arter üreteri çaprazlayarak serviksin 2 cm ön tarafına kadar uzanır. Arka yüzü rektouterin plikalar arasında rectouterin boşluğu oluşturur. Yan kenarlarda ureter ile 1,5 cm mesafeden komşuluk yapar. Servikal kanalın uterusuna açıldığı internal servikal os bu bölümde bulunur.

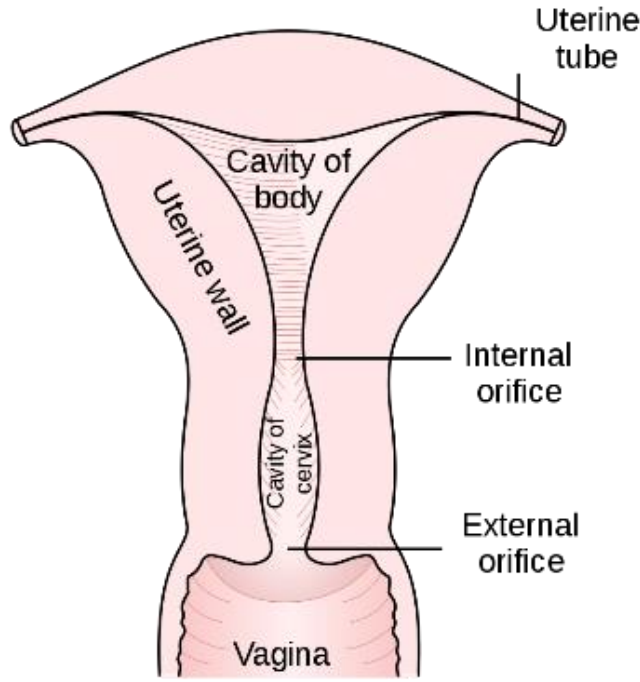
Portio vajinalis: vajen içinde kalan serviks bölümüdür. Alt 1/3'lük kısmını oluşturur. Eksternal servikal os bu bölümde bulunur. Bu delik servikal kanalın dışarı açıldığı kısımdır. Serviks ile vajen üst duvarı arasında forniks adı verilen çıkmaz bulunur. Anterior, posterior ve lateral kısımlardan oluşur.

Embriyoloji: Embriyolojik hayatta serviks, tuba uterinalar, uterus ve vajen üst 1/3'lük kısım parametonefrik kanaldan köken alarak gelişirler.

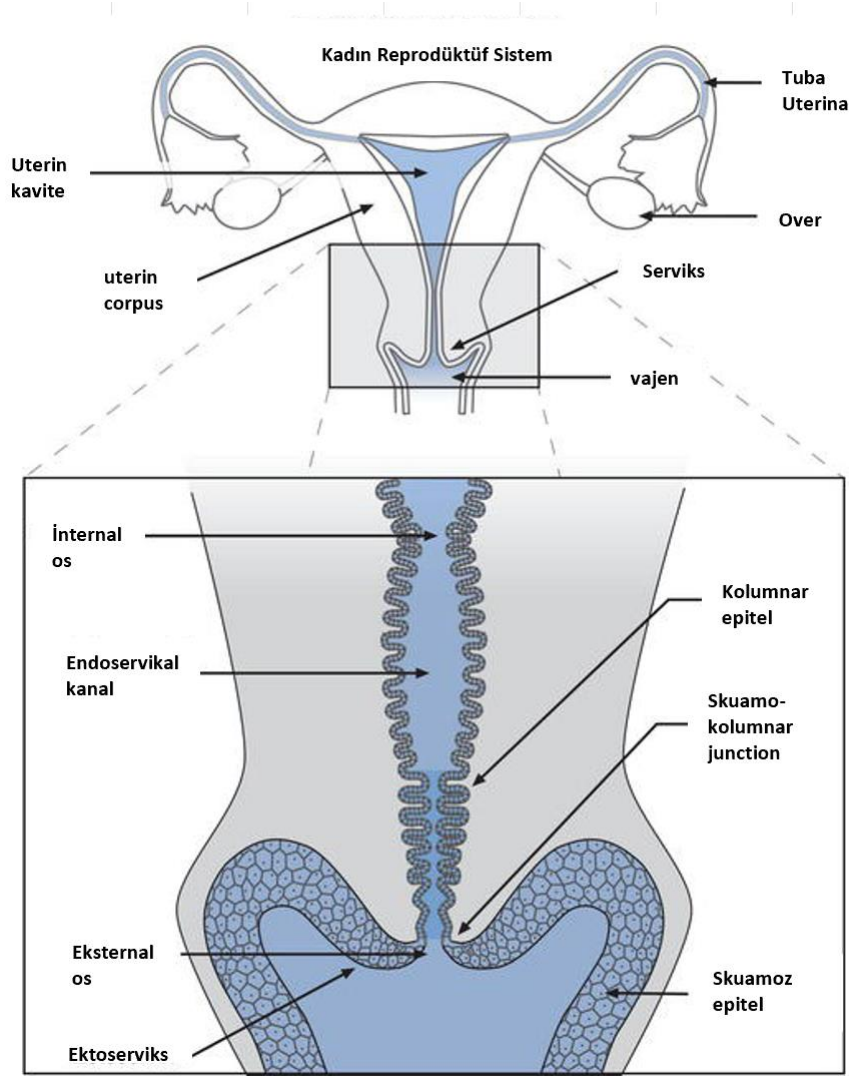
Damarları: serviksin kanlanması inernal iliak arterin dalı olan Uterin arterden ayrılan servikal ve vajinal dallar ile gerçekleşir. Uterin arterin servikal dalları serviksin her iki lateralinden iner. Serviksin venleri arterlere paralel şekilde ilerler ve hipogastrik pleksusa dökülür.

Lenfatik: serviksten gelen lenfatik damarlar eksternal iliak, internal iliak, obturator ve sakral lenf nodlarına drene olur.

Sinirleri: T12-L2 sempatik lifleri ve S2-S4 parasempatik lifleri ile innerve olur (15). Bu lifler hipogastrik pleksustan köken alır. Endoserviks geniş duyuşal sinir uçlarına sahiptir ancak ektoservikte bu sinir uçları azdır. Bu nedenle biyopsi, ablasyon, kriyoterapi gibi işlemler kadınlarda iyi tolere edilir. Endoserviks içinde sempatik ve parasempatik liflerin bulunması nedeniyle endoservikal işlemler vazovagal reaksiyonlara neden olabilir.



Şekil 1. Serviks anatomisi (16)



Şekil 2. Kadın reprodüktif sistem (17)

2.1.2 Serviks Histolojisi

Servikal histoloji farklı bölümlerde farklı yapıya sahiptir. Endoservikal kanal kolumnar epitel ile döşenmişken, ektoserviks çok katlı skuamoz epitel ile döşenmiştir. Eksternal servikal os hizasında kolumnar epitelden skuamoz epitele geçiş hattı skuamokolumnar junction (SCJ) denilen bir kesişme noktası ile belirlenir. SCJ değişkendir ve erken ergenlik döneminde ve gebelik esnasında dışarıya doğru yer değiştirir. Orijinal SCJ endoservikal kanalda bulunur ancak ergenlik sonrasında ektoserviks üzerine doğru yer değiştirerek ve yeni SCJ'ı oluşturur. Eski SCJ ve yeni SCJ arasındaki geçiş bölgesi Transformasyon Zonu (TZ) olarak adlandırılır.

Reproduktif dönemde genellikle ektoservikste bulunur, postmenapozal dönemde tekrar endoservikse döner. SCJ'nin konumu yaş, menstrüasyon, gebelik gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir.

Spekulum muayenesi ile eksternal servikal os çıplak gözle net olarak görülebilir. Serviksin görünen dış yüzeyi ve vajen skuamoz epitel ile döşelidir. Serviksin en sık görülen skuamoz hücreli karsinomu TZ'da başlar. Endoserviksi döşeyen glandüler hücreden köken alan adenokarsinom ise TZ'unun üst kısmından veya endoservikal kanaldan köken alır (18).

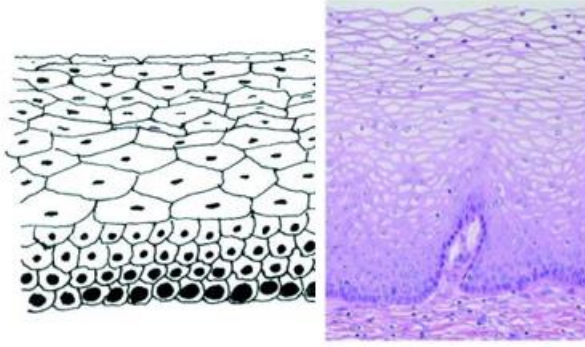
Servikal stromal doku fibromuskuler dokudan oluşur. İçerisinden damar, lenf ve sinirler geçer. Daha önce belirtildiği gibi serviks çok katlı nonkeratinize skuamoz ve kolumnar epitelten oluşmaktadır. Bu iki epitel SCJ denilen bölgede bir araya gelir.

2.1.2.1 Çok Katlı Non Keratinize Skuamoz Epitel

Ektoserviksin büyük kısmı ve vajenin tamamı çok katlı skuamoz epitel ile döşelidir. Olgun skuamoz epitelin glikojen içermesi nedeniyle Lugol ile kahverenkli boyanır ve bunun sebebi iyotu çekmesidir. Bu teste Schiller testi denir ve normal skuamoz epitelde Schiller testi negatiftir. Anormal gelişen hücrelerde glikojen eksikliği olması nedeniyle epitel dokusu lügol solüsyonunun iyotunu çekmez ve bu duruma Schiller testi pozitif denir. Normal skuamoz epitel çıplak gözle bakıldığında pürüzsüz ve hafif pembe renkli bir görünüme sahiptir. Gebelik esnasında vaskülaritenin artması nedeniyle mavimsi bir renk alır.

Epitel ile stromal tabakayı ayıran bir bazal membran bulunur. Basal membrana yakın olan hücrelere bazal hücreler denir ve çekirdekleri büyüktür ve koyu boyalı olarak görülür. Bazal membran düzdür ve aralıklı olarak stromal çıkıntılar içerir. Bazal hücreler bölünerek daha üst kısımdaki parabazal hücreleri oluşturur. Parabazal hücreler de kendisinden daha üstte bulunan yüzeyel (süperfisiyal) hücre tabakasını oluşturur. Yüzeye doğru gittikçe hücrelerin çekirdek boyutu azalır ve daha fazla olgunlaşır. Özetle bazal katmandan süperfisiyal katmana gidildikçe hücre boyutları artar ve çekirdek boyutu azalır (Şekil 3).

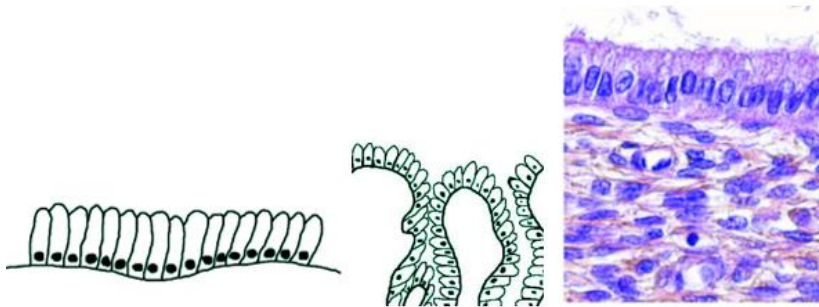
Servikal epitelin normal olgunlaşması östrojene bağlıdır. Östrojen eksikliğinde olgunlaşma ve glikojenizasyon gerçekleşmez. Bu nedenle postmenapozal dönemde parabazal hücreler daha fazla olgunlaşamaz ve katman sayısı azalır. Epitel ince ve atrofik hale gelir. Muayene esnasında soluk görünür ve küçük travmalarla kırmızı peteşiler oluşabilir.



Şekil 3. Serviksin squamöz epiteli

2.1.2.2 Kolumnar Epitel

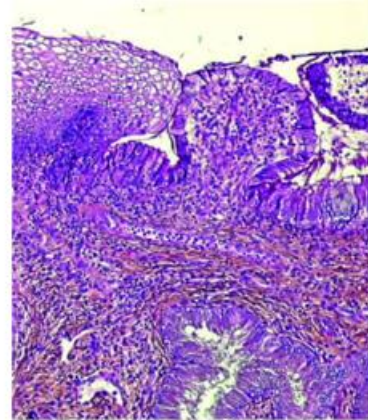
Endoservikal kanal glandüler epitel olarak da adlandırılan kolumnar epitel ile döşelidir. Bu epitel bazal membrana yakın olarak yerleşmiş çekirdeklere sahip tek katlı hücrelerden oluşur. Muayene esnasında tek sıra hücrelerden oluşması nedeniyle vasküler tabaka görülebilir durumdadır ve kırmızımsı renkte görülebilir. Üst sınırlarda endometrial epitel ile birleşir. Alt kısımlarda ise serviksin skuamöz epiteli ile birleşerek SCJ'ı oluşturur. Servikal kanalda düz bir yüzey epiteli bulunmamaktadır. Kanalın lümenine doğru uzanan kıvrımlı bir yapısı vardır. Bazı bölgelerde içeri doğru kıvrılarak endoservikal bezleri oluşturur. Glikojenizasyon gerçekleşmez ve mitozu uğramaz. Kolumnar epitel lügol solüsyonu ile renk değiştirmez (Şekil 4).



Şekil 4. Serviksin kolumnar epiteli

2.1.2.3. Skuamokolumnar Junction

Daha önce de belirtildiği gibi skuamoz epitelin kolumnar epitel ile birleşim gösterdiği yere SCJ denir. Konumu ve sınırları kadınlarda hayatı boyunca değişkendir. Yaş, hormonal durum, doğum travması, oral kontraseptif kullanımı, gebelik gibi birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterir. Doğumda var olan SCJ eksternal osaya yerleşiktir ve bu konumdaki ismine orijinal SCJ denir. Puberte sonrası östrojenin etkisiyle serviks endoservikal kanal ile birlikte büyüme gösterir. Bu durum kolumnar epitelin ektoservikse doğru ilerlemesine neden olur. Bu duruma ektropion veya servikal eversiyon denir. Orijinal SCJ eksternal osadan uzaklaşır. Spekulum muayenesinde net bir şekilde görülür. Görüntünün yanıltıcı olabilmesi nedeniyle bazen erozyon şeklinde yanlış isimlendirme yapılabilmektedir. Gerçekte servikste bir erozyon yoktur (19). Ektropion gebelikte daha da belirgin hale gelir. Bazı klinisyenler ektropiyonun normalin bir varyantı olduğunu savunurken bazıları kornik servisit ile ilişkili olabileceğine inanmaktadır (20). Ektropion bazı kadınlarda vajinal akıntı, lökore, postkoital kanama ve dispareniye neden olabilmektedir (21). Zamanla vajenin asidik pH'sına maruz kalması ile kolumnar hücreler skuamoz hücelere evrilirler. Bu duruma skuamoz metaplazi denir. Böylece ektropion metaplazi ve epitelizasyon ile zaman içinde azalır (Şekil 5) (22).



Şekil 5. Skuamokolumnar junction

2.1.2.4 Skuamoz Metaplazi

Puberte sonrası kolumnar epitelin skuamoz epitel ile yer değiştirmesine skumoz metaplazi denir. Fizyolojik ve geri dönüşümsüz bir süreçtir. Dönüşen skuamoz hücreler tekrar kolumnar hücreye dönüşemez. Vajinal asiditenin bu süreçte rol oynadığı düşünölmektedir. Metaplazi ilerledikçe, transformasyon zonu orijinal SCJ'dan yeni SCJ'a doğru ilerler. Böylece ektropiyon alanı zamanla azalır. Asidik ortama maruz kaldıkça kolumnar epitel tabasında rezerv hücreler ortaya çıkar, çoğalır ve skuamoz hücreler haline gelir. Rezerv hücrelerin kökeni tam olarak bilinmemektedir.

Skuamoz metaplazinin ilk bulgusu rezerv hücrelerinin ortaya çıkmasıdır. Kolumnar epitelin arasında tek sıra halinde küçük yuvarlak hücreler halinde görülür. Morfolojik olarak rezerv hücreleri skuamoz epitelin basal hücrelerine benzer. Metaplazi süreci ilerledikçe rezerv hücreleri çoğalır ve farklılaşarak ince çok hücreli bir epitel oluştururlar. Bu yeni oluşan metaplastik epitele immatur skuamoz metaplastik epitel denir. Yeni immatur epitel glikojen üretmez ve lugol ile kahverengi boyanmaz. Bu aşamada immatur skuamoz epitelin arasında müsün içeren kolumnar hücreler görölebilir.

Aynı anda birçok noktada metaplastik süreç başlayabilir veya farklı bölgelerde farklı hızlarda ilerleyebilir. Kolumnar epitelin bazal membranının çözündüğü ve rezerv hücreler yerleştikçe yeniden oluştuğu öne sürölmüştür. Metaplazi genellikle orijinal SCJ'da başlar. Süreç ilerledikçe matür stratifiye metaplastik epitele dönüşür. Matur skuamoz epitelin aralarında mukus boşlukları veya birkaç adet kolumnar hücre görölebilir. İnküzyon kistleri içerebilir. Naboth kistleri endoserviksteki kript açıklıklarının üzerinin metaplastik epitel ile örtölerek kapanması sonucu oluşan retansiyon kistleridir. Kolumnar epitel mukus salgılamaya devam eder ve kisti doldurup genişletir. Kist içindeki kolumnar epitel basınç etkisiyle zamanla düzleşerek yok olur. Metaplazik epitel tarafından kapatılmayan kript açıklıkları değişmeden kalmaya devam eder.

Olgunlaşmamış (immatür) metaplazik epitel, olgun (matür) skuamoz metaplazik epitele dönüşebileceği gibi onkojenik HPV tipleri ile enfekte olan hücreler atipik

hücrelere dönüşebilirler. Bu atipik hücreler zamanla kontrolsüz çoğalarak anormal displastik bir epitelin oluşmasına neden olabilir. Bu epitel bu şekilde kalabilir veya invaziv karsinoma ilerleyebilir.



Şekil 6. Transformasyon zonu

2.1.2.5 Transformasyon Zonu

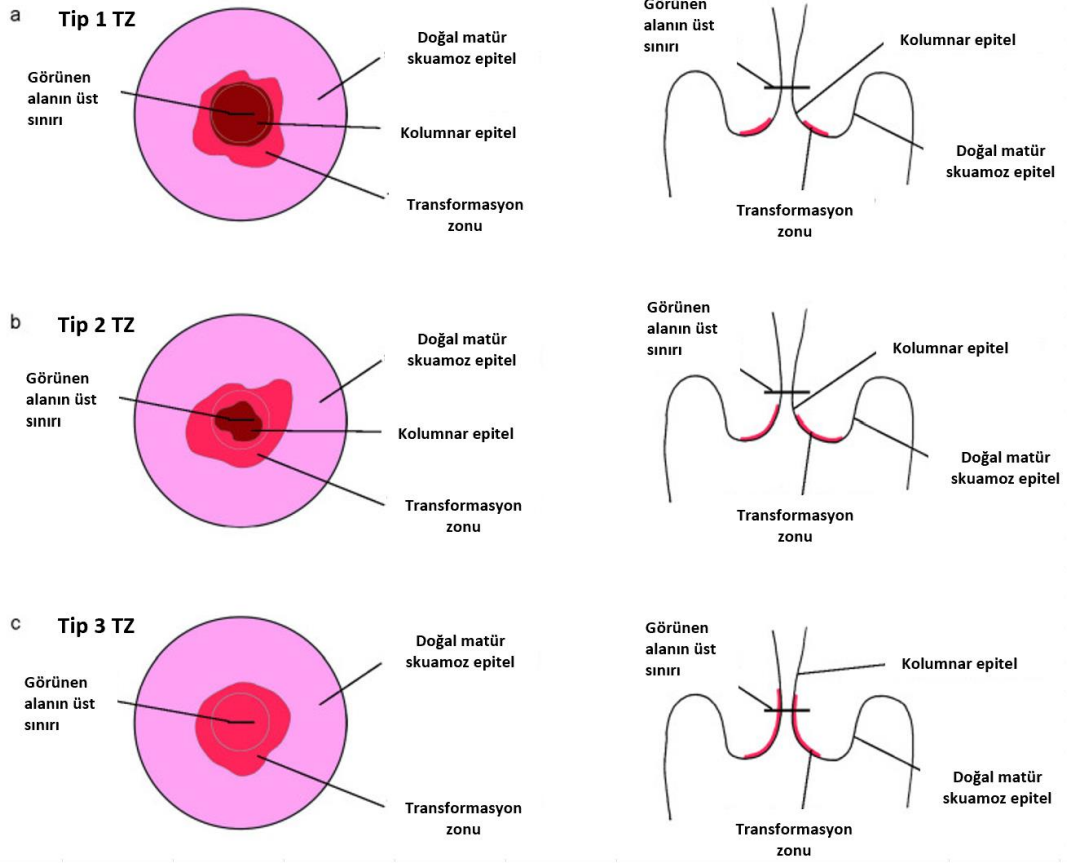
Daha önce de belirtilmiş olduğu gibi TZ; orijinal SCJ ile yeni SCJ arasındaki metaplastik epitel alanıdır. Kolumnar epitelin skuamoz epitele dönüştüğü metaplazi süreci çoğunlukla adölesan dönemde ve ilk gebelik sırasında meydana gelir. Metaplazi tamamlandığında HPV enfeksiyonuna dirençli olduğu düşünülmektedir. Ancak dinamik TZ, HPV enfeksiyonuna duyarlıdır ve TZ'nin epitelinin bazal tabakalarını enfekte edebilir ve bazı hastalarda intraepitelyal lezyon gelişimini başlatabilir. Hangi hastalarda lezyon gelişeceği ve hangilerinin invaziv karsinoma ilerleyeceği net olarak belirlenememiştir. İnsanların büyük kısmı cinsel yaşamlarının bir döneminde HPV ile enfekte olur ve büyük çoğunluğu herhangi bir anormal patolojiye neden olmaksızın enfeksiyon geriler. TZ'nun büyüklüğü ve konumu değişkenlik göstermektedir. Konumuna göre TZ'ları 3 alt gruba ayırılır. Kolposkopik muayene esnasında TZ'nun tüm bileşenleri net bir şekilde görülmelidir (18).

Transformasyon zonunun tipleri (Şekil 7);

Tip 1- Tamamen ektoservikal, tamamen gözüküyor

Tip 2- Endoservikal komponent var, ancak tamamı görülebilir

Tip 3 – ektoservikal komponent var ve tamamen görülmüyor (23).



Şekil 7. Transformasyon zonu çeşitleri

2.2 HPV

2.2.1 Genel Bilgiler

HPV tüm dünyada hem kadınlarda hem erkeklerde en sık görülen cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlardan biridir. Türkiye’de HPV tip 16 ve tip 18 prevalansı %4,2 ile %67,6 arasında değişmektedir (24). Hem kadınlar hem erkekler asemptomatik taşıyıcı, bulaştırıcı veya enfektif olabilirler. HPV enfeksiyonu bireysel seksüel davranışlarla ilişkilidir (25). İnsanların %80’i hayatlarının bir bölümünde HPV ile enfekte olur ve enfeksiyon genellikle seksüel aktivite başlangıcından kısa süre sonradır. Genellikle bu

dönem puberte sonrası ve genç yetişkinlik döneminde olsa da bazı yetişkinlerin de yeni HPV enfeksiyonuna yakalanma riski vardır (26). Ancak enfekte olanların %90'ı, 9-12 ay içerisinde immun sistem tarafından spontan olarak remisyona uğratılır (27).

HPV enfeksiyonu çoğunlukla geçicidir ve asemptomatik olarak seyretmesi nedeniyle birçok kişi enfekte olduğunun farkına bile varmaz. Ancak yüksek riskli HPV genotipleri ile persistan enfeksiyonu olan kişilerde malignite gelişimine neden olabilmesi açısından önem arz etmektedir. Kalıcı enfeksiyonlar genellikle 10-20 yıl içinde servikal, anal, vajinal, vulvar, penil ve orofaringeal kanserlere neden olur (28). Serviks kanserinin %99'undan, vulvar kanserlerin %91'inden, vulvar kanserlerin %69'undan, vajinal kanserlerin %75'inden, penil kanserlerin %63'ünden ve orofaringeal kanserlerin %75'inden HPV sorumludur (26). Bu nedenle hastalığa neden olmadan HPV'den korunmak oldukça önemlidir. Bu kapsamda risk faktörü olan kişilerin belirlenmesi, birincil koruma için HPV aşısı uygulamaları, ikincil koruma olarak tarama testlerinin yapılması önerilmektedir (28, 29). Birçok kadın cinsel yaşamları boyunca en az bir çoğunlukla birden fazla HPV tipiyle enfekte olur. Toplam maruziyet ölçümü enfeksiyonun çoğunlukla geçici olması nedeniyle net olarak belirlenmemektedir. Burada esas sorun hangi hastada kalıcı hale gelip hangi hastalarda persiste ederek karsinoma ilerleyeceğinin net olarak bilinemesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca çoğu prekanseröz ve kanseröz lezyon genellikle asemptomatik hastalarda tarama sonrası tespit edilmektedir (30).

Serviks kanseri kadınlarda jinekolojik kanserler arasında endometrium ve over kanseri sonrası üçüncü sırada yer alır. Tüm kanser türleri arasında dokuzuncu sıklıkta görülür. Türkiye'deki insidansı 2020 yılında 4,3/100.000 olarak tespit edilmiştir (31). HPV ve servikal kanser arasındaki ilişki ilk kez 1983 yılında Harald zur Hausen tarafından tanımlanmıştır. Malign servikal tümör biyopsilerinde HPV 16'nın varlığını göstermiştir (32). Diğer anogenital kanserlerden olan vulva kanserlerinin de çoğunluğu skuamoz hücreli karsinomdur. HPV prevalansı vulvar intraepitelyal neoplazi veya siğillerin eşlik ettiği kanserlerde %90'dır (33). Ancak keratinize SCC'de sadece %6 oranında bulunur. Vulvar karsinomlarda en sık HPV 16 gösterilmiştir. Daha az bir bölümünde ise HPV 18,21,31,33,34 tespit edilmiştir. Vajen kanserlerinin %85'i HPV ilişkilidir ve invaziv tümörlerin %60'ında HPV 16 saptanmıştır (34).

Enfekte ettiği dokuya göre kutanöz tipler ve mukozal tipler olarak ikiye ayrılır. El ve ayak derisini enfekte edebilen tiplere kutanöz tipler denirken ağız, farinks, respiratuar sistem ve anogenital bölge epitelini enfekte edebilen tipe ise mukozal tip HPV adı verilir. Mukozal tip HPV'ler prekanseröz olup olmamasına göre yüksek ve düşük riskli olarak ayrılır. Servikte kanser ve kanser öncüsü prekürsör lezyonlara neden olan HPV'ler, yüksek riskli HPV (HR-HPV) alt tipleridir (35). HR-HPV tiplerinden yaygın olarak bilinenler; 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68'dir. İnvazive serviks kanserine neden olan alt tipler ise %70 oranda HPV 16 ve 18'dir (36). HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61 ve 72 düşük riskli HPV (LR-HPV) olarak tanımlanmıştır ve benign anogenital siğiller ve laringeal papillomlarla ilişkilidirler. HPV 53, 66, 70, 73 ve 82'nin alt tipi belirli değildir ve yüksek veya düşük riskli HPV grubuna ait değildirler (37). Anogenital sistemi enfekte eden yaklaşık 30-40 adet ve neoplastik lezyonlara neden olan ise 35'den fazla HPV tipi bulunmuştur (7, 38).

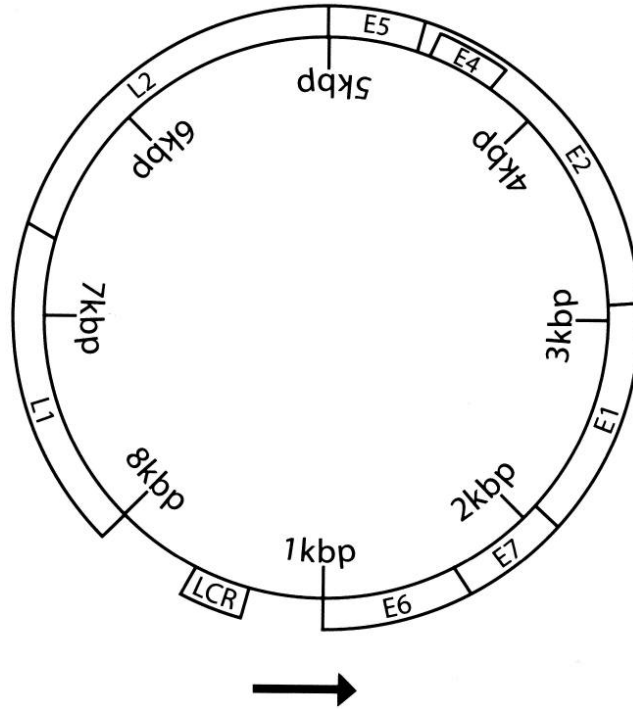
Papillomavirsler; polyomavirslerle beraber Papovaviridae ailesinin üyesidir. Papillomavirsler dünyada yaygın olarak bulunur (39). İnsanlarda olduğu gibi hayvanlarda da tespit edilmiştir ve konağa özel enfeksiyon oluştururlar. şu ana kadar tanımlanan 200'den fazla HPV türü bulunmaktadır (40). HPV virüsü de Papillomaviridae ailesinden zarfsız, çift sarmallı DNA virüsüdür (38). Yaklaşık 56°C sıcaklığa, kimyasal maddelere ve kurumaya karşı dayanıklıdır (41). Partikülleri yaklaşık 55 nm'dir ve çift sarmallı genomu yaklaşık 7200-8000 baz çiftinden oluşur. Viral kapsid; 2 kapsid proteini üzerine kurulmuş olan 72 ikosahedrik kapsomerden oluşur (42). Her kapsomer, başlıca kapsid proteini olan L1'in pentameridir. Her virion kapsidi, birkaç kopya minör kapsid proteini içerir. Tek iplikli dsDNA genomunun  genomik bölgesinde transkripsiyonel olarak işlev gören on adet ORF (open read frame) bulunur (41).

HPV genomu 3 işlevsel bölgeye ayrılmıştır; uzun kontrol bölgesi (LCR), onkogenezele ilgili 6 tane proteini içeren erken bölge ve L1, L2 proteinlerini kodlayan 2 adet geç bölge (şekil 8) (43).

İlk bölge onkogenezele ilgili proteinleri içeren erken bölgedir. Erken bölge proteinleri E1, E2, E4, E5, E6, E7 olmak üzere 6 adettir. Bu proteinler virüs

replikasyonu ve transkripsiyonunda görevlidir. İkinci bölge L1 ve L2 proteinlerini kodlayan geç bölgedir (9). HPV genomunun üçüncü bölgesi DNA replikasyonunun başlangıcını içeren ve aynı zamanda transkript kontrol dizilerini barındıran, uzun kontrol bölgesi (long control region- LCR) veya yukarı akış düzenleyici bölgesi (upstream regulatory region) olarak adlandırılan kodlanmayan bölgedir (44). LCR bölgesi transkripsiyonu kontrol ederek DNA replikasyonunu düzenleyen geliştirici ve sessizleyici dizileri içeren p97 çekirdek promotorunu içerir ve viral genomdaki en yüksek derecede varyasyon bu bölgede bulunur (45).

E1, E2, L1, L2, ve E4 proteinleri kor protein, E5, E6 ve E7 ise aksesuar protein olarak adlandırılır (46).



Şekil 8. HPV genomu

Erken protein genleri viral replikasyon ve transkripsiyon için gereklidir. E1; viral replikasyon için gerekli ATP bağımlı bir DNA helikazdır. Genom replikasyonunda rol oynar. E2; E6 ve E7'nin ekspresyonunu düzenleyen bir regülatör proteindir (47).

E4; E2 geni içerisinde bulunur. Sitokeratin filamentlere bağlanarak yapısını bozar ve keratinize epitelde kaçış yolu oluşturur (44).

E5; küçük bir transmembran proteinidir. Endozomlardaki vakuolar ATPaz aracılığıyla proteinlerin taşınmasını kontrol eder, epidermal growth faktör (EGF) reseptörü dönüşümünü modüle ederek endozomun asitleşmesini engeller. Ayrıca endoplazmik retikulumun transmembran lipoproteini ile birleşerek proliferasyon sinyali oluşturur. Bu sayede hücre çoğalmasını artırır ve kanser progresyonuna neden olur (48, 49).

E6; p53'ü baskılar, Bcl-2 ekspresyonunu azaltır, Bak proteinin (proapoptotik protein) yapısını bozar, FAS proteinine (apoptoz indükleyen bir protein) bağlanır. Tüm bu mekanizmalar ile apoptozis inhibisyonuna neden olur (50). Ayrıca hücre dönüşümüne ve malignitelerdeki onkojenik ilerlemeye katkıda bulunur. E6'nın bağlanması, İrf-3 fonksiyonlarını önemli ölçüde bastırarak doğal bağışık yanıtın baskılanmasına neden olur (51).

E7; hücre bölünmesini tetikleyici transkripsiyon faktörleri olan pRB, p107 ve p130'a bağlanarak kontrolsüz hücre bölünmesine ve malign transformasyona neden olur (50). RB' bağlandığı zaman siklin-D bağımlı kinaz fonksiyonunu baskılayarak hücre siklusunun G1 fazından S fazına geçişi sağlar (52).

L1; majör kapsid proteinidir. Enfeksiyon sırasında farklılaşmış servikal epitelin üst tabakasında üretilen virion kapsidin ana bileşenidir ve başlıca viral reseptör olan heparan sülfatın bağlanması için gereklidir. L2; minör kapsid proteinidir ve konak hücreye girişteki viral genomu içerir (27).

2.2.2 Risk Faktörleri

HPV enfeksiyonun bulaşması sonrası persiste etmesine ve malign transformasyona neden olabilecek bazı risk faktörleri tanımlanmıştır. Bu risk faktörlerinden bazıları erken yaşta seksüel ilişkiye başlamak, yaşam boyu çok sayıda cinsel partner olması, partnerin eş zamanlı çok sayıda seksüel partneri olmasıdır. Erkek sünneti ve prezervatif kullanımı bulaşı azaltabilir ancak tamamen engellemez (53, 54). Serviks kanseri cinsel aktif kadınlarda HPV virüsü kaynaklı olarak gelişir. Genetik

geçişli değildir ve diyet şeklinin kanseri önlemede bir etkisi gösterilememiştir (55). HPV ile ilişkili risk faktörleri tabloda özetlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. HPV ilişkili risk faktörleri

HPV ilişkili risk faktörleri
İlk cinsel ilişki yaşı
Çok sayıda cinsel partner
Parite
Sigara içimi
Eşlik eden enfeksiyonlar (klamidya, hsv vb)
Uzun süreli OK kullanımı
Servikal displazi

Yaş ve Partner Sayısı; ilk cinsel ilişkinin menarşta veya pubertede olması serviks kanseri riskini arttırmaktadır (56). 18 yaş ile 21 yaş ve üstü karşılaştırıldığında serviks kanseri oranı 2 kat artar. Tek partner ve iki partner karşılaştırıldığında iki partnerli hastalarda risk iki katına, altı veya daha fazla partnerle üç katına çıkmaktadır (57).

Parite; İlk gebelik yaşının 18 yaş altında olması ve dört ve daha üzerindeki gebelik sayısı hem HPV enfeksiyonu hem de servikal kanser için risk faktörüdür (58).

Sigara; sigara içimi birçok kanserin risk faktörü olduğu gibi servikal kanserin de risk faktörüdür. Sigaranın metabolitleri serviks hücrelerinde DNA hasarına katkıda bulunarak karsinom sürecinin ilerlemesine neden olur. Sigara içen ve içmeyen hastalar karşılaştırıldığında serviks kanseri riski sigara içen hastalarda iki kat artmıştır (59). Ek olarak sigara içimi immun sistemi baskılayarak HPV enfeksiyonunun servikal maligniteye ilerleme ihtimalini arttırmaktadır (60).

Eşlik Eden Enfeksiyon: klamidy ve HSV enfeksiyonları ile ko-enfeksiyon olması HPV enfeksiyonu riskini artırır. HIV enfeksiyonu immün supresyona neden olması nedeniyle HPV enfeksiyonunun malignleşme sürecine katkıda bulunur (58).

Ok Kullanımı; 5 yıldan uzun süreli OK (oral kontraseptif) kullanımı servikal kanser riskini artırır. Her 5 yılda bir risk 1,9 kat artmaktadır (5, 58) HPV'nin LCR bölgesi, progesteron ve deksametazon gibi glukortikoidlere benzer dizilime sahiptir. Bu nedenle uzun süreli OKS kullanımı yüksek dereceli displazi gelişme riskine neden olur (61).

İmmün Yanıt: HPV enfeksiyonuna karşı primer bağışık yanıt hücrel immünite ile sağlanır. Bu nedenle T lenfosit aracılı hücrel bağışıklığı etkileyen organ nakli, HIV enfeksiyonu gibi sebepler HPV enfeksiyonunun maligniteye ilerlemesini kolaylaştırır (62).

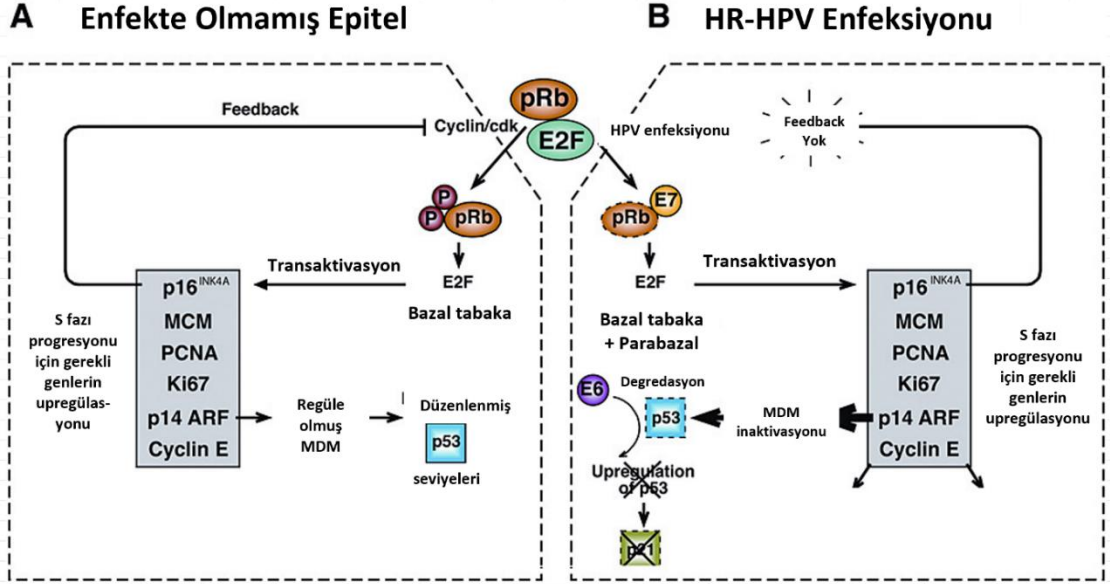
Displazi: CIN2, CIN3 nedeniyle tedavi alan hastalarda risk iki ile üç kat artmaktadır (58).

HPV 16 enfeksiyonu en uzun süre persiste eden HPV türüdür. Ortalama 16 ayda regresyon izlenmiştir (63). Yüksek riskli HPV tiplerinde persistan enfeksiyon ve taşıyıcılık görülen hastalar anogenital yolda neoplastik lezyon gelişimi açısından da yüksek riskli gruptadırlar.

2.2.3 HPV Persistansı ve HPV Enfeksiyonunun Doğal Seyri

Daha önce de belirtildiği gibi servikal HPV enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu maruziyetten sonra 1-2 yıl içinde T hücre aracılı hücrel bağışıklık tarafından kontrol altına alınır (64). HPV enfeksiyonunun persiste ettiği süre arttıkça remisyona uğrama ihtimali azalır ve prekanseröz lezyon oluşturma riski artar. Yaş ile HPV'nin kalıcılığı artar. Bunun olasılıklı sebebi zaten uzun süredir persiste eden enfeksiyonlarının bulunmasıdır (65). Çalışmalar aynı HPV tipinin takip eden yıllar içerisinde yeniden ortaya çıkabildiğini göstermiştir. Enfeksiyonun virüsün epitelin bazal tabakasında düşük seviyelerde replike olduğu latent bir durum sonucu olduğu düşünülmektedir. İkincil HPV enfeksiyonunun pik yaptığı postmenapozal kadınlardır. Bu duruma hücrel bağışık yanıtının yaşlanması sonucu latent enfeksiyonun veya yeni cinsel

partnerlerin rolü sebep olabilmektedir. Ancak sitolojik anormallik olmadan uzun süreli HPV pozitifliği olan yaşlı kadınlarda servikal kanser gelişimi düşük bulunmuştur, bu da latent enfeksiyondan reaktivasyon gelişmesinin çoğunlukla zararsız olduğunu düşündürmektedir (66) (Şekil 9).



Şekil 9. HR-HPV enfeksiyonunun hücredeki etkileri (67)

2.2.4 HPV Enfeksiyonun Servikal Kanser Gelişimi ve Progresyonundaki Rolü

HPV ilişkili neoplastik lezyon oluşumu en çok serviks ve anal kanalın pektineal hattında görülür. Diğer virüsler gibi HPV de konak hücrede düzenleme ve kontrol mekanizmalarının bozulmasına yol açarak replike olur ve yayılır. HPV enfeksiyonu HPV DNA ölçümü ile saptanır. Kadınlarda serviks, vajen ve vulvada, erkeklerde glans, prepiyum, penis ve skrotumda hem kadınlarda hem erkeklerde anal kanal ve perineal alanda enfeksiyon görülebilir (7).

Persiste eden enfeksiyon görülmesinde daha önce de değinilmiş olan risk faktörleri etkilidir. Viral tip, hücre DNA'sına giren viral DNA miktarını etkileyen viral yük, hastanın immünitesi başlıca faktörlerdir. Diğer faktörler arasında; uzun süreli OKS kullanımı, yüksek parite, sigara içimi, diğer cinsel yolla bulaşan hastalıklarla (chlamidya, HSV tip 2) co-infeksiyondur. Diyet ile ilişkili veriler tartışmalıdır; diyetin

bir risk faktörü olduğunu belirten çalışmalar olduğu gibi etkisiz olduğunu söyleyen veriler de vardır (68-70).

Enfeksiyon sonrası viral epizomun kopya sayısı yaklaşık 200'dür (71). Viral replikasyon proteinleri olan E1 ve E2 başlangıçtaki amplifikasyon fazında görev yapar. Ancak kopya sayısı stabilize olduktan sonra epizomal sürdürülebilirlik için replikasyon geri planda kalır (72).

HPV replikasyonu konakçı hücrede HPV genomunun LCR bölgesiyle etkileşime girmesi ve E6 ve E7 genlerinin transkripsiyonlarının başlaması sonucu aktif hale gelir. E6 ve E7 konak hücrede, tümör supresor genleri, siklinleri ve siklin bağımlı kinazları bağlayıp etkisiz hale getirerek hücre döngüsünü bozar. Kontrolsüz hücre bölünmesini tetikler. E6 ve E7 gen ürünleri viral replikasyonu sağlayan konak hücredeki değişikliklerin gerçekleşmesinde aktif rol oynar (73). Hücre siklusu başlıca iki protein tarafından düzenlenir; p53 ve pRB. P53, DNA hasarı veya programlanmamış DNA replikasyonu gerçekleştiğinde hücresel kontrolü sağlayan DNA bağlayıcı bir proteindir (74). Hücre döngüsünün durdurulması, DNA tamiri, apoptozda görev alarak homeostazı sağlamakta görevlidir. Serviks kanserindeki p53 genellikle agresif tiptedir ve mutasyona uğramış değildir. E6; p53'e bağlanarak parçalanmasına neden olur böylece işlevini yerine getiremez hale gelir. Bu parçalanmayı ubiquitin ligaz aracılığıyla gerçekleştirir. Düşük riskli HPV'lerde E6 p53 ile etkileşime girmez (75). E6 aynı zamanda telomerazın katalitik alt birimi olan hTERT aktivasyonu ile telomeraz aktivitesini arttırabilir, SRC family kinaz parçalanmasını engelleyebilir. Bu mekanizmalarla da hücre büyümesini ve mitotik aktiviteyi uyarabilir (76). E7 ise pRB'nin hipo-fosforile haline bağlanır. Bu bağlanma sonucu açığa çıkan E2F-1 hücresel transkripsiyon faktörü ile olan kompleksi bozarak hücre bölünmesinin S fazına girmesi için gerekli olan genlerin transkripsiyonunu sağlar, DNA sentezini ve proliferasyonu uyarır. Ayrıca siklin E gibi diğer mitoz uyarıcı proteinlerle de etkileşime girer (73). Ayrıca E7, sentriol amplifikasyonunu indükleyerek genomik karasızlığa neden olur ve hücre yüzeyindeki MHC kompleksini (majör histokompatibilite kompleksi) azaltarak bağışık yanıtı kaçmasını sağlar (67). E5 ise mitozu aktive eden protein kinaz aktivitesini arttırarak büyüme ve farklılaşmaya, sürekli uyarılmış proliferasyona ve bozulmuş diferansiyasyona neden olur. Bu etkisini

EGFR, PDGFBR (platelet derived growth factor B reseptör) ve CSF-1R (colony stimulating factor 1 reseptör) gibi büyüme faktörlerini indükleyerek gösterir (77). Aynı zamanda DNA hasarından sonra apoptoz gerçekleşmesini önler ve MHC sınıf 1 fonksiyonuna etki ederek bağışık yanıtta kaçınmasına katkıda bulunur (67). Bu olayları takiben E2, E6 ve E7'nin transkripsiyonunu engeller, E1'in LCR içinde yer alan viral replikasyon kaynağına bağlanmasına izin verir. Bu süreç devamlı sabit seviyede viral genom replikasyonunu sağlar. E2'nin E6 ve E7'yi baskılaması konak hücrenin normal diferansiyasyonuna olanak sağlar.

Viral replikasyon sürecinin sonraki aşamalarında tespit edilen geç bir promotör, L1 ve L2'yi aktive eder ve çekirdeğe viral partikülleri entegre eder. E4, viral partiküllerin olgunlaşmasını ve salınmasını sağlar. Ancak sitolitik etkili değildir. Viral DNA epitelin tüm katlarına yayılır. Siğil veya kondilomlarda viral replikasyon bazal tabaka hariç tüm epidermal tabakalarda gerçekleşir. Bunun sonucunda karakteristik histolojik bulgular ortaya çıkar; akantoz, parakeratoz, hiperkeratoz, koilositoz. Bazal tabaka hücrelerindeki aşırı proliferasyon premalign ve malign hastalıkta görülür (78).

Serviks kanseri ve HPV ilişkisi, patogenezi nispeten daha iyi anlaşılabilen karsinojenik süreçtir. HR-HPV tipleri, E6-E7 gen ürünlerinin yapısı ve fonksiyonları ile diğer HPV tiplerinden ayrılır. HPV ilişkili benign lezyonlarda viral DNA nükleusta kromozom dışında bulunur. Yüksek dereceli intraepitelyal neoplazilerde ve kanserlerde ise HPV DNA genellikle konak genomuna entegredir. DNA entegrasyonu, E2 ORF'ninin bozulmasına ve E2'nin ekspresyon kaybına neden olur (79). (ORF: open reading frame- açık okuma çerçevesi. Bir genin asıl kodlayan bölgesi). E2'nin ekspresyon kaybı E6 ve E7'nin baskılanmamasına ve aktivitelerinin devam etmesini sağlar. E6 ve E7 daha önce de belirtildiği gibi p53 ve pRB'ye bağlanır, hücrenin proliferasyon hızını artırır, genomda kararsızlık yaratır. Sonuç olarak konak hücrede gittikçe onarılmayan daha fazla miktarlarda DNA birikir, keratinositlerin immortalitesine neden olur. Keratinosit immortalitesi için E6 ve E7 ortak çalışır. Ancak yüksek düzeyde E7 de kendi başına hücrenin ölümsüz olmasını sağlayabilir (80). En sonunda karsinojen gelişimine neden olan mutasyonlar birikir. Karsinom gelişimine ve mutasyonlara neden olan mekanizmalar arasında aktifleşmiş proto-onkogenler, kromozomal instabilite, viral ve hücresel DNA'nın metilasyonu,

telomeraş aktivasyonu, hormonal ve immunogenetik faktörler sayılabilir. Bütün bu karsinojen süreç 10-20 yılda gerçekleşir. Bazı lezyonlar ise bir veya iki yıl gibi kısa sürelerde kansere dönüşebilir (81).

Karsinom patofizyolojisi HPV'nin E6 ve E7 eksprese edebilme kapasitesi ile güçlü oranda ilişkilidir. Her iki protein de hücre siklusuna, hücre tamiri sinyal yollarına ve apoptoza etki eder (82, 83). HPV enfeksiyonu ile normal servikal dokudan invaziv kansere ilerleyiş çoklu basamaklardan geçen bir süreçtir. Bu ilerleyiş onkojenik viral proteinler olan E6 ve E7'nin desteklediğı bir süreçle ilerler.

E6 ve E7 proteinleri patogeneşde etkin rol oynasa da HR-HPV tipleri neoplazi geliştirmesi açısından bazı belirgin özelliklere sahiptir. Örnek olarak HPV 16 ve 18'deki E6 proteinleri, hücre şekil düzenlemesinde rol alan PDZ proteinlerine bağlanarak işlevsiz hale getirir. Bu özellik düşük riskli HPV tiplerinde bulunmaz (84).

Persistan HR-HPV enfeksiyonu servikal skuamoz intraepitelyal lezyonlara (SIL) neden olabilir. Bu lezyonlar hafif displaziler (servikal intraepitelyal neoplazi- CIN1), orta dereceli displaziler (CIN2) ve yüksek dereceli displaziler (CIN-3) olarak sınıflandırılır. CIN1 lezyonlar diğeri bir tanımlamada düşük dereceli skuamoz intraepitelyal lezyonlar (LSIL) olarak adlandırılırken CIN2 ve CIN3 lezyonlar yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyonlar (HSIL) olarak adlandırılır. CIN1 epitelin alt 1/3'ünde sınırlı anormal proliferasyonu ifade eder. CIN2 lezyonlar alt 2/3'ünde proliferasyonu, CIN3 lezyonlar ise 2/3'ünden daha fazla olan neoplaziyi tanımlar. CIN3 lezyonların epiteli tam kat tutmasına servikal karsinoma in situ (ISCC) adı verilir. LSIL olan kadınların %10-20'si HSIL'a ilerler ve karsinoma in situ olanların %30'dan daha azı stromayı aşarak invaziv karsinom geliştirir (8). Düşük dereceli lezyonlar olan CIN1/LSIL'ın önemli bir belirtisi suprabazal hücre katmanlarında koilositlerin bulunmasıdır

HSIL lezyonların %70-90'ında, LSIL lezyonların %20-50'sinde viral DNA tespit edilir. İnvaziv karsinoma neden olan HPV alt tiplerinin çoğunluğunu 4 HPV tipi oluşturur (HPV 16, 18, 45, 31) (7).

HPV enfeksiyonu sonrası neoplazi gelişimi büyük oranda enfeksiyondan 10-20 yıl sonra gelişmektedir (7). Bu nedenle HPV enfeksiyonunun erken tespiti ve tedavisi daha ciddi sonuçlar neden olmadan önce yapılması önem arz etmektedir.

Ek olarak HPV ilişkili karsinogenezde miRNA'lar oldukça etkin görünmektedir. miRNA'lardaki ekspresyon değişiklikleri karsinogenezle ilişkilidir ve bu değişikliklerin birçok mekanizmanın yanında çoğunlukla PI3K/Akt sinyal yolağını hedefler (85). HPV ve miRNA ilişkisine ileriki bölümlerde daha detaylı değinilecektir.

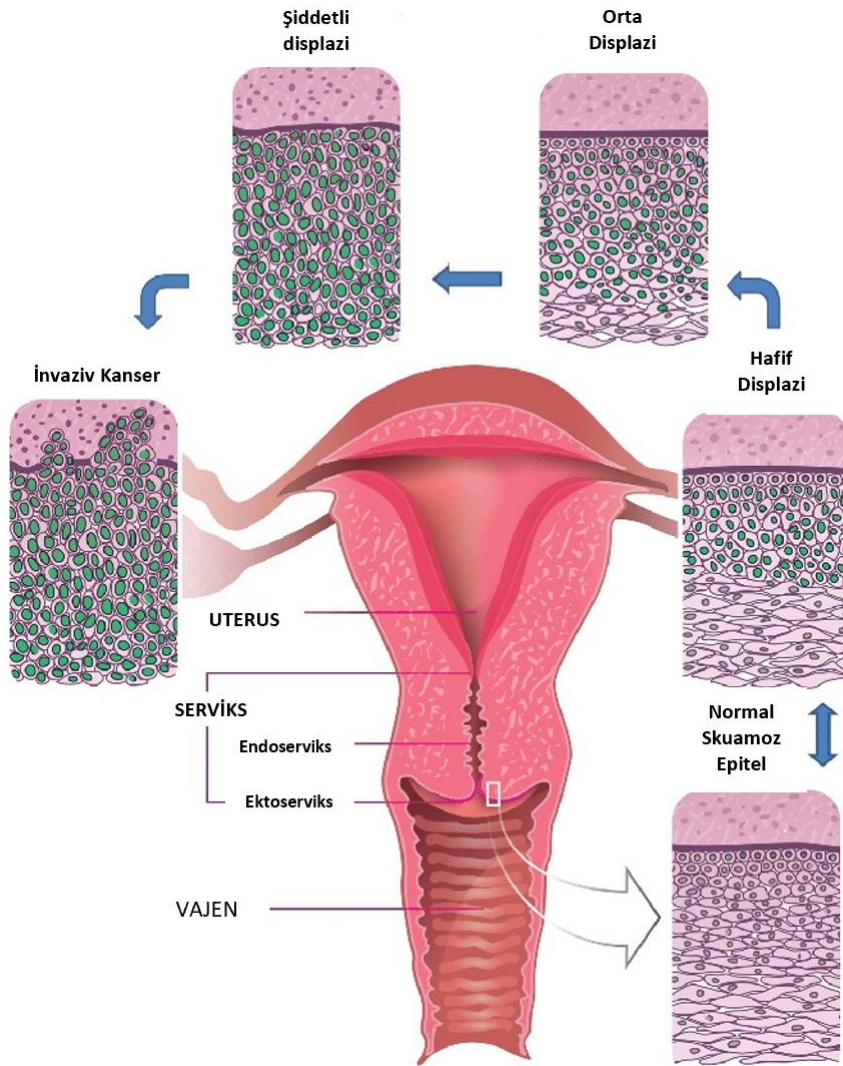
2.3 SERVİKSİN PREMALİGN LEZYONLARI-CIN

Servikal kanser gelişimi öncesi epitel hücrelerinde basal membranla sınırlı değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler prekürsör lezyonlardır. İntraepitelyal lezyonlar ilk kez 1888 yılında tanımlanmıştır (86). 1900'lü yılların başlarında intraepitelyal displazi kavramı kullanılmıştır (87). Başlarda basal membranı aşmamış lezyonlara "karsinoma in situ" denilirken sonraları displazi kavramı getirilerek hafif, orta, şiddetli olarak ayrılmıştır (88). Karsinoma in situ'nun daha yüksek derecede anormalliğe sahip olduğu ve kanser öncesi son aşama olduğu kabul edilir (89, 90).

Daha önceki bölümlerde belirtilen SCJ, HPV enfeksiyonuna oldukça duyarlıdır (91). Serviksten gelişen neoplaziler başta skuamöz hücreli karsinom olmak üzere adenokarsinom, nöroendokrin, seröz papiller, clear cell gibi değişik histopatolojik alt tiplerdir (1). HPV DNA serviks karsinomlarının büyük çoğunluğunda tespit edilmektedir. Enfeksiyonun temel hedefi epitelin en alt tabakasında bulunan bazal hücrelerdir. Virüsün bu hücelere ulaşabilmesi için ergenlik sonrası vajenin asidik ortamına maruz kalan kolumnar hücrelerin metaplazik dönüşümü veya cinsel ilişki sırasındaki gibi epitel hasarı gereklidir. Bazal hücelere erişim TZ'da daha kolaydır ancak bazı HPV tipleri kıl folikülleri ve ekrin bezlerden de giriş yapabilmektedir (2). Ancak yine de TZ'unun HR-HPV kaynaklı neoplazilere karşı neden bu kadar hassas olduğu net olarak belirlenebilmiş değildir (92). Aynı şekilde bazı kadınlarda enfeksiyonlar bağışıklık sistemi ile temizlenebiliyorken bazılarında persiste olmaya ve

malignleşme eğiliminde olmasına sebep olan faktörlerle ilgili bazı risk faktörleri belirlenmiş olsa da kesin değildir (93).

Serviksin skuamoz hücreli kanseri ektoserviksten köken alır ve bu kanserin preinvaziv lezyonuna servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) denir. Adenokarsinoma in situ (AIS) ise endoservikal kanalı örten glandüler epitelden köken alan serviksin adenokarsinomunun preinvaziv lezyonu olarak kabul edilmektedir (3). CIN derecelendirmesi epitelin basal membranından yüzeye doğru tutulum derecesine göre adlandırılır (Şekil 10).



Şekil 10. Serviksteki lezyonlar

CIN 1; epitelin alt 1/3'teki atipik hücreleri içeren lezyondur ve düşük dereceli lezyon (LSIL) olarak tanımlanır. HPV enfeksiyonunun göstergesi olan koilositik atipi sıklıkla görülür.

CIN 2; epitelin basal tabakadan itibaren 2/3'ünü kaplayan orta derece atipik hücresel değişiklikleridir. Yüksek dereceli bir lezyondur. CIN 2 tanımı ile ilgili 2012'de yayımlanan bir terminolojide, CIN 2 tespit edilen histolojik örnekler p16 ile immun boyanma yapılması, eğer p16 negatif ise LSIL olarak p16 pozitif ise HSIL olarak adlandırılması önerilmiştir (94).

CIN 3; Epitelin tamamını veya 2/3'ten fazlasını kapsayan ciddi atipik hücresel değişiklikler olan lezyondur. Önceki terminolojide şiddetli displazi veya karsinoma in situ olarak adlandırılmakta idi. CIN 2 ve CIN 3 beraber yüksek dereceli lezyon olarak kabul edilirler (95).

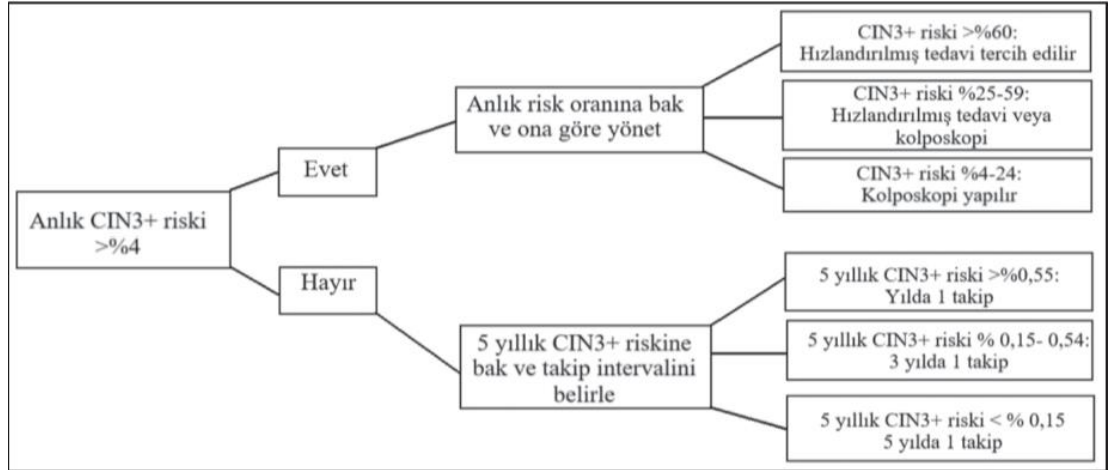
CIN 1 lezyonlar regrese olma eğiliminde iken CIN 2 ve 3 lezyonların derecesine göre invaziv kansere ilerleme riski mevcuttur. Bu nedenle servikal kanseri erken dönemde hatta karsinoma ilerlemeden tespit etmek ve gerekliyse tedavi etmek önemlidir. Bu amaçla serviks kanseri tarama programı uluslararası ve ulusal tarama programları içinde yer almaktadır.

2.3.1 Tarama Programları

Nisan 2020 yılında yayınlanan ASCCP (Amerikan kolposkopi ve servikal patoloji derneği) kılavuzuna göre taramanın esas amacı prekanseröz lezyonları yakalayıp tedavi ederek invaziv kanserin önüne geçmektir. Bu kılavuzun öncekilerden farkı test sonuçlarına göre değil risk bazlı yönetime geçilmiş olmasıdır. HPV bazlı testler risk hesaplamasının temelini oluştururlar. Bu yeni kılavuza göre taramaya başlama yaşı 25'tir. 25 yaşından itibaren 5 yılda bir HPV ile primer tarama önerilir. Benign nedenle histerektomi yapılmış olan hastalar taranmaz. Son 10 yıl içinde 3 ardışık sitoloji sonucu negatif veya 2 HPV DNA sonucu negatif veya 2 kotest sonucu negatif olmak üzere en sonuncusu son 5 yıl içinde yapılmış olan ve anormal sonucu olmayan, son 25 yılda CIN2 ve daha ileri lezyon öyküsü olmayan olgularda tarama sonlandırılabilir (96).

2.3.2 CIN Yönetimi

CIN'lı hastaların yönetiminde amaç, gerileme ihtimali olan lezyonların aşırı tedavisini önlemek ve aynı zamanda invaziv kansere ilerleme riski olan lezyonları da atlamadan tedavi etmektir (97). Tarama sonuçlarına göre belirlenen anlık ve 5 yıllık CIN3+ lezyon gelişme riskine göre algoritma belirlenmiştir (96).



Şekil 11. Risk durumuna göre CIN lezyonlarının yönetimi (96)

2.3.3 Doğal Seyir

CIN 1 lezyonlar HPV enfeksiyonu ile ilişkili olup çoğunlukla gerileme eğilimindedir. 6 ayda yaklaşık yarısı geriler, bir yılın sonunda ise yaklaşık yüzde 70'i regrese olur. Bir yılın sonunda sadece yüzde 4 hastada ileri lezyon görülmüştür (98). 10 yıllık takipten sonra hafif displazi gösteren lezyonların %87,8'inin tamamen gerilediği, %2,8'inin CIN 3'e ve %0,4'ünün invaziv kansere ilerlediği gösterilmiştir (81).

CIN 2 olan hastalarda takipte yaklaşık %50'sinde lezyon geriler, %31'sinde devam eder ve %18'i CIN3+ lezyona progrese olur (99).

CIN 3 lezyonu olan hastalarda %32-47 'sinde gerileme ve %12-40'ında invaziv kanser gelişimi bildirilmiştir. HSIL lezyonlar çoğunlukla tedavi edilmiş olması nedeniyle doğal seyirleri hakkındaki bilgilerle alakalı veriler azdır. Tedavi edilmeyen

hastalarda ilerleme oranı 10 yılda %20 ve 30 yılda %31'dir. İnvaziv kansere ilerleme oranının yüksek olması nedeniyle takibi önerilmez, tedavi edilmelidir. CIN 3 lezyonların CIN 2 lezyonlardan daha yüksek oranda progrese olmasının sebebi daha çok HPV 16 ve 18'le gelişmesi nedeniyle olabileceği düşünülmektedir (100).

AIS (Adenokarsinom in situ): tedavi edilmezse 5-14 yıl içinde invaziv adenokarsinom görülür. Bununla beraber yaklaşık yarısında eşlik eden skuamoz lezyon mevcuttur. Tedavi edildiğinde bile negatif sınırlar olmasına rağmen %12,5 hastada persiste eden hastalık bulunmuştur. Bu nedenle hastalar düzenli kontrollere çağırılmalıdır. Tedavi sonrası pozitif cerrahi sınır bulunan hastalarda rezidü hastalık oranı %46, invaziv adenokanser oranı %16,7'dir (101).

2.4 miRNA

MicroRNA'lar (miRNA) gen ekspresyonunu posttranskripsiyonel yolda düzenleyen regülatuar proteinlerdir (102) ve endojen küçük ve kodlanmayan bir RNA sınıfıdır (103).

İlk olarak *Caenorhabditis elegans* adı verilen bir yuvarlak solucan türünde tespit edilmiş olup, mRNA seviyelerini düşürüp translasyonu baskıladığı belirlenmiştir. Sonrasında memelilerde de benzer etkileri olduğu gösterilmiştir (104). İnsanda da yaklaşık 2000 adet miRNA tanımlanmıştır.

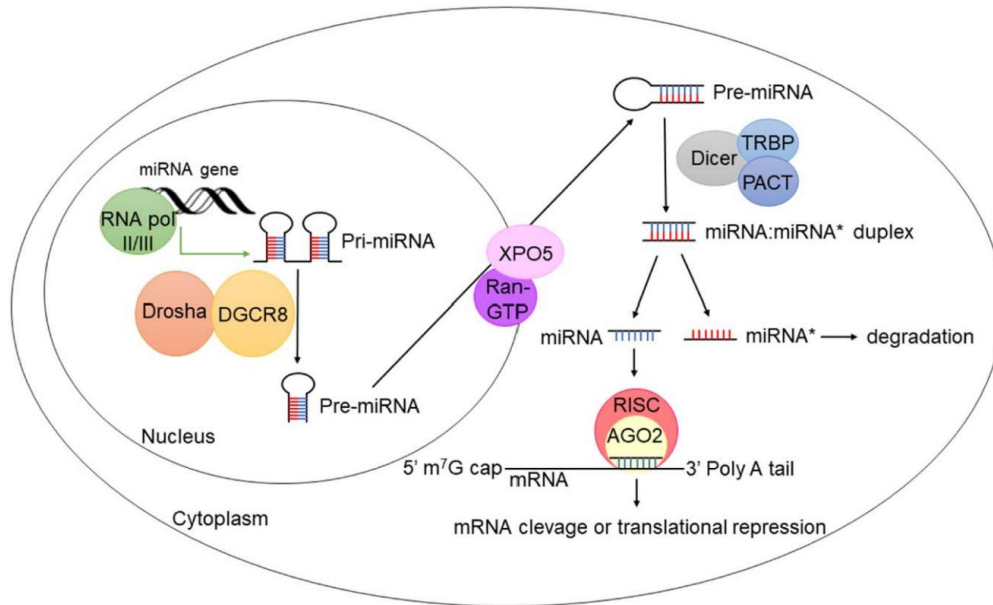
Protein kodlayan genlerde hedef mRNA'ların 3'UTR bölgesine bağlanarak posttranskripsiyonel aşamada düzenlenmesini sağlarlar. Bu düzenlemede translasyon inhibisyonu veya mRNA degradasyonunu gerçekleştirerek rol alırlar (105).

miRNA sentezi kanonik, nonkanonik drocha bağımsız ve dicer bağımsız olarak 3 farklı şekilde gerçekleşebilir (106). miRNA biyosentezi hücrenin nükleusunda başlar. RNA polimeraz II/III tarafından üretilen gen transkriptlerinin nükleusta post veya ko-transkripsiyonel işlenmesiyle miRNA öncülü olan pri-miRNA'lar üretilir (107). Sonrasında RNase III enzimi olan Drosha ve RNA bağlayıcı protein olan DGCR8 (Digeorge syndrome critical region gene 8) ile pre-miRNA'lara dönüşür. Bunlar 70-110 nükleotitten oluşan miRNA hair prekürsörleridir (105). Bu süreç kanonik yoldan miRNA sentezi olarak adlandırılır (Şekil 12).

Şu anki bilgilerimize göre, miRNA'ların yaklaşık yarısı gen içerisinde (intragenik) bulunmakta olup, bu miRNA'lar çoğunlukla genlerin intronlarından ve az miktarda da ekzonlarından üretilir. Diğer miRNA'lar ise genlerle ilişkili olmayıp kendi promotörleri tarafından düzenlenerek bağımsız şekilde transkribe edilirler (108).

Kanonik yolda Pre-miRNA'lar Exportin-5 (XPO5)/RanGTP adı verilen nükleer transport kompleksi ile sitoplazmaya taşınırlar. Bu kompleks GTP bağımlı bir mekanizma olup pre-miRNA'nın 3' ucunda bulunan baz çiftini tanıyarak işlem yapar (109).

Hücre çekirdeğinden dışarı çıktıktan sonra RNase III Dicer ve kofaktörleri TRBP (Tar RNA-binding protein) ve PACT (protein kinase R-activating protein) ile yaklaşık 22 nükleotidden oluşan olgun miRNA'lar haline getirilirler. Son olarak RISC (RNA induced silencing complex) üzerine yüklenerek miRISC kompleksini oluşturur. Bu kompleks hedef mRNA'yı tanımlamaya yardımcı olur ve mRNA üzerinde 3' çevrimsiz bölgesinde (3'UTR) yer alan (2-8 nt olarak adlandırılan başlatıcı dizi) başlatıcı dizisine miRNA 5'ucundan bağlanır. Bunun sonucunda hedef mRNA'nın degradasyonu, deadenilasyonu veya translasyonun baskılanması gerçekleşir (102, 110).



Şekil 12. miRNA kanonik sentezi (111)

Kanonik olmayan yolda miRNA'lar Drosha veya Dicer bağımsız olarak işlenir. Dicer bağımsız yolda shRNA (small hair pin RNA), mikroşlemci kompleksi tarafından pre-miRNA oluşturmak için işlenir ve XPO5/RanGTP kompleksi ile sitoplazmaya taşınır. Sonrasında pre-miRNA, Dicer bağımsız ancak AGO2 bağımlı şekilde sitoplazmada olgun miRNA'ya dönüştürülür (106, 112). Diğer Dicer bağımlı yolda ise sitoplazmada Dicer ile işlenir. Sonuçta her iki süreç de işlevsel bir miRISC kompleksinin üretilmesi ile sonuçlanır (113).

Böylece miRNA'lar birçok transkripsiyon faktörüne etki ederek ve ekspresyonlarını değiştirerek hücrel gelişim, farklılaşma, çoğalma, apoptoz ve metabolizmada önemli rol üstlenirler (103).

miRNA'lar aracılığıyla sağlanan düzenleme miRNA'lar ve hedefleri arasında kurulan karmaşık bir sistemle gerçekleşir. Tek bir miRNA yüzlerce farklı mRNA hedeflerini düzenleyebilir ve dolayısıyla birçok ilişkili gen ailesi üzerinde farklı etkilere neden olabilir. Bu etkiler biyolojik süreçlerde rol oynayan çeşitli proteinlerin ekspresyonunu etkiler. Ancak yine de birçok miRNA tek bir hedef mRNA'nın ifadesini muhtemelen sinerjistik etki ederek düzenler (102, 114).

Bazı çalışmalarda endojen miRNA'ların kan, idrar, tükürük, BOS gibi biyolojik sıvılarda bulunduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar gelecekte biyobelirteçler olarak kullanılabileceği konusundaki hipotezleri doğrulamaktadır (115).

miRNA'ların işlevi gen ifadesini posttranskripsiyonel mekanizmalar ile negatif olarak düzenlemektir (116). miRNA'nın 5' ucu (seed site), RISC kompleksinin stabilitesi ve hedef mRNA'ya bağlanma için önemlidir. Çünkü miRNA'lar hedef mRNA'ların genellikle 3'- okunmayan ucundan tanır. Ancak son zamanlarda miRNA'ların ORF veya 5'-UTR'ye bağlanabileceği de gösterilmiştir (117). Bir miRNA hedefi mRNA'ya mükemmel olmayan şekilde bağlandığında translasyonel baskılanma başlar. Tam tersine bir miRNA hedefi mRNA'ya mükemmel olarak bağlandığında ise mRNA'nın bölünmesine neden olur (116). miRNA ekspresyonundaki düzensizlikler; kromozomal anormallik, mutasyon, tek nükleotid polimorfizmi, epigenetik değişiklik, miRNA biyosentez kusuru ve transkripsiyon faktörlerindeki değişiklik gibi sonuçlara neden olabilir (118). İnsanlarda neoplazilere

neden olan onkojenik virüsler de hücrel miRNA ifadesini düzenleyerek konak hücrelerde viral enfeksiyonu ve replikasyonu kolaylaştırarak etki ederler.

miRNA'lar farklı biyolojik süreçlerde görev almaktadır. Bunlar arasında proliferasyon, diferansiyasyon, inflamasyon, apoptoz, hücre döngüsü ve immün yanıt sayılabilir (119, 120). Geniş bir fonksiyon aralığı olmasının sonucu olarak geniş hastalık yelpazesinde patofizyolojik olarak etki etmektedir; kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar, otoimmün hastalıklar, kanser gibir (12, 121, 122).

miRNA'ların terapide kullanılma çalışmaları bu mekanizmalar üzerinden kurulmuştur. Aynı anda farklı onkohedefleri düzenlemek için kullanılabilirler. Bir çalışmada miR-17-5p'nin serviks kanseri hücrelerinde p53-indükleyici protein-1 (TP53INP1)'i hedefleyerek yüksek düzeyde p53'ün posttranskripsiyonel aktivitesini düzenlediği bulunmuştur (123).

Kanser gelişiminde miRNA disregülasyonunun düzensiz rol oynadığı bilinmektedir. Prolifaryasyon, apoptoz direnci, invazyon ve metastaz indüksiyonu, artmış anjiogenez ve büyüme faktörünü inhibe eden sinyallerden kaçış gibi karsinom oluşturma mekanizmalarında etkilidir (12).

Birçok tümör türünde miRNA'lar tümör supresor (tsmiR) veya proto-onkogen (oncomiR) olarak işlev görür. OncomiR'ler tümör ilerlemesini teşvik eden ve tümör genel özelliklerini sürdürmesine sağlayacak şekilde işlev görürler. tsmiR'ler ise hücre proliferasyonunu baskılayarak tümör oluşumunu engeller, invazyonu kontrol altına alır, apoptozu indükler ve kanser gelişimi ile ilgili diğer süreçleri düzenler. tsmiR'lerin çoğu kanserlerde down regüle olduğu bildirilmiştir (124).

Kanser gelişen hastalarda miRNA profili tanı, progrostik süreçler, teröpotik hedefler gibi uygulamalarda kullanım sağlayabilecek gibi görünmektedir. Ancak tanı veya tedavide kullanılabilmesi için onkojenik veya tümör supresor rollerinin anlaşılması ve fonksiyon kaybının veya artışının tümör ilerlemesini nasıl etkilediğinin bilinmesi gerekmektedir. OncomiR'ler baskılama ve düzenleme ile tsmiR'ler ise aşırı ekspresyon ile tedavide anlamlı rol oynayabilirler (14).

OncomiR aktivitesinin gösterildiği miRNA'lara örnek olarak miR-18a verilebilir. miR-18a onkojenik transformasyon gösteren HPV pozitif serviks hücrelerinde gösterilmiştir. Bir çalışmada miR-18a'nın HPV E6 ve E7 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu artış hücrede daha yüksek proliferasyon, migrasyon, invazyon yeteneğine ve tümör supresör görevi gören STK4 mRNA yolağının inhibisyonuna neden olur (125).

Servikal kanserde tümör supresör görevi incelenen mikroRNA'lardan biri miR-125'dir. miR-125 serviks kanseri hücrelerinde VEGF'yi hedefleyerek progresyonu ve böylece migrasyonu ve invazyonu baskılar (126). *İn vivo* çalışmalarda miR-125b'nin aşırı ekspresyonunun farelerde HeLa hücrelerinde tümör oluşturma yeteneğini azalttığını göstermiştir (127). Başka bir çalışmada ise miR-125a'nın aşırı ekspresyonunun farelerde STAT3'e bağlanarak tümör büyümesini inhibe ettiği, metastatik formasyonu bozarak metastazı engelleyebildiği kanıtlandı. Ayrıca HPV'nin viral onkoproteinleri olan E6 ve E7'nin miR-125a'nın p53 aracılı aktivasyonunu baskıladığı ve böylece düşük seviyelerde ekspresyonuna sebep olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma serviks kanserinde HPV enfeksiyonunun persistansının tedavinin etkisiz olmasına veya tedavi sonrası nükse neden olabileceğini düşündürmektedir (50, 128).

Benzer şekilde miR-375'in aşırı ekspresyonunun HPV 16 ve 18 pozitif servikal karsinom hücrelerinde E6 ve E7 etkinliğini doğrudan düşürebildiğini ve p53 ve pRB sinyal yollarını koruduğu gösterilmiştir. Servikal kanserde hasarlı hücre bölünmesi durumunda apoptotik mekanizmaları aktive eder (129). Ayrıca telomeraz aktivitesini azaltarak hücre siklusunun durdurduğu ve tümör hücre proliferasyonunu engellediği görüldü. Bu veriler miR-375'in serviks kanseri tedavisinde kullanılacak gelecek tedavilerden olabileceğini göstermektedir (130).

Bazı miRNA'lar hem oncomiR hem tsmiR özelliği gösterirler. miR-9-5p HPV 16+ SCC'de CaSki ve SiHa hücre serilerinde upregüle olduğu görülmüştür. SCC'de miR-9-5p TWIST1 ve CDH1'in downregülasyonuna ve epitelyal mezenkimal transformasyona neden olarak onkojenik bir rol oynar. Ancak miR-9-5p ekspresyonu HPV18+ servikal adenokarsinom HeLa hücrelerinde düşük olarak bulunmuştur. Bu

durum TWIST yolağının represe olmadığı ve böylece CDH2 aktivasyonu ile servikal adenokanser dönüşümüne neden olması ile açıklanmaya çalışılmıştır (131).

2.4.1 Hpv İlişkili Servikal Kanser Gelişimi Progresyonu ve Metastazında Mirna'nın Rollerini

2.4.1.1 HPV ve miRNA

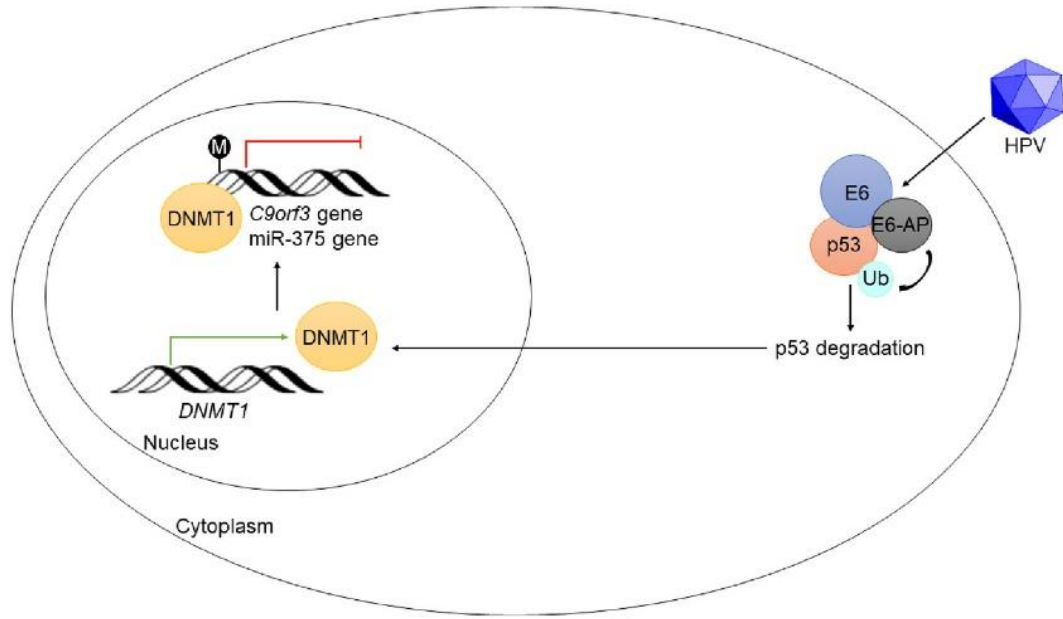
HPV enfeksiyonu ile miRNA ekspresyonunda değişkenlikler meydana gelmektedir. Aynı şekilde persiste eden HPV enfeksiyonu da anormal miRNA ekspresyonuna neden olarak servikal kanser dönüşümünü indükleyebilir (132, 133). HPV onkoproteinleri konak hücrelerde tümör süpresör miRNA'ların ekspresyonunu azaltabilir. Bazı miRNA'lar neoplazi sürecinin her aşamasından etkili olurken bazıları sadece örneğin CIN2/3'ten invaziv karsinoma geçişte etkilidir (134). Bu durum miRNA'ların prognoz veya tedavi seçeneklerinde kullanılabilmesini mümkün kılmaktadır.

HPV'nin E6 ve E7 onkoproteinleri miRNA ekspresyonunu modüle etmede etkilidir (111). P53; miR-34a, miR-145, miR-23b'nin transkripsiyon faktörüdür. E6, p53'ü parçalayarak bu miRNA'ların ifadesini düzenler (135, 136).

miR-34a; serviks kanserinde ve servikal intraepitelyal neoplazilerde HPV16 ve 18 tarafından downregüle edildiği gösterilmiştir (135). miR34a'nın downregülasyonu p18Ink4c'de upregülasyona neden olmuştur. P18Ink4c; INK4c ailesi olan siklin bağımlı bir kinaz inhibitörlerindendir. CDK4 ve CDK6'yı inhibe eder (137). Siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinde upregülasyon normal hücrelerde hücre büyümesini ve neoplazi gelişimini durdurur. Ancak bu hücrelerde kanser gelişimini önlememiştir. Bunun sebebi olarak p18Ink4c'nin aktivitesi normal pRb ifadesi sonucu işlevsel bir G1 kontrol noktasına sahip hücrelerde gerçekleşir (137). E7 pRB'ye bağlanarak işlevsiz hale getirmesi nedeniyle p18Ink4c upregüle olmasına rağmen işlevini yerine getiremez (138).

Benzer şekilde miR-375 serviks kanserinde downregüle olduğu gösterilen miRNA'lardandır. HPV 16 DNMT-1 (DNA metil transferaz-1)'in ifadesini artırarak miR-375 promoterinin hipermetilasyonuna ve miR-375'in de ekspresyon kaybına

neden olur. Ayrıca miR-375'in over ekspresyonu onkojenik ve non-coding bir gen olan RNA MALAT1'in ifadesini azaltır, E-cadherin ifadesini artırır. MALAT1 seviyesinin artması miR375 seviyesinin azalmasına neden olur (139). miR-375'in E6 ve E7 transkripsiyon ürünlerini hedeflediği gösterilmiştir. Bir DNMTs inhibitörü ile tedavi edilen HPV pozitif hücrelerde mir-375 ekspresyonu tekrar aktifleşerek E6 ve E7 seviyelerini azaltmıştır. Sonuç olarak hücre proliferasyonu ve koloni oluşumu engellenmiştir (140).



Şekil 13. DNMT ve p53 ilişkisi (111)

Virüsler hücrede gen ifadesini düzenlerken miRNA aracılığıyla etkisini gösterir. HPV ilişkili kanserlerde miRNA işleme proteinleri olan Drosha, DGCR8, Dicer ve AGO2 ifadelerinin düzensiz olduğu bulunmuştur. Viral onkoproteinler E6 ve E7, Drosha, DGCR8 ve Dicer'in düzenlenmesinde etkilidirler (141).

Daha önce de belirtildiği gibi Drosha; miRNA biyosentezinde görevli bir ribonükleaz enzimidir. Kromozom 5p'de bulunur. 5p kazanımı olan servikal kanserlerin tümünde Drosha ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (142). HPV 16 viral onkoproteinleri olan E6 ve E7 ekspresyonu Drosha'nın overekspresyonuna neden olur. Kromozom 5p'de olan değişiklikler ve E6 ve E7 ekspresyonu serviks kanserinde Drosha'nın ekspresyonunda artışa neden oluyor gibi görünmektedir (143).

Drosha'daki ekspresyon değişimi kanserle ilişkili miRNA profillerinde değişime ve neoplazik yönelime neden olmaktadır. Bütün bunlar Drosha'nın serviks kanserinde onkojenik bir rolü olduğunu göstermektedir (144). Benzer şekilde DGCR8 de serviks kanserinde ekspresyon artışına uğrar. E7'nin bu ekspresyon artışında rolü olduğu gösterilmiştir. DGCR8 seviyesinin artması kanserle ilişkili miR-27b'nin ekspresyon artışına neden olarak proliferasyonun indüklenmesine, apoptozun baskılanmasına neden olmaktadır. HPV ilişkili neoplazi sürecinin gelişmesini sağlayan etkilerinden birisi olarak düşünölmektedir (145).

HPV16 ile enfekte olan kadınların intraepitelyal lezyonlarının şiddeti ile miRNA'ların ekspresyonu ile karşılaştıran bir çalışma miR-21, miR-34a ve miR-143'ün HPV negatif gruba göre ekspresyonlarının arttığı göstermiştir. HSIL hastalarında miR-16 ve miR-34a ekspresyonlarında HPV negatif kontrol grubuna göre değişiklik izlenmemiş ancak miR-21 önemli ölçüde artmış ve miR-143 önemli ölçüde azalmış olarak bulunmuştur (146). Yine aynı çalışmada HPV 16 ile enfekte olan LSIL hastalarında miR16, miR-21, miR-34a, miR-143 HPV negatif olan gruba göre belirgin artmış olarak bulunmuştur. HSIL hastalarında miR-34a ekspresyonunda farklılık izlenmemiştir (146).

miR-18a'nın HPV enfeksiyonu ile ilişkisini tanımlayan bir çalışma HPV18+ HeLa ve HPV16+ CaSki hücrelerinde E6 ve E7 onkoproteinlerinin rolü değerlendirmiş, E6/E7 susturulması sonrasında miR-18a'nın upregüle olduğu görölmüştür. miR18a, STK4-3'-UTR'yi hedef alarak tümör proliferasyonunu baskılayan bir tümör süpresor gen olarak işlev yapmaktadır (125).

Viral miRNA'ların da HPV enfeksiyonundan servikal kanser gelişimine giden süreçte önemli rol oynayabileceği öngörülmektedir ancak viral miRNA işlevleri konusu tartışmalıdır.

2.4.1.2 Servikal Kanserde miRNA Disregölasyonu

miRNA ekspresyonu karmaşık ve çok sayıda sistem tarafından hassas bir şekilde düzenlenen bir süreçtir. miRNA disregölasyonu ve buna bağlı olarak gelişen ekspresyon değişikliklerinin hedef genlerin işlevini etkilediği için servikal kanser mekanizmasında miRNA'lar oldukça etkin bir rol oynamaktadır. miRNA

biyogenezindeki proteinlerde, biyogenez düzenleyici proteinlerde, promotör bölgelerinde, miRNA sekanslarında veya hedef bölgelerde meydana gelen değişiklikler miRNA'larda işlev bozukluğuna, özgüllük kaybına, hatta baskılanmasına yol açabilir (147). Son yıllarda gerçekleştirilen kapsamlı araştırmalar, miRNA düzensizliklerine neden olan mekanizmalardan bazılarını ve serviks kanserindeki ekspresyon paternini açığa çıkarmıştır. Kanıtlar, miRNA ekspresyon değişikliklerinin genomik lokuslardaki varyasyonlardan kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bu ekspresyon değişikliklerinden bazıları gen delesyonu, amplifikasyonu veya mutasyonudur. Örneğin ileri evre SCC hücrelerinde yaklaşık 45 adet miRNA'nın disregüle olduğu ve buna bağlı olarak Drosha (RNAaz III) 'nın ekspresyonunda ve kromozom 5p'de artış olduğu belirlenmiştir. Ek olarak Drosha'yı overeksprese eden hücrelerin çoğunluğunda miRNA'ların upregüle olduğu, sadece 5 tane miRNA'nın down regüle olduğu görülmüştür (144). Bu bulgular neoplaziye neden olan genetik değişikliklerin servikal kanser gelişimi ve ilerlemesinin miRNA regülasyonu aracılığıyla rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Transkripsiyon aktivatör ve inhibitörlerindeki değişim miRNA gen lokuslarındaki anormal DNA metilasyon modifikasyonuna, dolayısıyla kanserde anormal bir miRNA ekspresyon profilinin oluşmasına neden olur (148). Ayrıca, miRNA biyolojik yapısında yer alan proteinlerin düzensizliği servikal karsinom oluşumundaki miRNA ekspresyon değişikliklerine katkıda bulunur (124).

Single nükleotid polimorfizmaları (SNP'ler) serviks kanserinde miRNA ekspresyonunu düzenleyen başka bir mekanizmadır. Bu molekül miRNA ikincil prekürsör halindeyken Drosha ve Dicer'a müdahale ederek olgun miRNA oluşma sürecine etki eder (149). Böylece bu SNP'ler miRNA'ların içinde bulunur ve hedef genlere bağlanmasını etkileyerek kanser gelişimine yakından katkı sağlar. Bir çalışmada miR-21'in içerisinde bulunan rs1292037'in CIN veya servikal kanser gelişimine çok yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir (150). Başka bir çalışmada ise miR-18a'nın da içinde bulunduğu miR-17-92 kümesindeki SNP'lerin promoter bölgeye etkisi incelenmiş ve servikal SCC gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (151).

Epigenetik; DNA diziliminde değişiklik olmadan gen ekspresyonunu etkileyen ve kalıtsal olan DNA ve kromatin yapıdaki değişikliklerdir. DNA metilasyonu ise; sitozin halkalarının 5' pozisyonunda meydana gelen replikasyon sonrası bir DNA modifikasyonudur (152). DNA metilasyonu servikal kanserle de yakından ilişkilidir. Karsinom gelişimi sürecinde hücrelerde tümör süpresör genlerde metilasyon artışı ve protoonkogenlerde hipometilasyon gibi durumlar gözlemlenebilmektedir. Bu metilasyon değişiklikleri ile proliferasyon ve invazyon süreçleri tetiklenir. DNA metilasyonu dışında histon modifikasyonları da görülür. Histon proteinleri DNA'yı saran proteinlerdir ve modifikasyonları genom erişimini düzenler. Servikal kanser hücrelerinde de tümör süpresör genlerin erişimini kısıtlayan histon modifikasyonları meydana gelebilir. Bu değişikliklerin hepsi epigenetik değişiklikler olarak adlandırılır (153). DNA metiltransferaz (DNMT) enzimi DNA metilasyonunu ve epigenetik farklılığın devamlılığını sağlayan tersinir reaksiyon gösteren bir enzimdir. Serviks kanserinde DNMT enzim aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Kodlanmayan genler olan miRNA'lar da metilasyon ile düzenlenebilmektedir (154). İn vitro olarak HPV 16 metillenmiş genomların hücrelere verilmesi ile DNA'da postranskripsiyonel baskılanma olduğu gösterilmiştir. Serviks kanserinde de p53, UTF1, PAX1, TWIST1 gibi metilasyonla düzenlenen çok sayıda transkripsiyon faktörü mevcuttur (155). Hücre genomunun CpG adalarındaki promotör bölgelerindeki hipermetilasyon, tsmiRNA'ların etkisiz hale gelmesine neden olarak neoplazi sürecine katkıda bulunur. HR-HPV genomları servikal hücrelerde bu mekanizmalarla metilasyon yaparak da karsinogenezde rol oynamaktadır (156). Bazı teorilere göre HR-HPV miRNA promotörlerinin metilasyon desenini değiştirebilir (157). Promotör bölgelere bağlanan histonlar transkripsiyon sonrası modifikasyon yoluyla gen ekspresyonunu düzenler ve bu yolla transkripsiyon faktörlerinin ve bazal transkripsiyon mekanizmasının erişilebilirliğini kontrol ederler. Bu modifikasyonlar arasında fosforilasyon, asetilasyon, sumolasyon metilasyon ve ubikutinasyon sayılabilir. Kromatin yapısını değiştirerek gen ifadesinin anlatımını regüle edilmesini sağlar. Çok sayıda histon modifiye edici enzim bulunur. Bunlar tümör süpresör genlerin, onkogenlerin ve büyüme faktörlerinin ekspresyonunu düzenler. Gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesinde histon modifiye edici ajanların mutasyonu ve disregülasyonu etkilidir (158).

Hücre siklusunda PI3K/AKT sinyal yolları, neoplastik hücrelerin göçünde etkilidir ve karsinom oluşumunda itici güç olarak kabul edilir. Hedgehog, p38/MAPK, wnt/B-katenin ve p53 gibi birçok faktör de bu yolda işlev görmektedir. MirRNA'lar protoonkogen ve tümör supresör gen olarak etki göstermeleri nedeniyle hücre siklusunda görev alan proteinlerin ekspresyonlarını azalatarak veya arttırarak serviks kanseri gelişiminde ve progresyonunda aktif rol alırlar (159).

Kontrol ettiği yollardan birisi de EGFR sinyal yolağıdır. miR-875-5p, EGFR'yi baskılayarak servikal karsinom hücrelerinde tümöral gelişimi ve metastazı azaltır (160). Ancak miR-155 ise aşırı eksprese olduğunda EGFR'nin başlattığı EMT'yi engelleyerek serviks kanserinde invazyon ve migrasyonu azaltır (161). Bazı miRNA'lar ise JAK/STAT yollarını etkileyerek tümöral gelişimi engeller veya arttırır

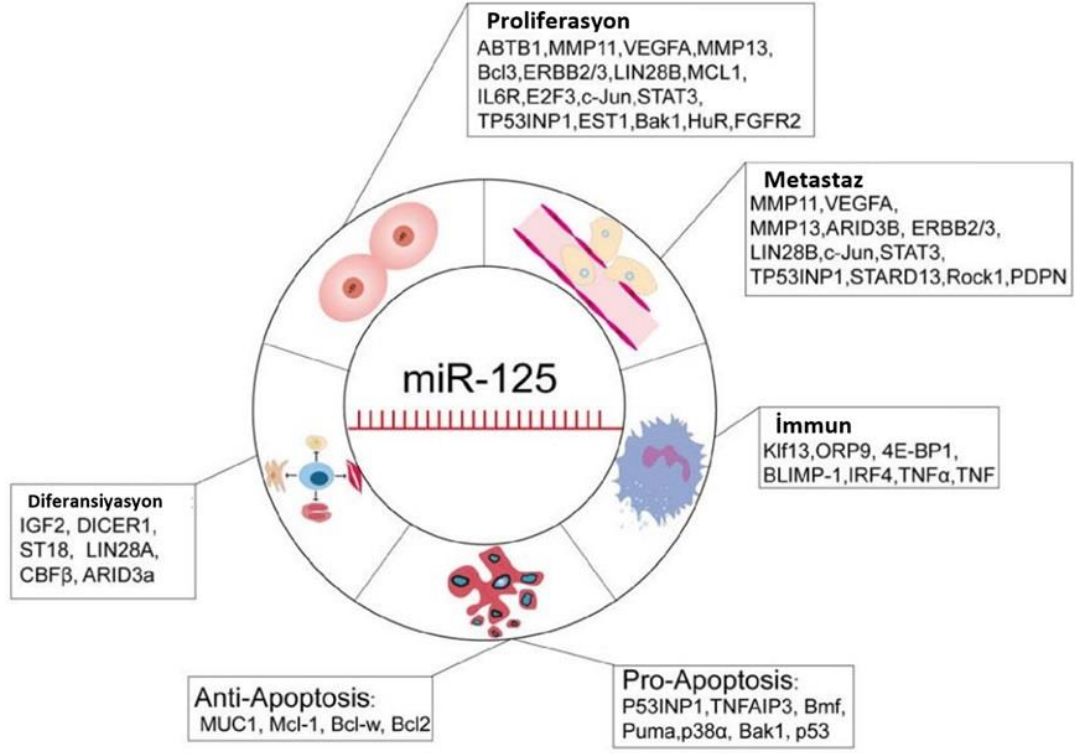
2.4.2 Çalışma Kapsamındaki miRNA'lar

2.4.2.1 miR-125b-5p

miR-125 ailesi farklı kromozomlarda bulunan üç homologtan oluşur: hsa-miR-125a, hsa-miR-125b-1, hsa-miR-125b-2. miR-125b-1 ve miR-125b-2'nin ortak matür miRNA'sı miR-125b-5p'dir. Genom içinde farklı konumlara sahip olmalarına rağmen ilk transkriptleri ortaktır. Aynı zamanda miR-99/miR-100 ve let-7 ailesini içermektedir. miR-125 ailesi içerisindeki üç miRNA'nın farklı ekspresyon şekillerine ve işlevlere sahip olduğu düşünülmektedir (162).

miR-125b; 11q24.1 bölgesinde kodlanmaktadır (163). miR-125b'nin hem protoonkogen hem de tümör supresör gen olarak etki ettiği düşünülmektedir (164, 165). miR-125b-5p; PABPC1 (poly A binding protein cytoplasmic 1), PERP (p53 apoptozis Effector Related to PMP22 (peripheral myelin protein22)) ve PIGR (Polimerik İmmunoglobulin Reseptörü)'yi düzenler (166). CAR10 (karbonik anhidraz 10) ve PDPK1'i (Phosphoinositide-dependent Kinase-1) hedef alır. PDPK1 üzerinde inhibitör olarak etki etmektedir ancak karsinomda bu etki tersine döner. Servikal kanser hücrelerinde miR-125b-5p'nin overekspresyonu ile tümör hücrelerinde proliferasyon ve invazyonun tetiklendiği görülmüştür (167). miR-125b-5p'nin serviks kanseri tedavisine tam yanıt veren hastalarda upregüle olduğu görülmüştür (163).

Apoptozla ilişkili Bcl-2 ailesi miR-125'in düzenlediği antiapoptotik mekanizmalardandır (Şekil 14) (168).



Şekil 14. miR-125 ailesi

miR-125'nin upregülasyonu over kanseri hücrelerinde BAK1'İ baskılayarak sisplatin direncine neden olmaktadır (169). Ancak dirençli serviks tümörlerinde azalmış olarak bulunmuştur (163). HPV ile enfekte olan ancak neoplazi gelişmemiş serviks dokusunda miR125b ekspresyonunun arttığı, lezyon progresyonu geliştikçe göreceli olarak azaldığı gösterilmiştir (138).

2.4.2.2. miR-125a

miR-125a 19q13.41 bölgesinde kodlanmaktadır (163). Birçok kanserde tümör patogenezinde katkıda bulunan bir anti-onkogen olarak tanınmaktadır (168). Kolon kanserinde paklitaksel duyarlılığı, nazofarinks kanserinde sisplatin duyarlılığı ile ilişkilendirilmiştir.

Serviks kanseri olan gruplarda kontrol grubuna göre downregüle olduğu bulunmuştur (170). Etkisini CDKN2A üzerinden gösterdiği düşünülmektedir. CDKN2A serviks ve over kanserinde overeksprese olan bir tümör supresor genidir.

İleri evre serviks karsinomu olan tedaviye yanıt vermeyen hastalarda miR-125a seviyesinin azaldığı bulunmuştur. İn vitro ve in vivo miR-125a seviyelerinin azalması ile servikal kanser hücrelerinde büyüme metaztaz oranı artar. Hücre siklusunda, G2/M kontrol noktasında c-myc üzerinden STAT3 düzeyini düşürerek hücre büyümesinin baskılanmasını sağlar. E-cadherin ekspresyonunu artırarak hücre inazyonunu engeller. STAT3 üzerinden etki ederek paklitaksel duyarlılığını arttırdığı düşünülmektedir (128).

2.4.2.3. miR-21-5p

pri-miR-21, 17. kromozomdaki VMP1 geni içerisindeki intron bölgesinde bulunmaktadır (171). miR-21 birçok memelide bulunmaktadır. miR-21 upregülasyonu birçok kanser patogenezinde gösterilmiştir.

miR-21 seviyeleri daha çok HPV16 pozitif olan serviks kanseri hücrelerinde değişmektedir. HPV52 ve HPV58 ile enfekte hücrelerde miR-21 seviyelerinde değişiklik olmadığı görülmüştür (172). miR-21 kanser gelişimi ile ilişkili olan PTEN, PDCD4, RECK, STAT-3 gibi çeşitli genleri hedef alır (173).

HPV negatif hücrelerde miR-21 ekspresyonu HPV pozitif anormal dokularda ve SCC hücrelerinde belirgin olarak daha düşük bulunmuştur. Bu durum miR-21'in HPV enfeksiyonu ve servisit ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (174).

Başka bir çalışmaya göre miR-21 overekspresyonu, PDC4'ü baskılayarak NF-kB aracılığıyla IL-10'un aktive edilmesine neden olur. IL-10 antiinflamatuvar bir sitokindir ve bağışık yanıtı kaçarak servikal kanser gelişimine katkıda bulunmasına neden oluyor gibi görünmektedir (173). Bu yol aynı zamanda PI3k/AKT/mTOR yolağını kontrol ederek hücre bölünmesi ve proliferasyonu sağlar.

2.4.2.4. miR-18a

miR-18a, onkomiR olarak bilinir ve onkogenik miR-17-92 ailesinin bir üyesidir. Serviks kanserinde ekspresyon artışı ile tümöral hücrelerin çoğalmasına ve invazyonuna katkıda bulunur. Bu etkisini hangi mekanizma ile gösterdiği net olarak bilinmemektedir (175).

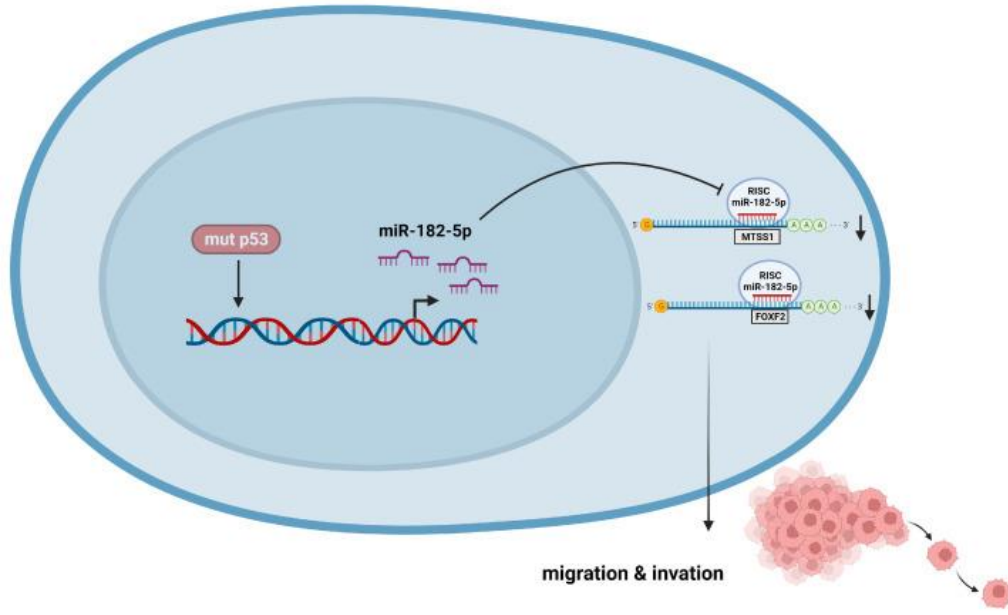
STK4 mRNA'nın 3'UTR bölgesinde bir miR-18a bağlanma bölgesi bulunmaktadır. HR-HPV ile enfekte servikal hücrelerde, serviks kanserinde ilerlemiş hastalığı olanlarda miR-18a seviyeleri artmış olarak bulunmuştur. miR-18a'nın serviks kanserinde upregüle olarak STK4'ü baskılar bu da serviks kanseri hücrelerinde proliferasyonu tetikler (125).

2.4.2.5. miR34c-3p

miR-34c; 11.kromozomun uzun kolundan transkripte edilir (176). Servikal karsinomlu SiHa hücrelerinde miR-34c-3p ve miR-34c-5p'nin proliferasyon, apoptoz, migrasyon ve iinvazyonla ilişkili olduğu belirlenmiştir (177). Bu etkinliğini MAP2 ve MMP9 protein aktivitelerini azaltarak gösterir (178). miR-34c; Notch1 ve Jagged1'i downregüle ederek karsinom göçünü engelleyen tümör supresor bir genidir (179).

2.4.2.6. miR-182

miR-182, 7.kromozom tarafından kodlanmaktadır (180). Birçok kanserde ekspresyon artışı görülen bir onkomiR'dir.miR-182'de ekspresyon artışı migrasyon, invazyon ve metastazla yakın ilişkili bulunmuştur. Bu etki p53 mutasyonunun miR-182'de upregülasyona neden olduğu ve böylece hücre migrasyonu ve invazyonunun tetiklendiği öngörülmüştür. P53 mutasyonları "Adherens junction" da görevli olan miRNA'ların fonksiyon kaybına neden olur. Bu duruma neden olan genler FOXF2 (Forkhead box F2) ve MTSS1 (Metastasis suppressor-1) gibi hedeflerin ifadesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Şekil 16) (181, 182).



Şekil 15. miR-182-5p'nin etki mekanizması (181)

Son çalışmalarda miR-182'nin endometrial kanserde PIAS1 (activated STAT protein inhibitör) mRNA'sını hedefleyerek ekspresyon artışına neden olduğu ve bunun sonucunda STAT3'ü inhibe ettiği gösterilmiştir (183).

2.4.2.7. miR-148b

miR-148b 12.kromozomda kodlanmaktadır ve tümör supresor gen olarak görev yapar. Serviks kanserinde miR-148b'nin ekspresyonunda artış olması DNMT1'de azalmaya neden olarak hücrelerde proliferasyonu ve invazyonu engeller ve apoptozun indüklenmesine neden olur. Bu etkilerini cyclin D1 ve caspaz-3 üzerinden gerçekleştirdiği düşünülmektedir (184). Benzer şekilde endometrial kanserle ilişkili fibroblastlardan elde edilen eksozomlardaki tümör supresor miR-148b'nin downregülasyonun önlenmesinin, kanser progresyonunu durdurduğu belirlenmiştir (185). Ancak serviks kanseri ve miR-182 arasında yapılan çalışma sayısı oldukça azdır. HPV persistansını belirlemek için yapılan bir çalışma bulunmamaktadır.

2.4.2.8. miR-34a

1.kromozomda bulunan miR-34a, miR-34b ve miR-34c ile aynı ailede yer alır (176). miR-34a tümör supresor bir gen dir ve mide, karaciğer, prostat ve serviks kanserinde downregüle olduğu gösterilmiştir (186). Ayrıca HR-HPV ile enfekte olan

servikal kanserlerde miR-34a'da belirgin ekspresyon kaybı olduğu görülmüştür. Patogenezi ile ilişkili olarak p53'e etki eden viral E6 proteininin miR-34a'yı aktive eden proteinin baskılayarak yaptığı öngörülmektedir (8). HPV enfeksiyonuna bağlı servikal karsinom ve prekanseröz lezyonlarda gösterilen azalmış pri-miR-34a ifadesi, erken aşamada tespit edilebilir; miR-34a inhibisyonu sonucu p53 yolaklarını etkileyerek karsinom sürecinde erken başlangıçlı bir olay olduğu düşünülmektedir. miR-34 hücre siklusunda WNT1/B-catenin yolağında WNT1'i hedef alarak cadherin değişimini etkiler ve proliferasyonu teşvik eder, böylelikle karsinom sürecine katkıda bulunur (187).

KDM5B geni, Notch sinyalleme yolunda önemli bir rol oynayan histon demetilazdır. miR34a, UPA'yı (ürokinaz plazminojen aktivatörü) inhibe ederek Notch1 ve Jagged1 sinyal yollarını devre dışı bırakır. Bu durum servikal karsinom hücrelerinde invazyonu azaltır (179).

2.4.2.9. miR-29a-5p

miR-29 ailesi iki ayrı gen tarafından kodlanan 4 miRNA'dan oluşmaktadır; miR-29a, miR-129b-1, miR29b-2, miR29c. miR-29b-1 ve miR-29a 7.kromozomda yer alır ve miR-29b-2 ve miR-29c 1.kromozomda yer alır (188). HPV pozitif LSIL hücrelerinde miR-29a'nın downregüle olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (189). Bu durum miR-29a'nın servikal kanserin progresyonunda tümör supresör bir rol oynayabileceğini göstermektedir (190). Aynı zamanda CIN ve invaziv servikal kanserde de ekspresyonunda azalma gösterdiği bulunmuştur (191). miR-29a; SIRT1(sirtuin 1) mRNA'nın 3'UTR ünitesine bağlanarak migrasyon, invazyon ve epitelyal mezenkimal transizyonda görev alır (192). Ayrıca DNMT3A (DNA metiltransferaz 3 alfa) ve DNMT3B (DNA metiltransferaz 3 beta)'nin etkinliğini azaltarak servikal kanserde p16 metilasyonuna etki eder (193). Tümör baskılayıcı görev gören SOCS1'in metilasyonuna neden olarak servikal kanserin yayılmasını önleyebileceği öne sürülmüştür (194). Kollajen moleküllerinin olgunlaşmasında önemli rolü olan HSP47 (heat shock protein 47)'yi düzenler. HSP47'nin azalması kanser hücrelerinin migrasyonunu ve invazyonunu inhibe eder böylece miR-29a'nın azalması servikal kanserde metastaz oluşumuna bu patogenez yolağıyla katkıda bulunur (189).

2.4.2.10. miR-375

mir-375; 2.kromozomda kodlanan ve karaciğer, mide, serviks gibi birçok malignite çeşidinde düşük seviyelerde eksprese edilen bir gendir (195, 196). HPV enfeksiyonlarında miR-375 seviyelerinde azalma olduğu gösterilmiştir (197). Serviks kanserinde yüksek seviyelerinde bulunmasının; bir transkripsiyon faktörü olan SP1'e etki ederek hücre migrasyonunu ve invazyonunu inhibe edebileceği bulunmuştur (198). Ayrıca epitelyal mezenkimal transizyonu (EMT) kolaylaştırarak servikal kanserin kazanılmış kemoterapi direncine aracılık edebileceği öne sürülmektedir (199). miR-375'in düşük seviyelerde olmasının serviks kanserinde RT direncine neden olduğu ve benzer şekilde HR-HPV pozitif kanser hücrelerinde yüksek düzeylerde olmasının RT direncini azalttığı saptanmıştır (200). Ayrıca HPV pozitif serviks kanseri hücrelerine miR-375 eklenmesinin HPV transkripsiyon seviyelerinde azalma sağladığı gösterilmiştir (130). Başka bir çalışmada ise miR-375'in promotörlerinin servikal skuamoz hücreli kanserde hipermetilasyon artışı olması nedeniyle transkripsiyon seviyelerinde azaldığı gösterilmiştir (201).

2.4.2.11. miR-143-5p

miR-143 servikal kanser dokularda ts-miR olarak etki eder. He-La hücrelerinde proliferasyonu inhibe eden ve apoptozu destekleyen etkileri olan bir tümör supresor gen olarak hareket ettiği ve yüksek seviyelerde miR-143 seviyelerinin in vivo tümör oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir. Bu etkisini Bcl-2 seviyelerini düşürerek gösterdiği düşünülmektedir. Bcl-2'nin 3'UTR bölgesinde miR-143'e ait bir bağlanma bölgesi olduğu bulunmuştur (202).

miR-143-5p ve serviks kanseri ilişkisi ile ilgili tek bir çalışma mevcuttur. miR-143-5p'nin Cyclin D1 ve Bcl-2 ekspresyon seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir. Aynı zamanda ELK1, p-ELK1, C-fos, Cyclin D1 ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyon seviyelerini düşürerek serviks hücrelerinde hücre döngüsünü, proliferasyonu, göçü ve invazyonun ilerlemesini engellediğini ve serviks kanser hücrelerinde apoptozu inhibe ettiği doğrulanmıştır.

Patogenez ile ilişkili diğer bir mekanizma olarak miR-143 seviyelerinin azalmasının heterodimerik protein kompleksi olan HIF-1 α seviyelerinin artmasına neden olarak proliferasyonu arttırdığı öne sürülmüştür (203).

Benzer şekilde miR-143 düzeyi düşük olan hastalarda lenf nodu metastazının olduğu gösterilmiştir. Ayrıca miR-143 seviyesi ile tümör boyutu arasında ters orantı olduğu belirlenmiştir. Ancak patolojik grade ve LVSI arasında bağlantı bulunamamıştır (204).

2.4.2.12. miR-372

miR-372'nin testiküler germ hücreli tümörlerde ekspresyon artışı ile onkojenik etkileri olduğu gösterilmiştir (205). Ancak serviks kanseri ve miR-372 ilişkisini araştıran çalışmada; servikal karsinomda seviyelerinde azalma olduğu ve tümör supresor bir gen gibi çalıştığı gösterilmiştir. Servikal skuamoz hücreli karsinomda miR-372 overeksprese olması hücre büyümesini inhibe eder ve hücre döngüsünü S/G2 fazında durdurur (206).

2.4.2.13. miR-9-5p

miR-9 insanlarda 1., 5. ve 15.kromozom olmak üzere 3 farklı kromozomda kodlanır (207). HPV16 pozitif LSIL hastalarda miRNA ekspresyonu artarken HPV52 ve HPV58 enfeksiyonlu servikal intraepitelyal lezyonlarda azalmaktadır (172). Bu durum farklı HPV tiplerinin değişik enfeksiyon paternlerine sahip olabileceğini göstermektedir. HPV enfeksiyonunun doğal seyri tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle bir hastanın ne kadar süre önce HPV ile enfekte olduğunu belirlemek çok mümkün değildir. Ayrıca enflamatuar süreçlerin viral alt tiplere göre değişebileceği öngörülmektedir (63).

Normal serviks dokusuna göre displazi gelişen dokularda miR-9'un ve buna bağlı olarak E-cadherin seviyelerinin azaldığı görülmüştür. E-cadherin'in azalması ile B-catenin seviyesi artar ve bunun sonucunda VEGFA artar. VEGFA pro-anjiogenik bir faktördür ve tümöral hücrelerde anjiogenezin artmasına neden olur (208).

miR-9 ekspresyonu, tümörün histolojik tipi ve HR-HPV tipine göre değişmektedir. miR-9-5p; TWIST1 ve CDH1'i hedef alarak onkomir gibi etki

edebilmektedir. CDH1 ekspresyonunun kaybı, epitelyal neoplazmın invazivliği ve tümörün ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Ancak servikal adenokarsinomda EMT (epitelyal mezenkimal transizyon) düşük seviyelerde olması CDH2'nin TWIST1 aracılığıyla upregüle olmasına neden olur ve böylece miR-9 tsmiR olarak etki eder (131).

3. GEREÇ YÖNTEM

Çalışma kesitsel olgu kontrol olarak tasarlanmış olup, Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde HSIL tanısı konulmuş ve daha önceden tedavisi yapılmış takip altındaki olgular çalışma grubu olarak tanımlandı. Bu olgular rutin takiplerine devam ederken kronolojik sıraya göre çalışmaya katılmaya davet edildi. Çalışmayı kabul eden 100 olgu takipleri sırasında iki ayrı grupta değerlendirildi; HPV pozitif olanlar (HPV persistansı olan grup) ve HPV negatifleşenler (HPV persistansı olmayan grup). Çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerden, rutin jinekolojik muayene sırasında servikal smear örneği alınarak bu spesmenlerden miRNA düzeyleri (miR-125b-5p, miR-125a, miR-21-5p, miR-18a, mi-9-5p, miR-34c-3p, miR-182, miR-148b, miR-34a, miR-29a-5p, miR-375, miR-143-5p, miR-372) çalışıldı. Servikal sürüntü örneklerinden miRNA çalışılarak HSIL gelişimi ile persiste eden HPV enfeksiyonu arasında miRNA düzeylerinin farklılık gösterip göstermediği araştırıldı. Olguların rutin takip ve gerekli tedavilerine olağan şekilde devam edilmiş ve çalışma kapsamında hastalara deneysel herhangi bir invaziv girişim ya da ilaç uygulaması yapılmamıştır.

Hastaların demografik verileri, anamnez bilgileri ve önceki medikal kayıtlarına jinekolojik hasta değerlendirme formu ve dosya kayıtları üzerinden ulaşıldı. Hastaların başvuru sırasındaki HPV varlığına ve hastaların takipleri sırasındaki HPV durumlarına ise Pamukkale Üniversitesi hastane bilgi kayıt sistemi üzerinden ulaşıldı. Ayrıca hastaların güncel takip bilgilerine ve laboratuvar sonuçlarına da dosya kayıtları üzerinden ulaşıldı. Hastaların önceden Pamukkale Üniversitesi'nde alınan HPV testlerinde HR-HPV tespiti için Abbott RealTime High Risk HPV (HR-HPV) testi kullanılmakta idi. Bu test sonucunda HPV-16, HPV-18 ve HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68'i de içeren diğer yüksek riskli gruplar (Other HR) olmak üzere 3 farklı pozitif sonuç bildirilmektedir. Bu çalışmada da hastalar HPV-DNA testi persiste etmeyen (62 olgu) ve HPV16,18 veya OHR olarak persiste edenler (38 olgu) olarak 2 grupta incelendi. Başka bir merkezde tedavi edilmiş ve takip olan hastalar analize dahil edilmedi.

Çalışmaya Dahil Olma Kriterleri:

- 30-69 yaş aralığı
- Tanı anında yüksek riskli servikal HPV enfeksiyonu pozitifliği mevcut HSIL tanısı konulmuş hastalar
- Tanı sonrası tedavi ve takipleri Pamukkale Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde devam eden olgular

Çalışmanın Dışlama Kriterleri:

- Bilinen immün sistem yetmezliği olması
- Gebelik durumu
- Bilinen kanser öyküsü olması

Servikal Sürüntü Örneklerinin Toplanması

Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıklar ve Doğum Kliniğine başvuran HSIL tanısı almış ve persiste HPV enfeksiyonu devam eden ve etmeyen kadınlardan 2 ml TRIZOL solüsyonu içeren 50 ml falkon tüp içerisinde olmak üzere servikal sürüntü örneği alındı. Çalışma örneklerinin tamamlanmasına kadar elde edilen örnekler bu tüpler içerisinde -80 °C de muhafaza edildi.

miRNA İzolasyonu

mRNA izolasyonu için aşağıda markası, adı ve katalog numarası verilen materyaller kullanıldı (Tablo 2).

Tablo 2. mRNA İzolasyonu İçin Kullanılan Materyal Bilgileri

mRNA İzolasyonu İçin Kullanılan Materyal Bilgileri		
Kullanılan Kitin Markası	Kitin Adı	Katalog No
GENEAİD	Genezol	GZX100
GENEAİD	Presto miRNA kit	PMI100

miRNA izolasyon protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Trizol içerisinde bulunan rnekler -80°C 'den çıkarıldı ve oda sıcaklığında erimeleri beklendi. Erime işleminden sonra 140 ul Kloroform ilave edildi.
2. 15 saniye corteks yapıldıktan sonra oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi.
3. 12.000rpm, 4°C 'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant (sulu faz) başka bir ependorf tüpe aktarıldı.
4. Ependorfa aktarılan supernatantın, 1,5 katı kadar %96'lık etanol (yaklaşık 525 μl) ilave edildi ve yavaşça pipetaj yapıldı.
5. Örneklerden 700 μl spin kolonlarına konuldu. 8000 g'de oda sıcaklığında 30 saniye santrifüj edildi. Szlen kısım uzaklaştırıldı.
6. Kolona 700 μl RWT buffer eklendi ve 8000 g'de 15 saniye santrifüj yapıldı. Szlen kısım uzaklaştırıldı.
7. Kolona 500 μl RPE buffer eklendi ve 8000 g'de 15 saniye santrifüj yapıldı. Szlen kısım uzaklaştırıldı.
8. Sonrasında spin kolona 500 μl RPE buffer eklendi ve 2 dk 8000 g'de santrifüj yapıldı.
9. Son kurutma fazı için spin kolon yeni bir 2ml'lik toplama tüpüne aktarıldı ve en yüksek hızla 1 dakika santrifüj yapıldı.
10. Spin kolonlar 1,5 ml'lik yeni toplama tüplerine yerleştirildi ve 30 μl RNase-free water spin kolonun ortasına koyulup 1 dk 8000 g'de santrifüj yapıldı.
11. RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayinleri Nanodrop cihazı ile gerçekleştirildi. cDNA'ya dönüştürülmeyen RNA'lar -80°C 'ye kaldırıldı.

Mikro RNA Ekspresyon Değişimi İçin miRNA cDNA Sentezi

miRNA ekspresyon analizi için cDNA dönüşümü projeden temin edilen kit protokolüne göre gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı şu şekilde hazırlanmıştır: 5x HiFlex Buffer 4 µl, 10x MiScript Nucleics Mix 2 µl, MiScript Reverse Transkriptaz Mix 2 µl, RNA 5 µl, dH₂O 11 µl olmak üzere toplam 20 µl.

Hazırlanan reaksiyon karışımını içeren tüplerin 37°C derecede 60 dakika ve sonrasında 95°C derecede 5 dakika inkübasyonu ile reaksiyon gerçekleştirildi. RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilip miRNA ekspresyonlarının analiz edileceği çalışmaya kadar -20 °C de muhafaza edildi.

Real-Time PCR ile Mikro-RNA (miRNA) Ekspresyon Analizi

miRNA ekspresyonları özgün primer ve SYBR Green master mix ile Real-Time PCR gerçekleştirildi. Normalizasyon U6 ekspresyonu ile yapıldı. Reaksiyon karışımları şu şekilde hazırlandı: SYBR green PCR mastermix 5 µl, Forward Primer 0,5 µl, Reverse Primer 0,5 µl, cDNA 2,5 µl, dH₂O 2,5 µl olmak üzere toplam 10 µl'lik Real Time PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Reaksiyon koşulları;

95°C 15 dakika

94°C 15 saniye,

58°C 30 saniye,

72°C 30 saniye

} 45 döngü

İstatistiksel Analiz

RT-PCR ile tespit edilen miRNA ekspresyon değişimleri ile elde edilen verilerin analizinde $\Delta\Delta CT$ metodu kullanıldı. Web tabanlı “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” (<https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>) programında bulunan, Volcano Plot analizleri kullanıldı. Volcano Plot testi ile hasta grubu ve kontrol grubu ile ilgili miRNA ekspresyon değerleri rölatif olarak belirlenebilmektedir. Ayrıca bu test ile iki veya çoklu gruplara ait ekspresyon

değerleri $\pm 3SD$ karşılaştırılması temeline bağlı olarak analiz edildi ve gruplar arasındaki istatistiksel değişim “Student t-testi” ile karşılaştırıldı. Kat değişimi değerleri (Fold change ve Fold regulation) de $\Delta\Delta CT$ tabanlı olarak belirlendi.

Veriler, IBM İstatistiksel Ürün ve Hizmet Çözümleri (Sürüm 22, IBM SPSS Statistics for Windows, Armonk, NY) programı kullanılarak analiz edildi. Nicel sürekli değişkenlerin (yaş gibi) tanımsal değerleri standart tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerle incelenmiştir. (Aritmetik ortalama, standart sapma, medyan). Kategorik değişkenler (varlık sıklıkları) frekansları ve toplum içindeki yüzdeleri ile verilmiştir. Nicel ölçümlerin değerlendirilmesi, verilerin dağılım özelliklerine göre “Student’s test” veya “Wilcoxon signed rank test” kullanılarak yapılmıştır. Kategorik değişkenlerin kıyaslamaları olgu dağılımlarının durumuna göre Chi-square ya da Fischer’s Exact Test ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. DEMOGRAFİK VERİLER

Çalışma içeriğindeki toplanan ve analize dahil edilen hasta sayısı 100'dür. Hastaların demografik verileri incelendiğinde yaş ortalaması $46,2 \pm 9,3$; kilo $67,6 \pm 12,4$; VKİ $26,6 \pm 4,8$; İlk cinsel ilişki yaşı $20,4 \pm 4,2$; aktif cinsel yıl süresi $26,1 \pm 4,2$; ilk gebelik yaşı $21,9 \pm 4,5$; parite 2 ± 1 olarak saptandı. Çalışma grubuna dahil edilen hastaların %72'si premenapoz, %28'inin ise postmenapozal dönemde olduğu belirlendi. 90 hastada (%90) DM yok iken 10 hastada (%10) DM varlığı mevcuttu. Hastaların 75'inin öyküsünde RİA kullanımını yokken, 25 tanesinde RİA kullanım öyküsü vardı. 81 hastanın (%81) öyküsünde OK kullanımını mevcutken 19 hastanın (%19) öyküsünde OK kullanımını olmadığı tespit edildi.

Tablo 3. Demografik veriler

Demografik veriler	
Yaş ortalaması (yıl)	$46,2 \pm 9,3$
Kilo (kg)	$67,6 \pm 12,4$
VKİ (kg/m²)	$26,6 \pm 4,8$
İlk cinsel ilişki yaşı (yıl)	$20,4 \pm 4,2$
Aktif cinsel yıl süresi	$26,1 \pm 10,8$
İlk gebelik yaşı (yıl)	$21,9 \pm 4,5$
Parite	2 ± 1
Menapoz durumu	
Premenapoz	72 (%72)
Postmenapoz	28 (%28)
Sigara içiciliği	
Kullanıyor	39 (%39)
Kullanmıyor	61 (%61)
Pasif Sigara içiciliği	
Yok	80 (%80)
Var	20 (%20)
Diyabet varlığı	
Yok	90 (%90)
Var	10 (%10)
RİA kullanım öyküsü	
Yok	75 (%75)
Var	25 (%25)
OK kullanım öyküsü	
Yok	81 (%81)
Var	19 (%19)

Hastaların ilk başvuru zamanındaki ve son kontrol zamanındaki servikal Hpv tipleri;

Hastaların başvuru anındaki HPV'leri hepsinde pozitif idi. 58 örnekte (%48,3) HPV tip 16, 10 örnekte (%8,3) HPV tip 18, 52 örnekte ise other HR-HPV (%43,3) saptanmıştır. Aynı örnekte tespit edilen farklı genotipler, enfeksiyon sayısının hesaplanması için ayrı ayrı sayılmıştır. Bu nedenle ve yuvarlama nedeniyle yüzdeler %100'e eşit olmamaktadır. Hastaların 38 tanesininin HPV'si persiste etmiş, 62 tanesinin HPV'si negatifleşmiştir. HPV persistansı olan hastalardan 16'sı HPV 16; 3 tanesi HPV 18; 21 tanesi HPV other HR olarak tespit edilmiştir. Saptanan HPV'lerde aynı örnekte birden fazla HPV pozitif olan olgular olduğu akılda bulundurulmalıdır. Çalışmadaki ilk başvuru anındaki HPV ve son kontroldeki HPV durumları Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. HSIL tanı anındaki ve son kontroldeki saptanan HPV'ler

	İlk başvurusu		Son kontrol	
	n	Saptanan HPV'ye n göre yüzdesi	n	Saptanan HPV'ye göre yüzdesi
HPV tip 16	58	%48,3	16	%42,1
HPV tip 18	10	%8,3	3	%7,8
Other hr-HPV tipleri	52	%43,3	21	%55,2
HPV negatif	0	0	62	
Toplam HPV pozitif saptanan	120		38	

4.2. miRNA SONUÇLARI

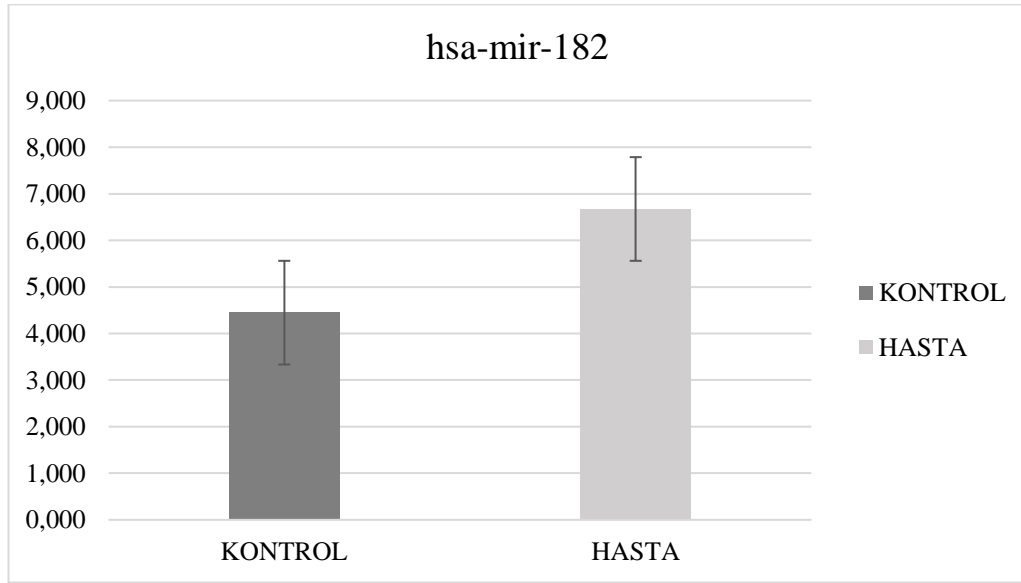
Hastaların miRNA sonuçlarının fold changelerinin medyan değerleri ve p değerleri Tablo 5'te verilmiştir. Bu değerlendirmelere göre HPV persistansı olan ve olmayan hastalar arasında miR-143-5p, miR-125a, miR-34c-3p, miR-375 değerleri istatistiksel olarak anlamlı saptanmış, diğer miRNA'lar arasında bir fark saptanmamıştır. miR-125, miR-34c-3p, miR-375 HPV persiste eden grupta ekspresyon artışı göstermiş, miR-143-5p düzeylerinde ise ekspresyon kaybı görülmüştür. miRNA değerleri tabloda gösterilmiştir.

Tablo 5. miRNA'ların fold change değerleri ve p değerleri

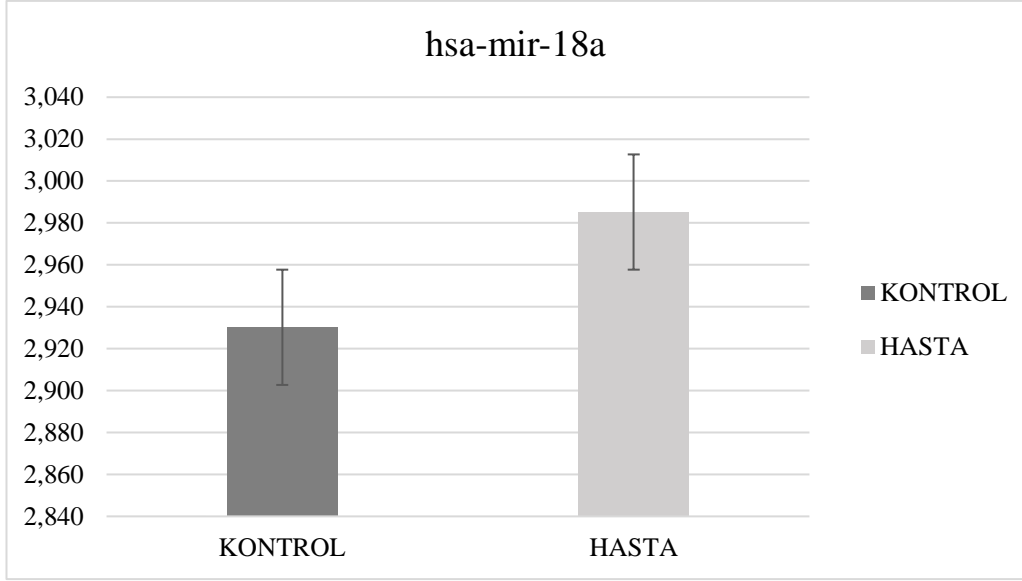
	Fold Change	
	Medyan	P değeri
miR-182	1,38	,458
miR-18a	1,53	,356
miR-148b	1,35	,237
miR-29a-5p	1,75	,458
miR-34a	1,16	,662
miR-21-5p	1,62	,130
miR-9-5p	1,58	,842
miR-143-5p	,98	,027
miR-125b-5p	1,83	,097
miR-125a	2,57	<,001
miR-34c-3p	3,11	,004
miR-372	1,77	,412
miR-375	1,81	,023

4.3. miRNA GRAFİKLERİ

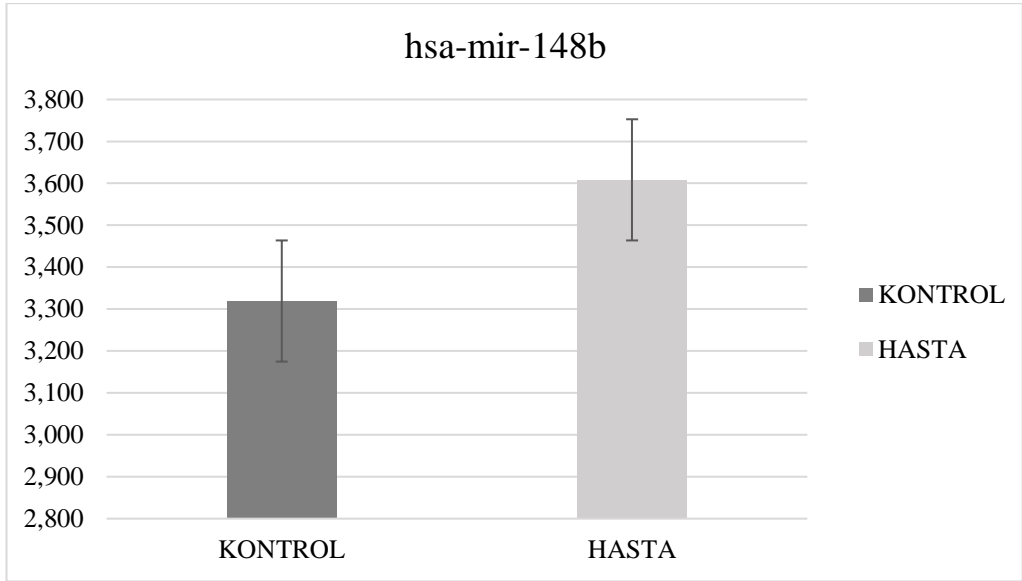
Elde edilen miRNA ekspresyon değerlerinin fold change düzeyleri aşağıdaki grafiklerde listelenmiştir (Şekil 17, Şekil 18, Şekil 19, Şekil 20, Şekil 21, Şekil 22, Şekil 23, Şekil 24, Şekil 25, Şekil 26, Şekil 27, Şekil 28, Şekil 29).



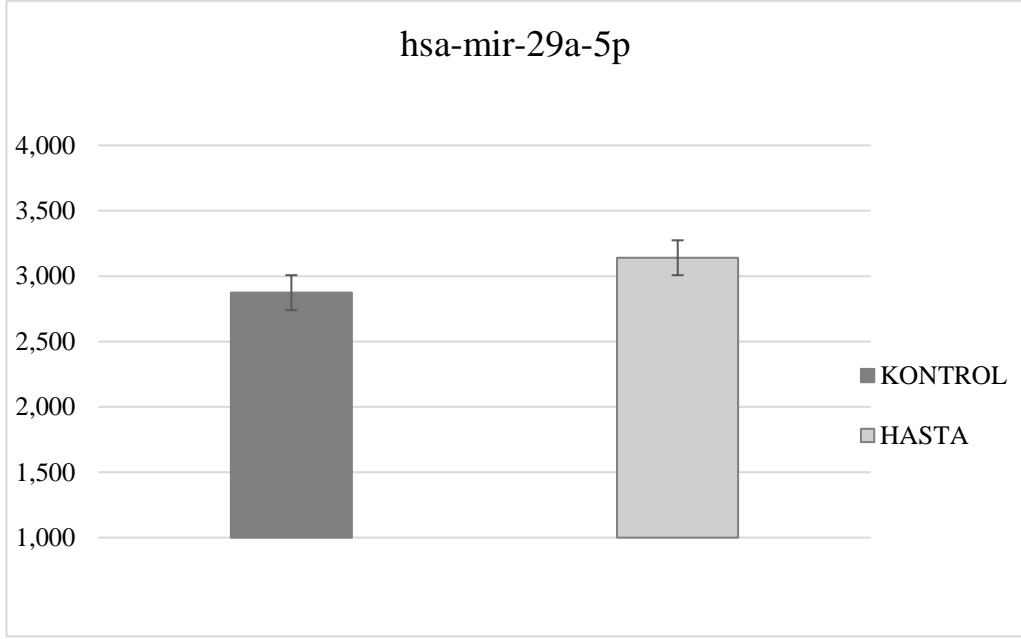
Şekil 16. hsa-mir-182



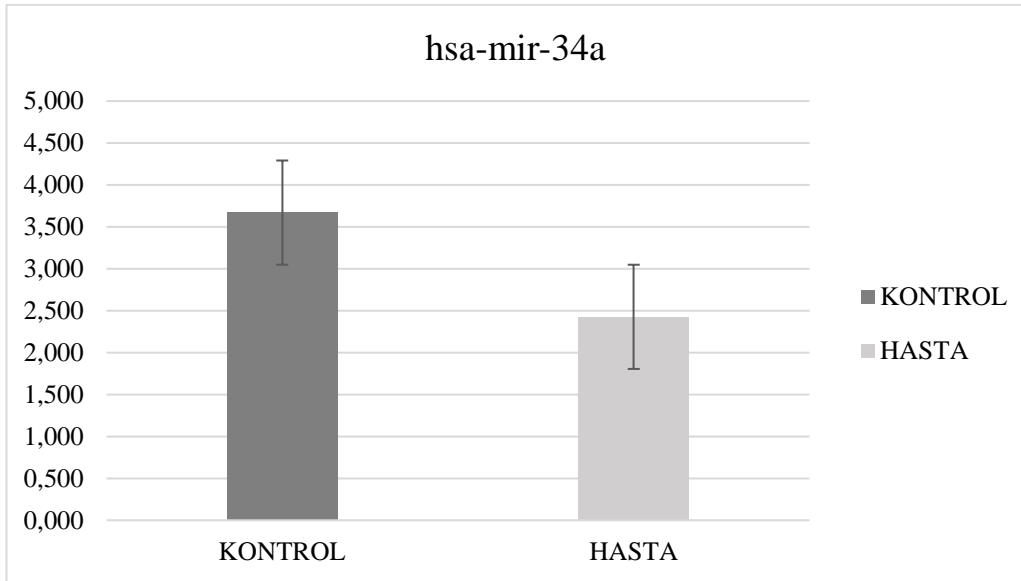
Şekil 17. hsa-mir-18a



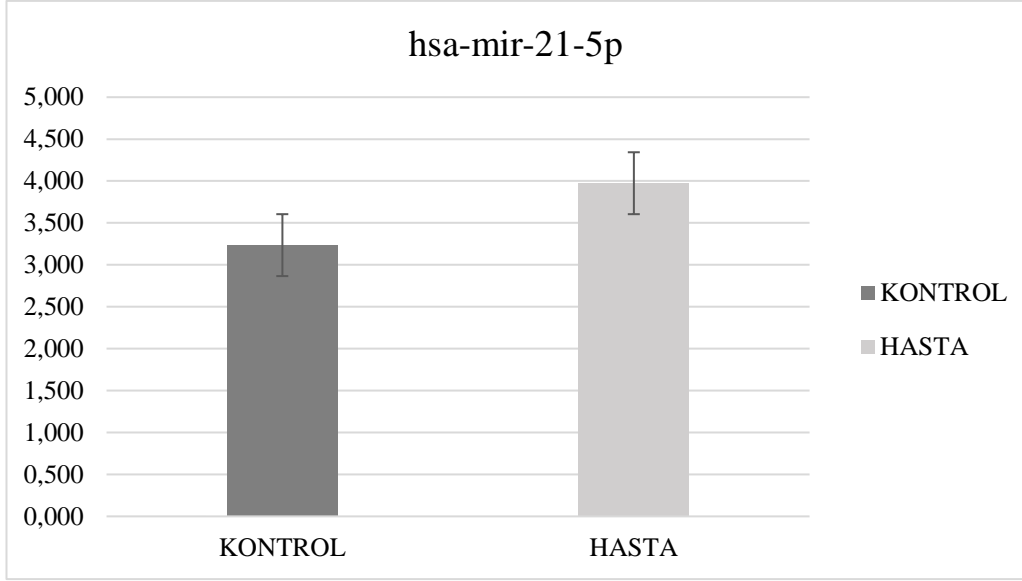
Şekil 18. hsa-mir-148b



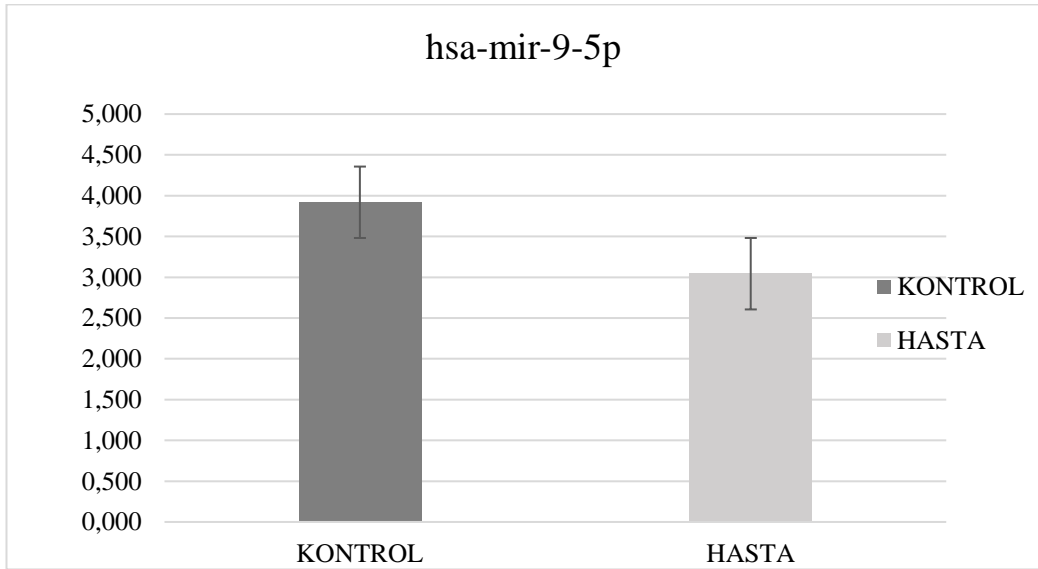
Şekil 19. hsa-mir-29a-5p



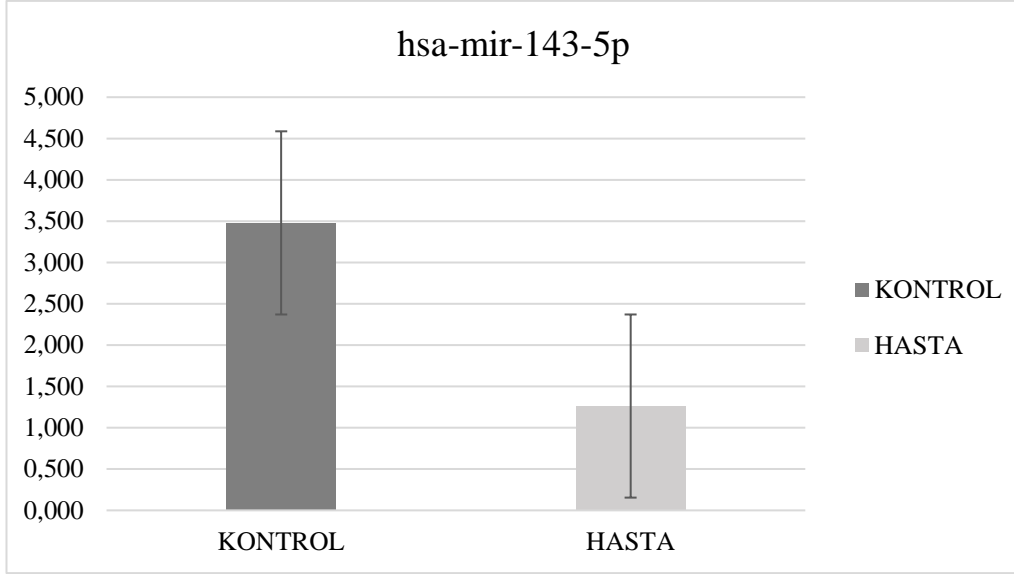
Şekil 20. hsa-mir-34a



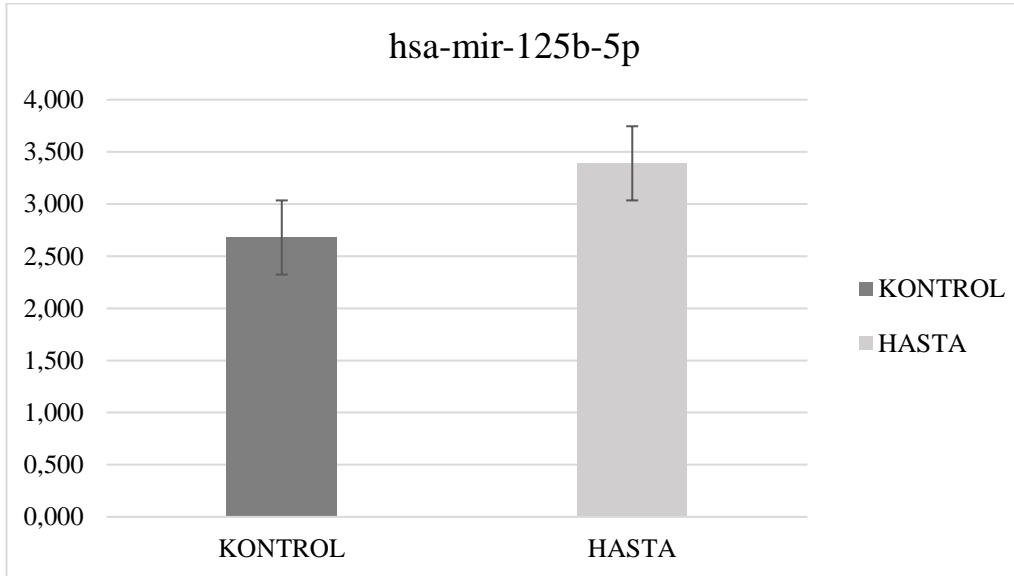
Şekil 21. hsa-mir-21-5p



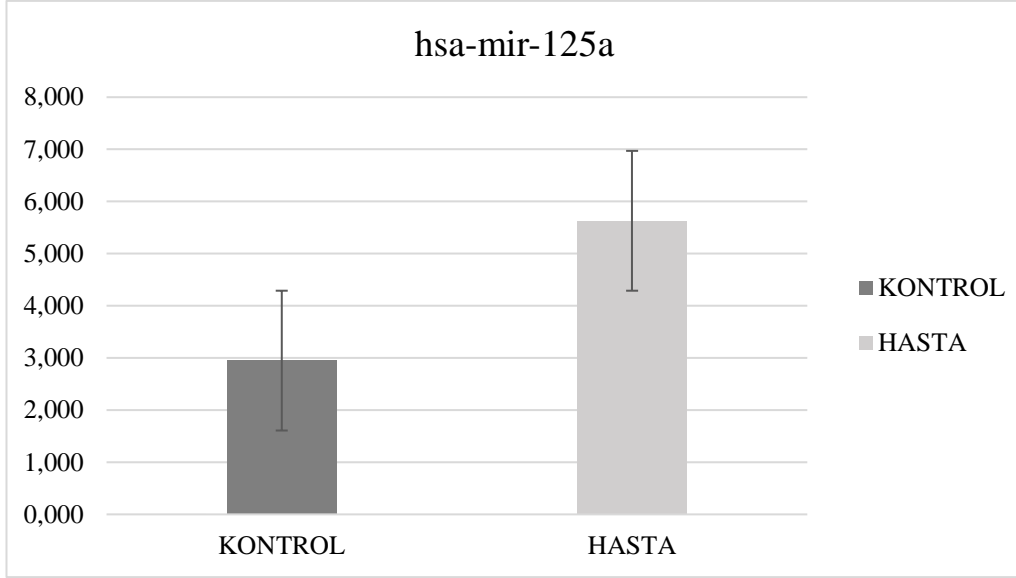
Şekil 22. hsa-mir-9-5p



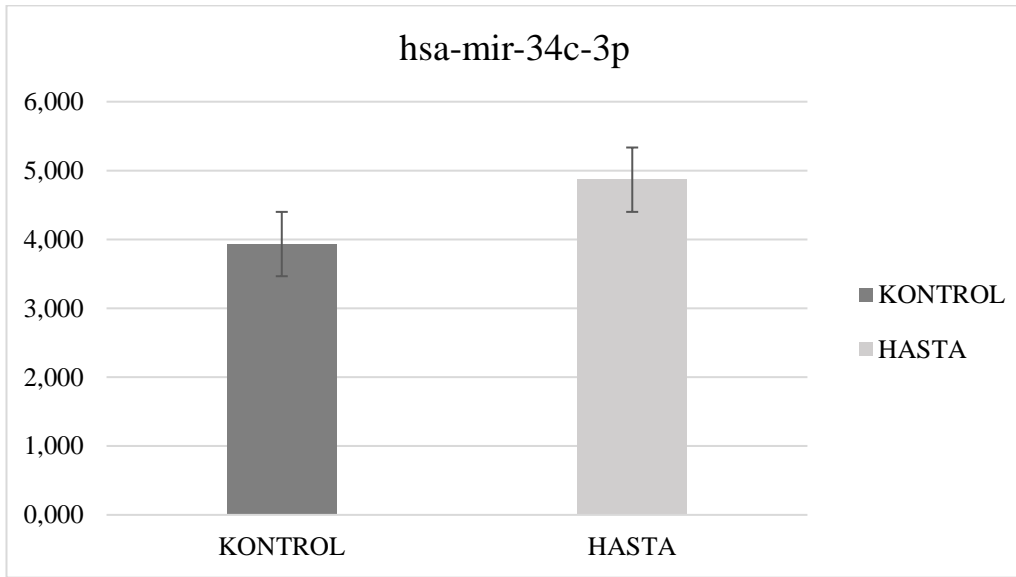
Şekil 23. hsa-mir-143-5p



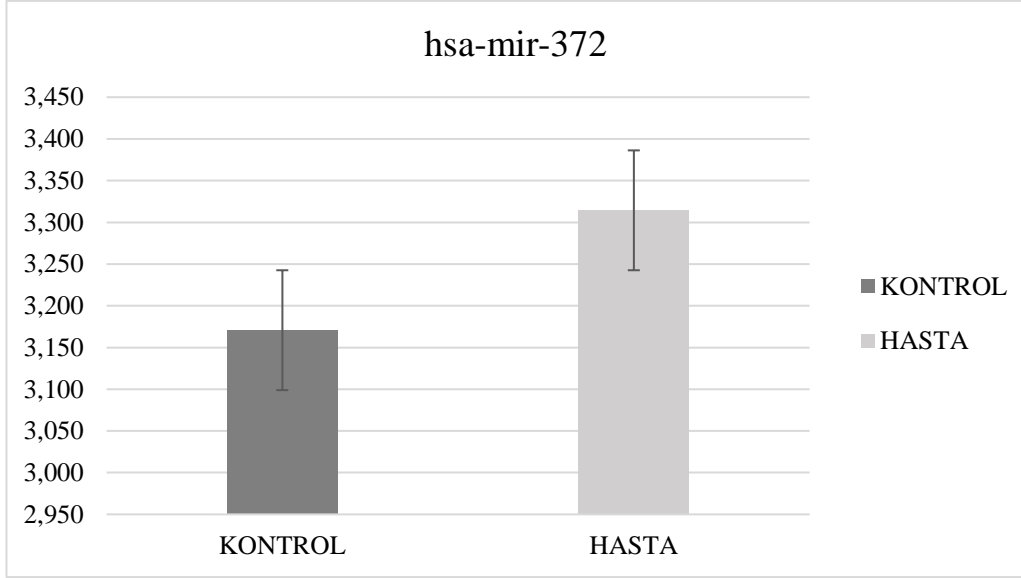
Şekil 24. hsa-mir-125b-5p



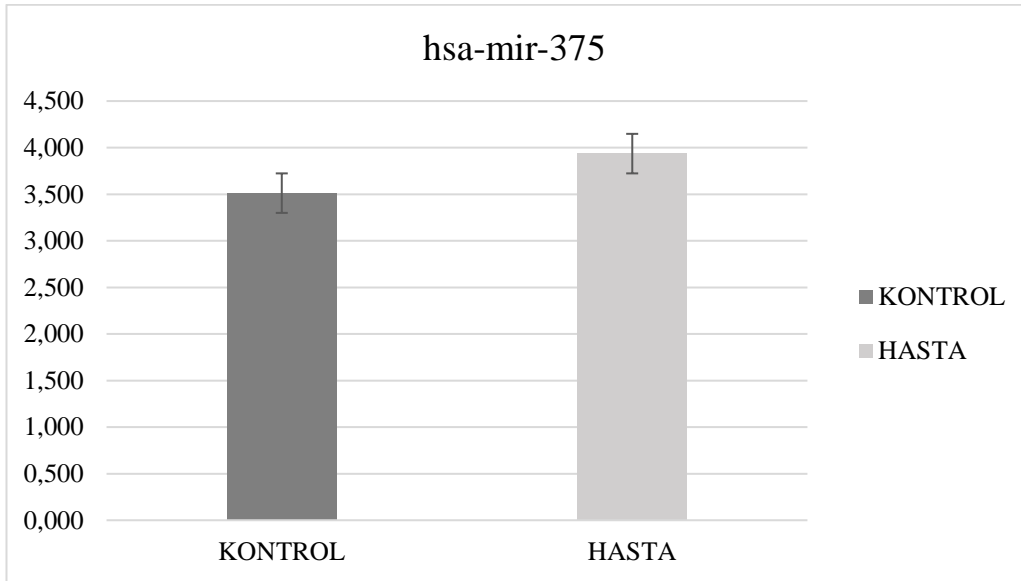
Şekil 25. hsa-mir-125a



Şekil 26. hsa-mir-34c-3p



Şekil 27. hsa-mir-372



Şekil 28. hsa-mir-375

4.4. KORELASYON ANALİZİ SONUÇLARI

İstatistiksel olarak anlamlı çıkan miRNA'ların yaş, VKİ, ilk cinsel ilişki yaşı, ilk gebelik yaşı, aktif cinsel yaşam süresi ve parite ile korelasyon analizi yapılmıştır. Yapılan korelasyon analizi sonucunda miRNA düzeyleri ile istatistiksel olarak anlamlı korelasyon izlenmemiştir.

Tablo 6. Demografik verilerle miRNA arasındaki korelasyon

		miR-375	Mir-125a	Mir-34c	Mir-143-5p
Yaş	Korel. Katsayısı	-011	-,058	-,125	,119
	P değeri	,913	,563	,215	,238
Vki	Korel. Katsayısı	-,046	,030	-,066	-,096
	P değeri	,661	,773	,530	,357
İlk cinsel ilişki yaşı	Korel. Katsayısı	-,052	-,119	-,081	-,020
	P değeri	,615	,250	,437	,845
İlk gebelik yaşı	Korel. Katsayısı	,143	-,005	,035	,059
	P değeri	,615	,959	,739	,574
Aktif cinsel y süresi	Korel. Katsayısı	-,099	-,059	-,097	,092
	P değeri	,346	,575	,356	,379
Parite	Korel. Katsayısı	,070	,195	,069	-,115
	P değeri	,489	,054	,497	,256

Yine menapozal durum, aktif sigara içiciliği, diyabet varlığı, RİA ve OK kullanımı ile miRNA ekspresyonunun değişip değişmediğine bakılmış ve istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edilmemiştir.

Tablo 7. Hastaların medikal durumları ile miRNA değerlerinin analizi

	miR-143-5p	miR-125a	miR-34c	miR-375
	p	p	p	p
Menapozal durum	,651	,736	,651	,848
Aktif sigara içiciliği	,734	,140	,525	,077
Diyabet varlığı	,283	,206	,343	,735
RİA kullanımı	,301	,545	,705	,933
OK kullanımı	,059	,933	,510	,986

5. TARTIŞMA

Serviks kanseri kadınlarda dördüncü sırada en sık görülen ve kanser sebebiyle ölümlerde yine dördüncü sırada yer alan jinekolojik bir malignitedir. Son yıllarda aşı ve tarama programları sayesinde ölüm oranlarında azalma sağlanmış olsa da yine de istenilen düzeye ulaşılamamıştır (209). Tarama programları servikal preinvaziv lezyonları erken aşamada tespit etmek ve tedavi etmek amacıyla geliştirilmiştir. İnvaziv karsinom gelişmeden yakalamak ve ilerlemenin önüne geçebilmek temel amaçtır. Karsinom gelişen hastalarda, hastalığın erken evresindeki hastalar için genellikle radikal histerektomi ve lenf nodu diseksiyonu veya radyoterapi kullanılır. Lokal ileri evre hastalıkta ise kemoradyoterapi kullanılmaktadır. Her ne kadar tedavi yöntemleri ve radyoterapi teknikleri gelişmiş olsa da ileri evre hastalıkta 5 yıllık sağkalım düşüktür. Gecikmiş tanı konulması ve erken tedavinin yapılmamış olması serviks kanserinin prognozuna olumsuz etki eden faktörlerdir. Bu nedenle serviks kanserinin erken teşhisi ve tedavisi hastaların sağkalımını uzatabilen temel etkindir (210). Preinvaziv lezyon tespit edilmiş hastaların hangilerinin invaziv karsinoma ilerleyeceği veya serviks kanseri gelişimi sonrası hangi hastalarda progresif seyredeceği ile ilişkili olarak bazı risk faktörleri belirlenmiş olsa da bu mekanizmayı düzenleyen temel moleküller net olarak belirlenebilmiş değildir.

Serviks kanserine neden olan en önemli neden HPV'dir. Servikal kanserlerin %99'unda HR-HPV ile enfeksiyon saptanmaktadır (6). HPV enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu genellikle bulaştan itibaren 1-2 yıl içinde spontan temizlenmekte; ancak %10-20'si persiste ederek preinvaziv lezyonlara ve invaziv kanserlere yol açmaktadır (211). Çalışmalar göstermiştir ki persistan HPV enfeksiyonu servikal neoplazi gelişiminde birincil etyolojik faktördür ve servikste intraepitelyal lezyonlardan maligniteye kadar gelişen olaylar zincirine neden olmaktadır (212). HPV enfeksiyonunun karsinogenez oluşturma mekanizması ile ilişkili olarak en belirgin etkisinin viral genomun konak genomuna entegrasyonu olduğu düşünülmektedir. Bunun sonucunda HPV'nin E2 geni bozulur ve hem viral genom hem konak genomu düzensiz hale gelir. HPV E2'nin azalması HPV E6 ve E7 genlerinin sürekli ekspres olmasına neden olur ve konak hücrede neoplastik sürecin başlamasına yol açar. E6; p53'e bağlanarak, p53'ün ubiquitin proteazom yoluyla parçalanmasını indükler, p53

bağımlı apoptozu durdurur. E7 ise pRB hipofosforilasyonu ile hücre döngüsünün kontrol noktalarından kaçmasına ve hücrede sürekli bir proliferasyon sinyali oluşmasına neden olur (63, 213). HR-HPV enfeksiyonlarının persistansı, kanser gelişimi için ana risk faktörüdür ve özellikle yüksek dereceli lezyonu olan hastalarda HPV persistansını belirleyen faktörlere dair sınırlı veri bulunmaktadır. HPV enfeksiyonu ile gelişen bütün bu sürecin erken evrelerindeki moleküllerin tespiti ile HPV ilişkili malignitelerin erken tespitinde, progresyonu öngörmeye veya tedavide kullanılıp kullanılmayacağı son yıllarda araştırma konusu olmuştur.

Servikal intraepitelyal lezyonlar ve servikal kanserde kullanılması öngörülen moleküllerden biri miRNA'lardır. miRNA'lar veya diğer adıyla ncRNA'lar protein kodlamayan küçük RNA'lar olup insan vücudunda yaygın olarak bulunurlar. Genlerin yaklaşık üçte birinde posttranslasyonel mekanizmalar ile gen ifadesini düzenlerler ve hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu, apoptozu gibi birçok mekanizmada görev alırlar (214). Ayrıca nörolojik bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve kanser gibi birçok hastalığın patogenezinde düzenleyici rol oynadıkları gösterilmiştir (215). Son yıllarda başta serviks kanseri olmak üzere HPV ile ilişkili tümörlerde miRNA'ların rolünü daha iyi anlamak için birçok çalışma yapılmıştır (216). Servikal kanser gelişen tümöral dokularda ekspresyon artışı ile etkisini gösteren onko-miR'ler ve ekspresyon kaybı ile patogeneze etki eden çok sayıda tümör supresör miRNA tespit edilmiştir (14, 124). Ancak servikal karsinogenezin olmazsa olmazı HPV persistansında miRNA'ların rolünü inceleyen az ve yetersiz sayıda çalışma bulunmaktadır. Biz de buradan yola çıkarak bu çalışma kapsamında yüksek dereceli intraepitelyal lezyonu bulunan olgularda HPV persistansı olan ve olmayan grupların miRNA düzeylerini inceledik. Ve çalışmamızda servikal kanser oluşumunda rol oynadığı düşünülen bazı miRNA'lar olan; miR-125b-5p, miR125a, miR-21-5p, miR-18a, miR-34c-3p, miR-182, miR-148b, miR-34a, miR-29a, miR-375, miR-143-5p, miR-372, miR-9-5p olmak üzere 13 adet miRNA düzeylerinin servikal smear örneklerinden ölçümünü gerçekleştirdik.

Daha önce de belirtilmiş olduğu gibi persistan HPV enfeksiyonu DNA hasarını tetikleyerek kontrolsüz hücre bölünmesine ve hücrenin apoptozdan kaçmasına neden olur. Bu noktada HPV ilişkili malignitelerde miRNA ekspresyon profillerinin

belirlenmesi özellikle HPV persistan olgularda premalign ve malign süreçler için yeni biyobelirteçlerin bulunmasına ve bireyselleştirilmiş tedavilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir (85, 217). Anormal miRNA ekspresyonu servikal kanserin de dahil olduğu birçok tümör tipinde hem onkojenik hem de tümör baskılayıcı ajanlar olarak etki etmektedir. miRNA'ların karsinogenezde kritik rolleri olduğu bildirilen birçok kanıtı rağmen anormal miRNA ekspresyonunun malign transformasyonun nedeni veya sonucu olup olmadığı halen net olarak anlaşılammıştır (218). Bazı miRNA'lar karsinogenezin tüm aşamalarında rol oynarken bazıları yüksek dereceli lezyonlardan invaziv karsinoma geçişte rol oynar (219). HR-HPV enfeksiyonu bu miRNA'ların ekspresyonlarında değişikliklere neden olarak invaziv karsinom sürecini tetikler ve progresyonunu sağlar. miRNA'lar ile yapılan çalışmalar serviks kanserinin farklı aşamalarında oldukça değişken miRNA ekspresyon değerleri olduğunu göstermektedir.

Morgan ve ark. yaptığı bir çalışmada HPV E6 ve E7 onkoproteinlerinin serin/treonin kinaz 4 (STK4) ekspresyonu ile ilişkisini tanımlamışlardır. Bu etkileşimin bir oncomiR olan miR-18a aracılığı ile gerçekleştiği gösterilmiştir. miR-18a; STK4 mRNA'nın 3'UTR'sini doğrudan hedef alarak ekspresyon artışı sağlar. Bu mekanizma HPV ilişkili servikal kanser patogenezinde görülmektedir (125). Ancak biz çalışmamızda HPV persistansı ile miR-18a arasında bir ilişki gözlemledik. Bu durum miR-18a'nın invaziv karsinom gelişimi sonrası etkinlik göstermiş olabileceği için henüz invaziv karsinom gelişmemiş örneklem grubunda anlamlı farklılık oluşturmadığı şeklinde yorumlanabilir. Huang ve arkadaşlarının yaptığı, miR-17-92 kümesinin (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-91-1) servikal SCC gelişimindeki etkisinin değerlendirildiği bir vaka kontrol çalışmasında sadece miR-20a'nın ekspresyon kaybına uğradığı bulunmuştur. miR-18a'da bir değişiklik görülmemiştir. Biz de HPV persistansı ile miR18a arasında herhangi bir ilişki saptamadık.

Direkt sekanslama yöntemiyle miR-23b, miR-143, miR-21'in tespit edildiği bir çalışmada, serviks kanseri hücrelerinde kansersiz serviks hücreleri ile karşılaştırdıklarında bu miRNA'ların kanserli hücrelerde artış gösterdiği tespit edilmiştir (220). Yapılan başka bir çalışmada miR-21 overekspresyonu ve miR-34a'nın

ekspresyonunun azalması ile servikal lezyonun şiddeti arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir. Bu miRNA'lar HSIL olan hastalarda düşük dereceli lezyonu olanlara göre büyük oranda farklı bulunmuştur (221).

miR-125b inflamasyon ve immun yanıt üzerindeki etkileri nedeniyle HPV ilişkili hastalıklarda incelenmiştir (168). Wang ve arkadaşları mikroarray verilerini kullanarak, miR-125b'nin serviks kanserinde ekspresyon kaybı gösterdiğini açıklamışlardır (13). Nuovo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise HPV-L2'nin, HPV enfekte hücrelerde miR-125b'nin inaktivasyonunu indüklediği ve koilositik sitolojik değişikliklere neden olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca miR-125b'nin in vitro bir modelde HPV enfeksiyonunun viral proliferasyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (222). Bu çalışmalar ışığında miR-125b'nin proliferasyon inhibitörü olarak kullanılabilmesi düşünülmüş olsa da biz in vivo olarak gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda HPV persistansı ile miR-125b-5p arasında herhangi bir ilişki saptamadık. Ancak yine de bu molekülün HPV ile ilişkili karsinogeneze rol oynaması muhtemeldir.

Honegger ve arkadaşlarının çalışmasında in vitro HPV onkogenleri olan E6 ve E7'nin etkisiz hale getirilmesi sonrası miR-143-3p seviyelerinin arttığı ortaya konmuştur (223). Gonzales ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada HPV pozitif kadınlarda servikal intraepitelyal neoplazinin şiddeti ile miR-143-5p düzeyleri korele bulunmuştur (224). Ancak Tepe ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre ise HSIL ve SCC gelişen hastalarda miR-143 seviyeleri downregüle olarak tespit edilmiştir (225). Her iki çalışma da hastaların fikse edilmiş patoloji örneklerinden çalışılmıştır. Yine Jin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada servikal kanser dokularında miR-143-5p seviyeleri azalmış olarak tespit edilmiştir. miR-143-5p'nin azalması ELK1 seviyesinin artmasına neden olarak servikal kanser progresyonuna katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir. ELK1 hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu, anjiogeneze etkili bir transkripsiyon faktörüdür (226). Biz de çalışmamızda HPV persistansı olan hasta grubunda miR-143-5p seviyelerini azalmış olarak saptadık.

Jayamohan ve ark yaptığı bir çalışmaya göre HR-HPV onkogenlerinin serviks kanserinde miR-375'in ekspresyonunu azaltarak servikal kanser hücrelerinde

proliferasyonu ve migrasyonu teşvik ettiği öne sürülmektedir (227). Tian ve arkadaşlarının HPV pozitif hastaların servikal sitolojik örneklerinden yaptıkları bir çalışmada HPV pozitif yüksek dereceli lezyonların tespitinde Pap smear'dan daha etkili olduğunu bulmuşlardır (228). Song ve arkadaşlarının çalışmasında ise serviks kanserli hastalarda miR-375 ekspresyonunun yüksek olması radyoterapiye daha iyi yanıtla ilişkili olarak değerlendirildi (200). Ancak biz çalışmamızda HPV persiste eden grupta miR-375 seviyelerinde artışa rastladık. Servikal intraepitelyal lezyon derecesi yükseldikçe ve karsinom geliştikçe miR-375 düzeylerinin azaldığı bulunan önceki çalışmaların aksine biz çalışmamızda miR-375'de ekspresyon artışı gözlemledik. Bu durum olgu ve kontrol grubunun her ikisinin de aynı yüksek dereceli lezyona sahip olması ve HPV persiste eden hastalarda miR-375'in enfeksiyona yanıt olarak artmış olabileceğini düşündürmüştür. Bu mekanizmayı aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır

miR-34a; p53 üzerinden etki ederek hasarlı DNA gelişiminde hücrenin apoptoza giden yolda etkisini gösterir. Birkaç çalışma miR34a'nın p53 aktivasyonu sonrasında en belirgin şekilde indüklenen miRNA olduğunu göstermiştir (229-231). miR-21 ise serviks kanserinde hücre proliferasyonunu indükler ve apoptozu önleyen bir onkomiR'dir (232). miR-34a'nın akciğer, over, kolon, pankreas gibi birçok kanser türünde azaldığı bildirilmiştir (233). Gocze ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada SCC ve AC olan servikal kanser hücrelerinde miR-34a seviyelerinde azalma olduğu ancak aktif HPV ilişkisi veya HPV persistansı ile miR-34a ekspresyon seviyesinde anlamlı bir farklılık olmadığını saptamışlardır (234). Wang ve arkadaşlarının 2019'da yaptığı bir çalışmaya göre HPV persistansı ise miR-21 düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık izlenmemiştir ancak intraepitelyal lezyonların şiddeti arttıkça miR-21 seviyelerinde aynı ölçüde artış izlenmiştir. Yine aynı çalışmaya göre servikal lezyon şiddetlendikçe miR-34a düzeyleri düşük bulunmuştur. HR-HPV enfeksiyonu ve CIN gelişimi olan hastalar arasında miR-34a düzeylerinin farklı olduğu belirtilmektedir ancak intraepitelyal lezyon gelişimi olanlardaki enfektif durum belirtilmemiştir (159). Biz çalışmamızda miR-34a ve miR-21-5p düzeylerinde hasta ve kontrol grubu arasında belirgin bir farklılık saptamadık. Bu durum örneklem grubunun tamamının HSIL lezyonu olan hastalardan oluşması nedeniyle, yüksek dereceli lezyon gelişimi

sonrası miR-34a ve miR-21-5p seviyelerinde değişiklik beklenmez şekilde yorumlanabilir.

miR-182 birçok kanserde onco-miRNA olarak rol oynamaktadır. Her ne kadar onkogeneze katkısı olsa da Tao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada serviks kanseri hücrelerinde miR-182 değerlerinin arttığı bulunmuş ancak miR-182 seviyelerinin hastalık evresi veya diğer klinik durumlarla bir ilişkisinin bulunmadığı belirlenmiştir (235). Gao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre ise miR-182'nin inhibisyonunun in vitro kanser serviks kanseri hücrelerinde proliferasyonu azalttığı, miR-182 seviyelerinin lenfatik metastaz ile pozitif korele olduğu, ancak hastalığın evresi ile ilişkisi olmadığı gösterilmiştir. Literatürde HPV persistansı ile miR-182 arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Biz de çalışmamızda HPV persistansı ile miR-182 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç saptamadık.

Literatürde miR-148b ve serviks kanseri ilişkisini araştıran sadece bir adet çalışma mevcuttur. miR-148b'nin ts-miRNA olarak etki ettiği Mou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir (184). HPV ve miR-148b'yi gösteren bir çalışma yoktur. Biz de çalışmamızda HPV persistansı ve miR-148b arasında herhangi bir ilişki olmadığını gözlemledik.

miR-29a'nın ekspresyon kaybı anjiyogenez, immun yanıtta değişiklikler ve serviks kanserinde proapoptotik sinyallerin baskılanması gibi değişikliklere neden olmaktadır (189). Zamani ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada serviks kanseri olan hastalarda mir-29a ekspresyonunun belirgin olarak azaldığı ancak HPV pozitif hastalarda belirgin farklılık oluşmadığı bulunmuştur. Servikal kanser progresyon seviyesi ile ekspresyon kaybının korele olduğu ifade edilmiştir (236). Biz de çalışmamızda HPV persistansı ile miR-29a arasında anlamlı bir ilişki saptamadık.

miR-372'nin genellikle onkojenik etki gösteriyor olmasına rağmen Tian ve ark yaptığı bir çalışmaya göre serviks kanserli hastalarda down regüle olmaktadır. İn vitro yapılan çalışmada miR-372'nin hücre büyümesini baskıladığı ve hücre döngüsünü S/G2 aşamasında durdurduğu gösterilmiştir. Bu etkisini CDK2 ve siklin A1 üzerinden gösterdiği belirlenmiştir (206). HPV ve miR-372 arasında literatürde yapılmış bir

çalışma bulunmamaktadır. Biz de çalışmamızda miR-372 ile HPV persistansı arasında anlamlı bir ilişki olmadığını belirledik.

miR-125a ile ilgili yapılmış çalışmalar, miR-125a'nın tümör süpresör bir rol üstlendiği ile ilgilidir. Fan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre servikal kanserli hücrelerde miR-125a'nın ekspresyonunda azalma olduğu saptanmıştır. Ayrıca miR-125a'nın hücre proliferasyonunu ve invazyonunu inhibe ederek hücre döngüsünü baskıladığını belirlemişlerdir. Bu etkisini STAT3'ün 3'-UTR bölgesine bağlanarak gösterdiğini tespit etmişlerdir (128). Lin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre ise yine benzer şekilde servikal kanserli hücrelerde miR-125a-5p seviyelerinin düşük olduğu ve bu durumda hücre proliferasyonunun arttığı ve apoptozun inhibe olduğu öne sürülmüştür. Etki mekanizması olarak ise Rab25 isimli molekülü hedef alarak PI3K/AKT yolağının modülasyonu yoluyla etki ettiğini gözlemlemişlerdir (213, 237). Ancak Natalia ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre ise servikal kanser hücre hatlarında miR-125a-5p ekspresyon seviyeleri yüksek olarak belirlenmiştir. HPV enfeksiyonu ile karşılaştırdıklarında ise anlamlı bir fark saptanmadığını belirtmişlerdir. Beraberinde MARK1 (microtubule affinity regulating kinase 1) ile olan etkisini değerlendirdiklerinde ise miR-125a-5p seviyeleri arttıkça MARK1 seviyesinin azaldığını gözlemlemişler ve bu durumun da miR-125a'nın karsinom progresyonunda etkisi olabileceğini düşündüklerini ifade etmişlerdir (238). Tepe ve ark yaptığı bir çalışmaya göre ise HSIL gelişen hastalarda normal hastalara göre miR-125a seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu, ancak SCC gelişen hastalarda ekspresyon seviyelerinde tekrar azalma gösterdiği belirlenmiştir (225). Dreher ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre de HPV enfeksiyonu olmayan düşük riskli HPV enfeksiyonu olan ve yüksek riskli HPV enfeksiyonu olan hastalar karşılaştırılmış, HPV tipi farketmeksizin HPV pozitif grupta negatif gruba göre miR-125a-3p'de ekspresyon artışı olduğu saptanmıştır (239). Biz de çalışmamızda persistan HPV enfeksiyonu olan grupta miR-125a ekspresyon seviyelerinde anlamlı artış olduğunu belirledik.

mir-9a hem onkomiR hem ts-miR olarak etki edebilen bir miRNA olarak belirlenmiştir (131). HPV16 pozitif LSIL hastalarında miRNA ekspresyonu Liu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre artmış saptanmış ancak HPV52 ve HPV58

ile enfekte olan servikal intraepitelyal lezyonlarda azalmış olarak bulunmuştur (172). HPV persistansı ile ilişkisi olan bir çalışma bulunmamaktadır. Biz de çalışmamızda miR-9-5p seviyelerinde HPV persiste eden ve etmeyen hastalar arasında anlamlı bir farklılık saptamadık.

6. SONUÇ

Serviks kanseri kadınlarda hala önemli bir mortalite nedenidir. Erken teşhis ve tedavi büyük önem arz etmektedir. HPV enfeksiyonunun persite etmesi malign transformasyon için en önemli risk faktörüdür. Karsinogenez sürecinde Onkojenik HPV tipleri başrol oynamakla beraber tek başına HPV varlığı karsinom gelişimi için yeterli değildir. Üstelik yüksek dereceli lezyonu olan olgularda bile hangi olguların progrese olup hangi olguların regrese olduğu net olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte miRNA'lar posttranslasyonel değişikliklerle hücre siklusunun her aşamalarında rol oynamaktadır. Bu nedenle son yıllarda miRNA'lar ve değişen ekspresyon profilleri farklı moleküler yollarla birlikte karsinogenez patofizyolojisinde önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir.

Biz de çalışmamızda HPV ile enfekte konak hücrelerdeki etkileri net olarak tanımlanamamış olan miRNA'ların mevcut kanıtlarına dayanarak miRNA ve HPV persistansı arasındaki ilişkiyi araştırdık. Servikal kanserli hücrelerde incelenmiş olan birçok miRNA olmasına rağmen servikal kanser patogenezinin olmazsa olmazı HPV persistansına etki eden miRNA'ların doğrulanmış bir paneli bulunmamaktadır. Buradan yola çıkarak bu çalışmada HSIL gelişen hastalarda HPV persistansını ve böylece hangi hastaların progresyon göstereceğini öngörebilmek amacıyla servikal sürüntü örneklerinden 13 adet miRNA düzeyini inceledik. Çalışmamızda miR-125a, miR-34c-3p, miR-375 HPV persiste eden grupta ekspresyon artışı gösterirken, miR-143-5p ise ekspresyon kaybı gösterdi. Bu sonuç bize HPV persistansını öngörmede miRNA'ların kullanılabileceğini göstermiştir. miRNA'ların gen ifadesini düzenlemede oldukça etkili olmaları, miRNA ekspresyon düzeylerinin HPV enfeksiyonunun yönetimi, tedavisi ve hastalığın progresyonu açısından prediktif değeri olabileceğini düşündürmektedir.

miRNA'ların serviks kanseri gelişiminin, hücre invazyonu, migrasyonu, göç ve metastazına kadar her aşamasında rol oynadıkları göz önünde bulundurulursa onkomiR ve ts-miR'leri içeren seçilmiş bir miRNA panelinin kullanılması preinvaziv lezyonların yönetiminde gelişmiş teşhis ve prognostik yaklaşım sağlayabilir. Elde ettiğimiz bulgular ışığında miRNA'lar karsinogenezin en önemli basamağı olan HPV

persistansını öngörmeye kullanabileceğini düşündürmüştür. miRNA tabanlı teşhis çalışmaları için daha çok çalışma ve standardizasyona ihtiyaç vardır. Ayrıca HPV enfeksiyonu, displazi gelişimi ve karsinom gelişimi olan hastalarda miRNA düzeylerini ayırt edebilmek için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. miRNA'ların yaygınlaşan ve umut vadeden uygulamaları, yakın gelecekte servikal kanser tarama yöntemleri arasında yer alan pap smear, HPV DNA ve histopatolojik değerlendirmeye kombine edilerek miRNA düzeylerinin prediktif değeri olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; anormal miRNA düzeyleri HPV persistansından, servikal preinvaziv lezyonlara, invaziv ve son olarak metastatik hastalığa ilerlemenin etkili bir göstergesi olabilir ve hatta dinamik bir prognostik faktör veya tedaviye yanıt belirteci olarak kullanılabilir.

KAYNAKÇA

1. McCluggage WG, Singh N, Gilks CB. Key changes to the World Health Organization (WHO) classification of female genital tumours introduced in the 5th edition (2020). *Histopathology*. 2022;80(5):762-78.
2. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature reviews Disease primers*. 2016;2:16086.
3. Montz FJ. Management of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and low-grade squamous intraepithelial lesion and potential complications. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2000;43(2):394-409.
4. WHO. Globocan [Online] (2020). [July 18, 2021]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>. (18.11.2023)
5. Creasman WT. Preinvasive disease of the cervix. *Clinical Gynecologic Oncology*. Philadelphia, 2007:1-5.
6. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*. 1999;189(1):12-9.
7. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 2008;110(3):S4-S7.
8. Wang X, Wang H-K, Li Y, Hafner M, Banerjee NS, Tang S, et al. microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014;111(11):4262-7.
9. Bansal A, Singh MP, Rai B. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 2016;6(2):84-9.
10. Tornesello ML, Annunziata C, Tornesello AL, Buonaguro L, Buonaguro FM. Human Oncoviruses and p53 Tumor Suppressor Pathway Deregulation at the Origin of Human Cancers. *Cancers*. 2018;10(7).

11. Felekis K, Touvana E, Stefanou C, Deltas C. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia*. 2010;14(4):236-40.
12. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2016;1(1):1-9.
13. Wang X, Tang S, Le SY, Lu R, Rader JS, Meyers C, et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PloS One*. 2008;3(7):e2557.
14. Bañuelos-Villegas EG, Pérez-yPérez MF, Alvarez-Salas LM. Cervical cancer, papillomavirus, and miRNA dysfunction. *Frontiers in Molecular Biosciences*, q2021;8:758337.
15. Jain MA, Limaïem F. Cervical Squamous Cell Carcinoma. 2020.
16. Cervical Canal. Posterior half of uterus and upper part of vagina https://en.wikipedia.org/wiki/Cervical_canal (02.01.2024).
17. Nurse Key. 24: Cervical Screening Test (T.Y.). <https://nursekey.com/24-cervical-screening-test/> (16.11.2023).
18. Prendiville W, Sankaranarayanan R. IARC Technical Publications. Colposcopy and Treatment of Cervical Precancer. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer © International Agency for Research on Cancer, 2017. For more information contact publications@iarc.fr; 2017.
19. Chang AR. 'Erosion' of the uterine cervix; an anachronism. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology*. 1991;31(4):358-62.
20. Hua X, Zeng Y, Zhang R, Wang H, Diao J, Zhang P. Using platelet-rich plasma for the treatment of symptomatic cervical ectopy. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2012;119(1):26-9.
21. Çekmez Y, Şanlıkan F, Göçmen A, Vural A, Türkmen SB. Is Cryotherapy Friend or Foe for Symptomatic Cervical Ectopy? *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*. 2016;25(1):8-11.
22. Reich O, Regauer S, McCluggage WG, Bergeron C, Redman C. Defining the Cervical Transformation Zone and Squamocolumnar Junction: Can We Reach a

- Common Colposcopic and Histologic Definition? *International journal of gynecological pathology: Official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2017;36(6):517-22.
23. Prendiville W, Sankaranarayanan R. Colposcopy and treatment of cervical precancer: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization; 2017.
 24. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Collado J, Gómez D, et al. Human papillomavirus and related diseases in Turkey. 2023.
 25. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. The male role in cervical cancer. *Salud Pública de México* 2003;45:345-53.
 26. Meites E, Gee J, Unger E, Markowitz L., et al. Human papilloma virüs. 2020.
 27. Szymonowicz KA, Chen JJCb, medicine. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. 2020;17(4):864.
 28. Lei J, Ploner A, Elfström KM, Wang J, Roth A, Fang F, et al. HPV Vaccination and the Risk of Invasive Cervical Cancer. *The New England Journal Of Medicine*. 2020;383(14):1340-8.
 29. T.C. Sağlık Bakanlığı. Serviks Kanseri Tarama Programı Ulusal Standartları. [Available from: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-taramastandartlari/listesi/serviks-kanseri-tarama-program%C4%B1-ulusal-standartlar%C4%B1.html>].
 30. Kinney WK, Manos MM, Hurley LB, Ransley JE. Where's the high-grade cervical neoplasia? The importance of minimally abnormal Papanicolaou diagnoses. *Obstetrics and gynecology*. 1998;91(6):973-6.
 31. Başara Bora B, Aygün A, Soyutun Çağlar İ, Kulali B. Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2020 Haber Bülteni. 2022.
 32. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, Zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1983; 80(12):3812-5.
 33. Hording U, Daugaard S, Junge J, Lundvall F. Human papillomaviruses and multifocal genital neoplasia. *International journal of gynecological pathology*.

- Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists.* 1996;15(3):230-4.
34. Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WG, et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *The American Journal of Pathology.* 2001;159(4):1211-8.
 35. Bonne W. Papillomavirus. 2009:603-44-2.
 36. Bhatla N, Singhal S, JBP, Obstetrics RC. Primary HPV screening for cervical cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology,* 2020;65:98-108.
 37. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 2020;40(5):602-8.
 38. Yuan Y, Cai X, Shen F, Ma FJ. HPV post-infection microenvironment and cervical cancer. *Cancer Letters,* 2021;497:243-54.
 39. Sapp M, Volpers C, Müller M, Streeck RE. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *The Journal of General Virology.* 1995;76 (Pt 9):2407-12.
 40. zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Proceedings of the Association of American Physicians.* 1999;111(6):581-7.
 41. Gupta S, Kumar P, Das BC. HPV: Molecular pathways and targets. *Current Problems In Cancer.* 2018;42(2):161-74.
 42. Petry KU. HPV and cervical cancer. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation,* 2014;74(sup244):59-62.
 43. Conway MJ, Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *Journal Of Dental Research.* 2009;88(4):307-17.
 44. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research,* 2017;772:3-12.
 45. Apt D, Watts RM, Suske G, Bernard H. High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology,* 1996;224(1):281-91.
 46. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses.* 2015;7(7):3863-90.

47. Ryndock EJ, Meyers C. *A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus?* Taylor & Francis; 2014. p. 1165-70.
48. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 2010;10(8):550-60.
49. Kim MK, Kim HS, Kim SH, Oh JM, Han JY, Lim JM, et al. Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. *Biochemical Pharmacology*. 2010;80(12):1930-5.
50. Almeida AM, Queiroz JA, Sousa F, Sousa Â. Cervical cancer and HPV infection: ongoing therapeutic research to counteract the action of E6 and E7 oncoproteins. *Drug Discovery Today*, 2019;24(10):2044-57.
51. Kranjec C, Tomaić V, Massimi P, Nicolaides L, Doorbar J, Banks L. The high-risk HPV E6 target scribble (hScrib) is required for HPV E6 expression in cervical tumour-derived cell lines. *Papillomavirus Research (Amsterdam, Netherlands)*. 2016;2:70-7.
52. DeGregori J, Kowalik T, Nevins JR. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Molecular and Cellular Biology*. 1995;15(8):4215-24.
53. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, De Sanjosé S, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *New England Journal Of Medicine*, 2002;346(15):1105-12.
54. Hogewoning CJ, Bleeker MC, van den Brule AJ, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Berkhof J, et al. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: A randomized clinical trial. *International Journal Of Cancer*, 2003;107(5):811-6.
55. Johnson CA, James D, Marzan A, Armaos M. Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. *Seminars In Oncology Nursing*. 2019;35(2):166-74.
56. Ruiz Á M, Ruiz JE, Gavilanes AV, Eriksson T, Lehtinen M, Pérez G, et al. Proximity of first sexual intercourse to menarche and risk of high-grade cervical disease. *The Journal Of Infectious Diseases*. 2012;206(12):1887-96.
57. Frumovitz M, Sun CC, Schover LR, Munsell MF, Jhingran A, Wharton JT, et al. Quality of life and sexual functioning in cervical cancer survivors. *Journal of*

- clinical oncology. *Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(30):7428-36.
58. Vesco KK, Whitlock EP, Eder M, Burda BU, Senger CA, Lutz K. Risk factors and other epidemiologic considerations for cervical cancer screening: a narrative review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals Of Internal Medicine*. 2011;155(10):698-705, w216.
 59. Collins S, Rollason TP, Young LS, Woodman CB. Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: a longitudinal study. *European Journal Of Cancer (Oxford, England: 1990)*. 2010;46(2):405-11.
 60. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P, Bosch FX, et al. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case--control study. *Cancer Causes & Control: CCC*. 2003;14(9):805-14.
 61. Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z, Icenogle J, Reeves WC, Kaufman RH. Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *American Journal Of Obstetrics and Gynecology*. 2000;182(2):257-64.
 62. Calore EE, Pereira SM, Cavaliere MJ. Progression of cervical lesions in HIV-seropositive women: A cytological study. *Diagnostic Cytopathology*. 2001; 24(2):117-9.
 63. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: A longitudinal cohort study. *The Lancet*, 2001;357(9271):1831-6.
 64. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 1:16-22.
 65. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(11):1808-16.
 66. Sawaya GF, McConnell KJ, Kulasingam SL, Lawson HW, Kerlikowske K, Melnikow J, et al. Risk of cervical cancer associated with extending the interval

- between cervical-cancer screenings. *The New England Journal of Medicine*. 2003;349(16):1501-9.
67. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews In Medical Virology*. 2015;25 Suppl 1(Suppl Suppl 1):2-23.
 68. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Jama*, 2001;286(24):3106-14.
 69. García-Closas R, Castellsagué X, Bosch X, González CAJljoc. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: A review of recent evidence. *International Journal of Cancer*, 2005;117(4):629-37.
 70. Smith JS, Bosetti C, Muñoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: A pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *International Journal Of Cancer*, 2004; 111(3):431-9.
 71. Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology*. 2011;414(2):153-63.
 72. Kim K, Lambert PF. E1 protein of bovine papillomavirus 1 is not required for the maintenance of viral plasmid DNA replication. *Virology*. 2002;293(1):10-4.
 73. Syrjänen SM, Syrjänen KJ. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Annals of Medicine*. 1999;31(3):175-87.
 74. Chipuk JE, Green DR. Cytoplasmic p53: bax and forward. *Cell Cycle (Georgetown, Tex)*. 2004;3(4):429-31.
 75. Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. 1999;18(53):7690-700.
 76. Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(11):2006-11.
 77. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(5):342-50.

78. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003;16(1):1-17.
79. Yoshinouchi M, Hongo A, Nakamura K, Kodama J, Itoh S, Sakai H, et al. Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. *Journal Of Clinical Microbiology*. 1999; 37(11):3514-7.
80. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *Journal Of Virology*. 1991;65(1):473-8.
81. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(3):252-8.
82. Pol SBV, Klingelutz A. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*,2013;445(1-2):115-37.
83. Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, 2013;445(1-2):138-68.
84. Nicolaides L, Davy C, Raj K, Kranjec C, Banks L, Doorbar J. Stabilization of HPV16 E6 protein by PDZ proteins, and potential implications for genome maintenance. *Virology*. 2011;414(2):137-45.
85. Gao C, Zhou C, Zhuang J, Liu L, Liu C, Li H, et al. MicroRNA expression in cervical cancer: Novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Journal Of Cellular Biochemistry*. 2018;119(8):7080-90.
86. Williams J. *On cancer of the uterus: Being the Harveian Lectures for 1886*: HK Lewis; 1888.
87. Cullen TS. *Cancer of the uterus: its pathology, symptomatology, diagnosis, and treatment*: Appleton; 1900.
88. Richart RM. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 1967;10(4):748-84.
89. Broders AC. Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. *Journal of the American Medical Association*, 1932;99(20):1670-4.
90. Reagan JW, Hicks DJ. A study of in situ and squamous-cell cancer of the uterine cervix. *Cancer*. 1953;6(6):1200-14.

91. Shiraz A, Crawford R, Egawa N, Griffin H, Doorbar J. The early detection of cervical cancer. The current and changing landscape of cervical disease detection. *Cytopathology. Official journal of the British Society for Clinical Cytology*. 2020;31(4):258-70.
92. Doorbar J, Griffin H. Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. *Papillomavirus Research (Amsterdam, Netherlands)*. 2019; 7: 176-9.
93. Papillomaviruses H. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. France: IARC 2011.
94. Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *International Journal Of Gynecological Pathology : Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2013;32(1):76-115.
95. Wright TC. Chapter 3 Pathology of HPV infection at the cytologic and histologic levels: Basis for a 2-tiered morphologic classification system. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of The International Federation Of Gynaecology And Obstetrics*. 2006;94 Suppl 1:S22-s31.
96. Cheung LC, Egemen D, Chen X, Katki HA, Demarco M, Wisner AL, et al. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines: Methods for Risk Estimation, Recommended Management, and Validation. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2020;24(2):90-101.
97. Khatib G VM. Servikal preinvaziv lezyonlar: Anormal histoloji yönetimi. . Endometriyum ve Over 1 Baskı Ankara: Türkiye Klinikleri; . 2021. p.55-62.;Demirkıran F, editör. *Jinekolojide Preinvaziv Lezyonların Tanı ve Yönetimi: Vulva, Serviks, .*
98. Bansal N, Wright JD, Cohen CJ, Herzog TJ. Natural history of established low grade cervical intraepithelial (CIN 1) lesions. *Anticancer research*. 2008; 28(3b):1763-6.

99. Tainio K, Athanasiou A, Tikkinen KAO, Aaltonen R, Cárdenas J, Hernández, et al. Clinical course of untreated cervical intraepithelial neoplasia grade 2 under active surveillance: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed)*. 2018;360:k499.
100. McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: A retrospective cohort study. *The Lancet Oncology*. 2008;9(5):425-34.
101. Ostör AG, Pagano R, Davoren RA, Fortune DW, Chanen W, Rome R. Adenocarcinoma in situ of the cervix. *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of The International Society of Gynecological Pathologists*. 1984;3(2):179-90.
102. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky NJ. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 2008;455(7209):58-63.
103. Satoh J. MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: aberrant microRNA expression in Alzheimer's disease brains. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2010;114(3):269-75.
104. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, 2008;9(2):102-14.
105. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 2006;125(5):887-901.
106. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007;448(7149):83-6.
107. Friedländer MR, Lizano E, Houben AJ, Bezdan D, Báñez-Coronel M, Kudla G, et al. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biology*. 2014;15(4):R57.
108. de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, Arner E, Arner P, Ashoor H, et al. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*. 2017;35(9):872-8.

109. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004;303(5654):95-8.
110. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends in Genetics*, 2007;23(5):243-9.
111. Santos JMO, Gil da Costa RM, Medeiros R. Dysregulation of cellular microRNAs by human oncogenic viruses - Implications for tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms*. 2018; 1861(2): 95-105.
112. Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes & Development*. 2008;22(20):2773-85.
113. Hayder H, O'Brien J, Nadeem U, Peng C. MicroRNAs: crucial regulators of placental development. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2018; 155(6): R259-r71.
114. Pereira P, Queiroz JA, Figueiras A, Sousa F. Current progress on microRNAs-based therapeutics in neurodegenerative diseases. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2017;8(3):e1409.
115. Sheinerman KS, Umansky SRJFicn. Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2013;7:150.
116. Esquela-Kerscher A, Slack F. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2006;6(4):259-69.
117. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Molecular Medicine*. 2012;4(3):143-59.
118. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of The American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(34):5848-56.
119. Zhou W, Su L, Duan X, Chen X, Hays A, Upadhyayula S, et al. MicroRNA-21 down-regulates inflammation and inhibits periodontitis. *Molecular Immunology*, 2018;101:608-14.

120. Chandan K, Gupta M, Sarwat M. Role of host and pathogen-derived microRNAs in immune regulation during infectious and inflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, 2020;10:502685.
121. Hussein M, Magdy R. MicroRNAs in central nervous system disorders: current advances in pathogenesis and treatment. *Frontiers in Immunology*, 2021; 57(1): 36.
122. Salvi V, Gianello V, Tiberio L, Sozzani S, Bosisio D. Cytokine targeting by miRNAs in autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, 2019;10:435194.
123. Wei Q, Li YX, Liu M, Li X, Tang H. MiR-17-5p targets TP53INP1 and regulates cell proliferation and apoptosis of cervical cancer cells. *IUBMB Life*, 2012; 64(8):697-704.
124. Ali Syeda Z, Langden SSS, Munkhzul C, Lee M, Song S. Regulatory mechanism of MicroRNA expression in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020;21(5):1723.
125. Morgan EL, Patterson MR, Ryder EL, Lee SY, Wasson CW, Harper KL, et al. MicroRNA-18a targeting of the STK4/MST1 tumour suppressor is necessary for transformation in HPV positive cervical cancer. *PLoS Pathogens*, 2020;16(6):e1008624.
126. Fu K, Zhang L, Liu R, Shi Q, Li X, Wang M. MiR-125 inhibited cervical cancer progression by regulating VEGF and PI3K/AKT signaling pathway. *World Journal Of Surgical Oncology*. 2020;18(1):115.
127. Cui F, Li X, Zhu X, Huang L, Huang Y, Mao C, et al. MiR-125b inhibits tumor growth and promotes apoptosis of cervical cancer cells by targeting phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit delta. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2012;30(5):1310-8.
128. Fan Z, Cui H, Xu X, Lin Z, Zhang X, Kang L, et al. MiR-125a suppresses tumor growth, invasion and metastasis in cervical cancer by targeting STAT3. *Oncotarget*, 2015;6(28):25266.
129. Farzanehpour M, Mozhgani SH, Jalilvand S, Faghihloo E, Akhavan S, Salimi V, et al. Serum and tissue miRNAs: Potential biomarkers for the diagnosis of cervical cancer. *Virology Journal*. 2019;16(1):116.

130. Jung HM, Phillips BL, Chan EK. miR-375 activates p21 and suppresses telomerase activity by coordinately regulating HPV E6/E7, E6AP, CIP2A, and 14-3-3 ζ . *Molecular Cancer*, 2014;13:1-16.
131. Babion I, Jaspers A, van Splunter AP, van der Hoorn IAE, Wilting SM, Steenbergen RDM. miR-9-5p Exerts a Dual Role in Cervical Cancer and Targets Transcription Factor TWIST1. *Cells*. 2019;9(1).
132. Girardi E, López P, Pfeffer S. On the Importance of Host MicroRNAs During Viral Infection. *Frontiers In Genetics*. 2018;9:439.
133. Zheng ZM, Wang X. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. *Biochimica et biophysica acta. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2011;1809(11-12):668-77.
134. Gocze K, Gombos K, Kovacs K, Juhasz K, Gocze P, Kiss I. MicroRNA expressions in HPV-induced cervical dysplasia and cancer. *Anticancer Research*. 2015;35(1):523-30.
135. Wang X, Wang HK, McCoy JP, Banerjee NS, Rader JS, Broker TR, et al. Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6. *RNA (New York, NY)*. 2009;15(4):637-47.
136. Au Yeung CL, Tsang TY, Yau PL, Kwok TT. Human papillomavirus type 16 E6 induces cervical cancer cell migration through the p53/microRNA-23b/urokinase-type plasminogen activator pathway. *Oncogene*. 2011; 30(21): 2401-10.
137. Wang X, Meyers C, Guo M, Zheng ZM. Upregulation of p18Ink4c expression by oncogenic HPV E6 via p53-miR-34a pathway. *International Journal of Cancer*. 2011;129(6):1362-72.
138. Ribeiro J, Marinho-Dias J, Monteiro P, Loureiro J, Baldaque I, Medeiros R, et al. miR-34a and miR-125b Expression in HPV Infection and Cervical Cancer Development. *BioMed Research International*. 2015;2015:304584.
139. Liu S, Song L, Yao H, Zhang L, Xu D, Gao F, et al. MiR-375 Is Epigenetically Downregulated by HPV-16 E6 Mediated DNMT1 Upregulation and Modulates EMT of Cervical Cancer Cells by Suppressing lncRNA MALAT1. *PloS One*. 2016;11(9):e0163460.

140. Morel A, Baguet A, Perrard J, Demeret C, Jacquin E, Guenat D, et al. 5azadC treatment upregulates miR-375 level and represses HPV16 E6 expression. *Oncotarget*. 2017;8(28):46163-76.
141. Snoek BC, Babion I, Koppers-Lalic D, Pegtel DM, Steenbergen RD. Altered microRNA processing proteins in HPV-induced cancers. *Current Opinion in Virology*. 2019;39:23-32.
142. Scotto L, Narayan G, Nandula SV, Subramaniyam S, Kaufmann AM, Wright JD, et al. Integrative genomics analysis of chromosome 5p gain in cervical cancer reveals target over-expressed genes, including Drosha. *Molecular Cancer*. 2008;7:58.
143. Thomas LK, Bermejo JL, Vinokurova S, Jensen K, Bierkens M, Steenbergen R, et al. Chromosomal gains and losses in human papillomavirus-associated neoplasia of the lower genital tract - a systematic review and meta-analysis. *European Journal Of Cancer (Oxford, England: 1990)*. 2014;50(1):85-98.
144. Muralidhar B, Winder D, Murray M, Palmer R, Barbosa-Morais N, Saini H, et al. Functional evidence that Drosha overexpression in cervical squamous cell carcinoma affects cell phenotype and microRNA profiles. *The Journal of Pathology*, 2011;224(4):496-507.
145. Liu F, Zhang S, Zhao Z, Mao X, Huang J, Wu Z, et al. MicroRNA-27b up-regulated by human papillomavirus 16 E7 promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting polo-like kinase2 in cervical cancer. *Oncotarget*. 2016; 7(15):19666-79.
146. Norouzi S, Farhadi A, Farzadfard E, Akbarzade-Jahromi M, Ahmadzadeh N, Nasiri M, et al. MicroRNAs expression changes coincide with low or high grade of squamous intraepithelial lesion infected by HPV-16. *Gene Reports*, 2021;23:101186.
147. Tornesello ML, Faraonio R, Buonaguro L, Annunziata C, Starita N, Cerasuolo A, et al. The Role of microRNAs, Long Non-coding RNAs, and Circular RNAs in Cervical Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2020;10:150.
148. Hussen BM, Hidayat HJ, Salihi A, Sabir DK, Taheri M, Ghafouri-Fard S, et al. MicroRNA: A signature for cancer progression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021;138:111528.

149. Wang Y, Ru J, Meng X, Song J, Jiang Q, Li S, et al. Role of SNPs in the Biogenesis of Mature miRNAs. *BioMed Research International*, 2021;2021.
150. Yang J, Yan Z, Wang Y, Xu J, Li R, Li C, et al. Association study of relationships of polymorphisms in the miR-21, miR-26b, miR-221/222 and miR-126 genes with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *BMC Cancer*. 2021;21(1):997.
151. Huang J, Ni S, Tang R. A functional polymorphism in the promoter of miR-17-92 is associated with a reduced risk of cervical squamous cell carcinoma. *Reproductive Sciences*, 2020;27:87-92.
152. Hu H, Shu M, He L, Yu X, Liu X, Lu Y, et al. Epigenomic landscape of 5-hydroxymethylcytosine reveals its transcriptional regulation of lncRNAs in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2017;116(5):658-68.
153. Lu Q, Ma D, Zhao S. DNA methylation changes in cervical cancers. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)*. 2012;863:155-76.
154. Coleman WB, Tsongalis GJ. The molecular basis of human cancer: Springer Science & Business Media; 2001.
155. Kan YY, Liou YL, Wang HJ, Chen CY, Sung LC, Chang CF, et al. PAX1 methylation as a potential biomarker for cervical cancer screening. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2014;24(5):928-34.
156. Liz J, Esteller M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2016;1859(1):169-76.
157. Yao T, Rao Q, Liu L, Zheng C, Xie Q, Liang J, et al. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in cervical cancer. *Virology Journal*. 2013;10:175.
158. Khan SA, Reddy D, Gupta S. Global histone post-translational modifications and cancer: Biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment? *World journal of Biological Chemistry*. 2015;6(4):333-45.
159. Wang JY, Chen LJ. The role of miRNAs in the invasion and metastasis of cervical cancer. *Bioscience Reports*. 2019;39(3).

160. Liang H, Zhao Y, Pi J, Luo R. MiR-875-5p suppresses cervical cancer cell proliferation and metastasis via negative regulation of EGFR. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2021;20(5):939-46.
161. Lei C, Wang Y, Huang Y, Yu H, Huang Y, Wu L, et al. Up-regulated miR155 reverses the epithelial-mesenchymal transition induced by EGF and increases chemo-sensitivity to cisplatin in human Caski cervical cancer cells. *PLoS One*, 2012;7(12):e52310.
162. O'Connell RM, Zhao JL, Rao DS. MicroRNA function in myeloid biology. *Blood*. 2011;118(11):2960-9.
163. Pedroza-Torres A, Fernández-Retana J, Peralta-Zaragoza O, Jacobo-Herrera N, Cantú de Leon D, Cerna-Cortés JF, et al. A microRNA expression signature for clinical response in locally advanced cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. 2016;142(3):557-65.
164. Chaudhuri AA, So AY, Mehta A, Minisandram A, Sinha N, Jonsson VD, et al. Oncomir miR-125b regulates hematopoiesis by targeting the gene Lin28A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(11):4233-8.
165. Zhao A, Zeng Q, Xie X, Zhou J, Yue W, Li Y, et al. MicroRNA-125b induces cancer cell apoptosis through suppression of Bcl-2 expression. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*. 2012;39(1):29-35.
166. Suman S, Mishra A, Kulshrestha A. A systems approach for the elucidation of crucial genes and network constituents of cervical intraepithelial neoplasia 1 (CIN1). *Molecular Bio Systems*. 2017;13(3):549-55.
167. Hu T, Zhang Q, Gao L. LncRNA CAR10 Upregulates PDPK1 to Promote Cervical Cancer Development by Sponging miR-125b-5p. *BioMed Research International*. 2020;2020:4351671.
168. Zeng CW, Zhang XJ, Lin KY, Ye H, Feng SY, Zhang H, et al. Camptothecin induces apoptosis in cancer cells via microRNA-125b-mediated mitochondrial pathways. *Molecular Pharmacology*. 2012;81(4):578-86.
169. Kong F, Sun C, Wang Z, Han L, Weng D, Lu Y, et al. miR-125b confers resistance of ovarian cancer cells to cisplatin by targeting pro-apoptotic Bcl-2

- antagonist killer 1. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 2011;31:543-9.
170. Qin X, Wan Y, Wang S, Xue M. MicroRNA-125a-5p modulates human cervical carcinoma proliferation and migration by targeting ABL2. *Drug Design, Development And Therapy*. 2016;10:71-9.
 171. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biology*. 2011;8(5):706-13.
 172. Liu M, Wang W, Chen H, Lu Y, Yuan D, Deng Y, et al. miR-9, miR-21, miR-27b, and miR-34a Expression in HPV16/58/52-Infected Cervical Cancer. *BioMed Research International*. 2020;2020:2474235.
 173. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008;27(15):2128-36.
 174. Bumrunghai S, Ekalaksananan T, Evans MF, Chopjitt P, Tangsiriwatthana T, Patarapadungkit N, et al. Up-Regulation of miR-21 Is Associated with Cervicitis and Human Papillomavirus Infection in Cervical Tissues. *PloS One*. 2015; 10(5): e0127109.
 175. Liu S, Pan X, Yang Q, Wen L, Jiang Y, Zhao Y, et al. MicroRNA-18a enhances the radiosensitivity of cervical cancer cells by promoting radiation-induced apoptosis. *Oncology Reports*. 2015;33(6):2853-62.
 176. Navarro F, Lieberman J. miR-34 and p53: New Insights into a Complex Functional Relationship. *PloS One*. 2015;10(7):e0132767.
 177. López JA, Alvarez-Salas LM. Differential effects of miR-34c-3p and miR-34c-5p on SiHa cells proliferation apoptosis, migration and invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011;409(3):513-9.
 178. Córdova-Rivas S, Fraire-Soto I, Mercado-Casas Torres A, Servín-González LS, Granados-López AJ, López-Hernández Y, et al. 5p and 3p Strands of miR-34 Family Members Have Differential Effects in Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Cervical Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3).

179. Pang RT, Leung CO, Ye TM, Liu W, Chiu PC, Lam KK, et al. MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2010;31(6):1037-44.
180. Zhang QH, Sun HM, Zheng RZ, Li YC, Zhang Q, Cheng P, et al. Meta-analysis of microRNA-183 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with noncancerous tissues. *Gene*. 2013;527(1):26-32.
181. Madrigal T, Ortega-Bernal D, Herrera LA, González-De la Rosa CH, Domínguez-Gómez G, Aréchaga-Ocampo E, et al. Mutant p53 Gain-of-Function Induces Migration and Invasion through Overexpression of miR-182-5p in Cancer Cells. *Cells*, 2023;12(20):2506.
182. Yu J, Shen W, Gao B, Zhao H, Xu J, Gong B. MicroRNA-182 targets FOXF2 to promote the development of triple-negative breast cancer. *Neoplasma*. 2017;64(2):209-15.
183. Xiao Y, Huang W, Huang H, Wang L, Wang M, Zhang T, et al. miR-182-5p and miR-96-5p Target PIAS1 and Mediate the Negative Feedback Regulatory Loop between PIAS1 and STAT3 in Endometrial Cancer. *DNA and Cell Biology*. 2021;40(4):618-28.
184. Mou Z, Xu X, Dong M, Xu J. MicroRNA-148b Acts as a Tumor Suppressor in Cervical Cancer by Inducing G1/S-Phase Cell Cycle Arrest and Apoptosis in a Caspase-3-Dependent Manner. *Medical Science Monitor: International Medical Journal Of Experimental And Clinical Research*. 2016;22:2809-15.
185. Li BL, Lu W, Qu JJ, Ye L, Du GQ, Wan XP. Loss of exosomal miR-148b from cancer-associated fibroblasts promotes endometrial cancer cell invasion and cancer metastasis. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(3):2943-53.
186. Zhang R, Su J, Xue SL, Yang H, Ju LL, Ji Y, et al. HPV E6/p53 mediated down-regulation of miR-34a inhibits Warburg effect through targeting LDHA in cervical cancer. *American Journal Of Cancer Research*. 2016;6(2):312-20.
187. Li B, Guo X, Li N, Chen Q, Shen J, Huang X, et al. WNT1, a target of miR-34a, promotes cervical squamous cell carcinoma proliferation and invasion by induction of an E-P cadherin switch via the WNT/ β -catenin pathway. *Cellular Oncology (Dordrecht)*. 2020;43(3):489-503.

188. Wang Y, Dakhlallah D, Moldovan L, Anderson T, Ezzie M, Nana-Sinkam SP, et al. *Circulating MicroRNAs as Biomarkers*. MicroRNA in Regenerative Medicine: Elsevier; 2015. p. 1093-125.
189. Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N, Yoshino H, Itesako T, Fujimura L, et al. Tumor-suppressive microRNA-29a inhibits cancer cell migration and invasion via targeting HSP47 in cervical squamous cell carcinoma. *International Journal Of Oncology*. 2013;43(6):1855-63.
190. Zamani S, Sohrabi A, Hosseini SM, Rahnamaye-Farzami M, Akbari A. Deregulation of miR-21 and miR-29a in Cervical Cancer Related to HPV Infection. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*. 2019;8(2):110-5.
191. Li Y, Wang F, Xu J, Ye F, Shen Y, Zhou J, et al. Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29. *The Journal of Pathology*. 2011;224(4):484-95.
192. Nan P, Niu Y, Wang X, Li Q. MiR-29a function as tumor suppressor in cervical cancer by targeting SIRT1 and predict patient prognosis. *OncoTargets and Therapy*. 2019;12:6917-25.
193. Wang A, Xu Q, Sha R, Bao T, Xi X, Guo G. MicroRNA-29a inhibits cell proliferation and arrests cell cycle by modulating p16 methylation in cervical cancer. *Oncology Letters*. 2021;21(4):272.
194. Gong Y, Wan JH, Zou W, Lian GY, Qin JL, Wang QM. MiR-29a inhibits invasion and metastasis of cervical cancer via modulating methylation of tumor suppressor SOCS1. *Future oncology (London, England)*. 2019;15(15):1729-44.
195. Tsukamoto Y, Nakada C, Noguchi T, Tanigawa M, Nguyen LT, Uchida T, et al. MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. *Cancer Research*. 2010;70(6):2339-49.
196. Liu AM, Poon RT, Luk JM. MicroRNA-375 targets Hippo-signaling effector YAP in liver cancer and inhibits tumor properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;394(3):623-7.
197. Lajer CB, Garnæs E, Friis-Hansen L, Norrild B, Therkildsen MH, Glud M, et al. The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers:

- bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer. *British Journal of Cancer*. 2012;106(9):1526-34.
198. Wang F, Li Y, Zhou J, Xu J, Peng C, Ye F, et al. miR-375 is down-regulated in squamous cervical cancer and inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor SP1. *The American Journal of Pathology*. 2011; 179(5): 2580-8.
 199. Shen Y, Zhou J, Li Y, Ye F, Wan X, Lu W, et al. miR-375 mediated acquired chemo-resistance in cervical cancer by facilitating EMT. *PloS One*. 2014; 9(10): e109299.
 200. Song L, Liu S, Zeng S, Zhang L, Li X. miR-375 Modulates Radiosensitivity of HR-HPV-Positive Cervical Cancer Cells by Targeting UBE3A through the p53 Pathway. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2015;21:2210-7.
 201. Varghese VK, Shukla V, Jishnu PV, Kabekkodu SP, Pandey D, Sharan K, et al. Characterizing methylation regulated miRNA in carcinoma of the human uterine cervix. *Life Sciences*. 2019;232:116668.
 202. Liu L, Yu X, Guo X, Tian Z, Su M, Long Y, et al. miR-143 is downregulated in cervical cancer and promotes apoptosis and inhibits tumor formation by targeting Bcl-2. *Molecular Medicine Reports*. 2012;5(3):753-60.
 203. Zhao Y, Liu X, Lu YX. MicroRNA-143 regulates the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells by targeting HIF-1 α . *European Review For Medical and Pharmacological Sciences*. 2017;21(24):5580-6.
 204. Chen Y, Ma C, Zhang W, Chen Z, Ma L. Down regulation of miR-143 is related with tumor size, lymph node metastasis and HPV16 infection in cervical squamous cancer. *Diagnostic Pathology*. 2014;9:88.
 205. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*. 2006;124(6):1169-81.
 206. Tian RQ, Wang XH, Hou LJ, Jia WH, Yang Q, Li YX, et al. MicroRNA-372 is down-regulated and targets cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) and cyclin A1 in human cervical cancer, which may contribute to tumorigenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(29):25556-63.

207. Nowek K, Wiemer EAC, Jongen-Lavrencic M. The versatile nature of miR-9/9(*) in human cancer. *Oncotarget*. 2018;9(29):20838-54.
208. Pardini B, De Maria D, Francavilla A, Di Gaetano C, Ronco G, Naccarati A. MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: A systematic review. *BMC Cancer*. 2018;18(1):696.
209. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*. 2021;71(3):209-49.
210. Gao F, Yin J, Wang Y, Li H, Wang D. miR-182 promotes cervical cancer progression via activating the Wnt/ β -catenin axis. *American Journal Of Cancer Research*. 2023;13(8):3591-8.
211. Araldi RP, Assaf SMR, Carvalho RF, Carvalho M, Souza JM, Magnelli RF, et al. Papillomaviruses: a systematic review. *Genetics and Molecular Biology*. 2017;40(1):1-21.
212. Zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology*. 2009;392(1):1-10.
213. Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. *International Journal of Molecular Medicine*. 2007;20(5):731-41.
214. Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. *Science (New York, NY)*. 2003;299(5612):1540.
215. Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, Bushell M. microRNAs in cancer management. *The Lancet Oncology*. 2012;13(6):e249-58.
216. Lee JW, Choi CH, Choi JJ, Park YA, Kim SJ, Hwang SY, et al. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association For Cancer Research*. 2008; 14(9): 2535-42.
217. Xin F, Liu P, Ma CF. A circulating serum miRNA panel as early detection biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia. *European Review For Medical and Pharmacological Sciences*. 2016;20(23):4846-51.

218. Izzotti A. MicroRNA from Small Oligonucleotides to Giant Players of Biological Processes and Diseases. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*. 2019;8(1):2-3.
219. Wilting SM, Snijders PJ, Verlaat W, Jaspers A, van de Wiel MA, van Wieringen WN, et al. Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis. *Oncogene*. 2013;32(1):106-16.
220. Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Research*. 2007;67(13):6031-43.
221. Wang H, Zhang D, Chen Q, Hong Y. Plasma expression of miRNA-21, -214, -34a, and -200a in patients with persistent HPV infection and cervical lesions. *BMC Cancer*. 2019;19(1):986.
222. Nuovo GJ, Wu X, Volinia S, Yan F, di Leva G, Chin N, et al. Strong inverse correlation between microRNA-125b and human papillomavirus DNA in productive infection. *Diagnostic Molecular Pathology : The American Journal Of Surgical Pathology, Part B*. 2010;19(3):135-43.
223. Honegger A, Schilling D, Bastian S, Sponagel J, Kuryshev V, Sülthmann H, et al. Dependence of intracellular and exosomal microRNAs on viral E6/E7 oncogene expression in HPV-positive tumor cells. *PLoS Pathogens*. 2015; 11(3): e1004712.
224. González-Ramírez MI, Cardona YT, Agudelo MC, López C, Florez-Acosta JJ, Agudelo-Gamboa S, et al. miRNAs signature as potential biomarkers for cervical precancerous lesions in human papillomavirus positive women. *Scientific Reports*, 2023;13(1):9822.
225. Tepe NB, Bozgeyik E, Bozdog Z, Balat O, Ozcan HC, Ugur MG. Identification of autophagy-associated miRNA signature for the cervical squamous cell cancer and high-grade cervical intraepithelial lesions. *Reproductive Biology*, 2021; 21(3):100536.
226. Jin X, Chen X, Hu Y, Ying F, Zou R, Lin F, et al. LncRNA-TCONS_00026907 is involved in the progression and prognosis of cervical cancer through inhibiting miR-143-5p. *Cancer Medicine*. 2017;6(6):1409-23.
227. Jayamohan S, Kannan M, Moorthy RK, Rajasekaran N, Jung HS, Shin YK, et al. Dysregulation of miR-375/AEG-1 Axis by Human Papillomavirus 16/18-

- E6/E7 Promotes Cellular Proliferation, Migration, and Invasion in Cervical Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2019;9:847.
228. Tian Q, Li Y, Wang F, Li Y, Xu J, Shen Y, et al. MicroRNA detection in cervical exfoliated cells as a triage for human papillomavirus–positive women. *Journal of the National Cancer Institute*, 2014;106(9):dju241.
229. Hermeking H. MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(9):613-26.
230. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007; 447(7148): 1130-4.
231. He X, He L, Hannon GJ. The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Research*. 2007;67(23):11099-101.
232. Peralta-Zaragoza O, Deas J, Meneses-Acosta A, De la O-Gómez F, Fernández-Tilapa G, Gómez-Cerón C, et al. Relevance of miR-21 in regulation of tumor suppressor gene PTEN in human cervical cancer cells. *BMC Cancer*, 2016;16:1-16.
233. Vogt M, Munding J, Grüner M, Liffers ST, Verdoodt B, Hauk J, et al. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas. *Virchows Archiv: An International Journal Of Pathology*. 2011;458(3):313-22.
234. Gocze K, Gombos K, Juhasz K, Kovacs K, Kajtar B, Benczik M, et al. Unique microRNA expression profiles in cervical cancer. *Anticancer Research*. 2013; 33(6):2561-7.
235. Tang T, Wong HK, Gu W, Yu MY, To KF, Wang CC, et al. MicroRNA-182 plays an onco-miRNA role in cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. 2013; 129(1):199-208.
236. Zamani S, Hosseini SM, Sohrabi A. miR-21 and miR29-a: Potential Molecular Biomarkers for HPV Genotypes and Cervical Cancer Detection. *MicroRNA (Shariqah, United Arab Emirates)*. 2020;9(4):271-5.

237. Lin H, Chen C. Suppressive effect of Hsa-miR-125a-5p on cervical cancer proliferation and invasion via regulation of Rab25-PI3K/AKT pathway. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2023;22(2):221-7.
238. Natalia MA, Alejandro GT, Virginia TV, Alvarez-Salas LM. MARK1 is a novel target for miR-125a-5p: Implications for cell migration in cervical tumor cells. *MicroRNA*, 2018;7(1):54-61.
239. Dreher A, Rossing M, Kaczkowski B, Andersen DK, Larsen TJ, Christophersen MK, et al. Differential expression of cellular microRNAs in HPV 11,-16, and-45 transfected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011;412(1):20-5.