



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SERVİKAL KANSERDE SERVİKOVAJİNAL SIVIDAKİ
BİYOLOJİK BELİRTEÇLER KULLANILARAK YENİ ERKEN
TANI YÖNTEMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

BÜŞRA KÖSE
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İSTANBUL-2023



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SERVİKAL KANSERDE SERVİKOVAJİNAL SIVIDAKİ
BİYOLOJİK BELİRTEÇLER KULLANILARAK YENİ ERKEN
TANI YÖNTEMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

BÜŞRA KÖSE
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İSTANBUL-2023

Anabilim Dalı: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji
Program: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Doktora Programı
Tez Başlığı: Servikal Kanserde Servikovajinal Sıvıdaki Biyolojik
Belirteçler Kullanılarak Yeni Erken Tanı
Yöntemlerinin Araştırılması
Öğrencinin Adı-Soyadı: Büşra Köse
Savunma Sınavı Tarihi: / /

Bu tez çalışması jürimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye (Tez Danışmanı) Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal
Acıbadem Mehmet Ali
Aydınlr Üniversitesi
Üye
Üye
Üye

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

28.07.2023

Büşra Köse

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile danışmanım olarak bana yol gösterici ve cesaretlendirici olan, tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal'a,

Çalışmamın pek çok aşamada her daim destek veren kıymetli hocam Prof. Dr. Muhittin Serdar'a,

Lisansüstü eğitimimde büyük emeği geçen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın çok değerli Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Aysel Özpınar'a ve Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Klinik sahadaki destekleri sayesinde tez çalışmalarımı yapabildiğim, fikirlerime değer verip bana güvenlerini sunan ve yıllarca beraber çalışmış olmaktan gurur duyduğum, okulumuz Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalından hocalarımız, kıymetli hekimlerimiz Doç. Dr. Özgüç Takmaz, Prof. Dr. Mete Güngör ve Prof. Dr. Serkan Erkanlı'ya ve asistanları, hemşireleri ve hastanelerin laboratuvar ekiplerine,

Doktora eğitimim boyunca manevi desteğini her daim gösteren ve benimle beraber kader ortaklığı yapan sevgili arkadaşlarım Ayşegül Yanık İlgar ile Demet Açıkgöz'e ve en zor zamanlarda hep manevi desteğini gösteren ve her şartta benimle gurur duyan sevgili eşim Serhat Demirtaş'a,

Fikirlerinden, bilim ahlakından, bilim insanı kişiliğinden ilham aldığım, bana kısa zamanda çok emeği geçen Dr. Theo Luijder'a,

Daima kariyerim için destek olan ve her ihtiyacımda koşulsuz yanımda olan sevgili aileme de gönülden teşekkür ediyorum. Bu tez çalışmasını, beni daima yüreklendirmiş ve her şeyi başarabileceğime inandırarak yetiştirmiş olan anne ve babama manen ithaf ediyorum.

Bu doktora tezi, TÜBİTAK tarafından desteklenen 118C082 numaralı (TÜBİTAK 2244 Sanayi Doktora Programı) proje bütçeleri kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu desteklerden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca; Acıbadem Mehmet Akif Aydınlar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı (ABAPKO) tarafından numaralı proje desteği ve pek çok kez Akademik Faaliyet Destekleme Komisyonu (AFDK) tarafından uygun bulunan bilimsel aktivite destekleri için Acıbadem Mehmet Akif Aydınlar Üniversitesine teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
RESİMLER LİSTESİ.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kadın Sağlığı.....	4
2.2 Servikal Kanser.....	4
2.2.1 Servikal kanserin epidemiyolojisi	5
2.2.2 Servikal kanserin risk faktörleri ve korunma yolları	5
2.2.3 Servikal kanserin gelişimi ve patofizyolojisi	7
2.2.3.1 Serviksin histolojik yapısı	8
2.2.3.2 Serviksin enfeksiyonları.....	9
2.2.4 Servikal kanserin gelişimi, nomenklatürü ve histopatolojik alt tipleri	9
2.2.5 Serviks kanserinde tarama ve erken tanı.....	11
2.2.5.1 Pap-smear ve HPV genotipleme testleri.....	12
2.2.5.1.1 Sitolojik tanı sınıfları.....	14
2.2.5.2 Kolposkopik görüntüleme ve biyopsi	16
2.2.5.2.1 Biyopsi için histolojik dereceler	17
2.2.5.3 İlmek elektrocerrahi eksizyon prosedürü (LEEP)	18
2.3 Literatürdeki Servikal Örnekler Kullanılarak Servikal Kansere Yeni Bir Tarama Testi Geliştirme Amacıyla Yapılan Çalışmalar.....	19
2.3.1 Sıvı örnekleme yöntemi: servikovajinal lavaj aspirasyonu	19
2.3.2 SVS örnekleme aparatı	22
2.3.3 Proteomik çalışmaları	28
2.3.4 Küçük molekül ve lipid çalışmaları	33
2.3.5 Servikal kanser ve oksidatif stres.....	37
3 GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1 Tez Çalışmasının Amacı ve Projelerin Bilgileri.....	41

3.2 Tez Çalışmasının Biyobankasının Oluşturulması	42
3.3 Tez Çalışmasında Uygulanan Laboratuvar Deneyleri ve Analizler	48
3.3.1 Servikovajinal sıvıdaki potansiyel protein biyobelirteçlerin ELISA testi ile miktar tayini	48
3.3.1.1 Kullanılan malzemeler	51
3.3.1.2 Optimizasyon çalışmaları	52
3.3.1.3 ELISA ölçümleri.....	53
3.3.1.4 İstatistiksel analiz	53
3.3.2 Servikovajinal sıvıdaki hasta ve sağlıklı bireylere ait örneklerdeki proteom farklılıklarının proteomik yöntemler ile araştırılması.....	54
3.3.2.1 SDS-PAGE	55
3.3.2.2 Proteomik analiz.....	57
3.3.2.3 İstatistiksel analiz	58
3.3.3 Servikovajinal sıvıdaki organik asitlerin hasta ve sağlıklı bireylere ait örneklerdeki miktar farklılıklarının araştırılması.....	58
3.3.3.1 Organik asit ekstraksiyonu.....	59
3.3.3.2 GC-MS analizi	60
3.3.3.3 Kromatogram ve pik analizi.....	60
3.3.3.4 İstatistiksel analiz	60
3.3.4 Servikovajinal sıvıdaki belirli oksisterollerin hasta ve sağlıklı bireylere ait örneklerdeki miktar farklılıklarının araştırılması	60
3.3.4.1 Örneklerin lipid ekstraksiyonu	61
3.3.4.2 Total kolesterol ölçümü.....	61
3.3.4.3 Hedeflenen lipidler ve kullanılan kimyasallar	61
3.3.4.4 MRM yöntemiyle LC-MS/MS ölçümü	62
3.3.4.5 İstatistiksel analiz	62
3.3.5 Servikovajinal sıvıdaki protein oksidasyonunun hasta ve sağlıklı bireylere ait örneklerdeki farklılıklarının araştırılması.....	62
3.3.5.1 Protein karbonil deneyi.....	63
3.3.5.2 Proteomik analiz.....	64
3.3.5.3 Aminoasit modifikasyonları için informatik analiz	65
3.3.5.4 İstatistiksel analiz	66
4 BULGULAR	67
4.1 Servikovajinal Sıvıdaki Potansiyel Protein Biyobelirteçlerin Elisa Testi ile Miktar Tayini	67
4.1.1 Optimizasyon sonuçları	67
4.1.2 ELISA testi ölçüm sonuçları.....	68
4.2 Servikovajinal Sıvıdaki Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Örneklerdeki Proteom Farklılıklarının Proteomik Yöntemler ile Araştırılması	70
4.3 Servikovajinal Sıvıdaki Organik Asitlerin Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Örneklerdeki Miktar Farklılıklarının Araştırılması	74
4.4 Servikovajinal Sıvıdaki Belirli Oksisterollerin Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Örneklerdeki Miktar Farklılıklarının Araştırılması.....	76
4.5 Servikovajinal Sıvıdaki Protein Oksidasyonunun Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Örneklerdeki Farklılıklarının Araştırılması	78
5 TARTIŞMA.....	84

5.1 Servikovajinal Sıvıdaki Potansiyel Protein Biyobelirteçlerin ELISA Testi ile Miktar Tayini	84
5.2 Servikovajinal Sıvıdaki Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Örneklerdeki Proteom Farklılıklarının Proteomik Yöntemler ile Araştırılması	87
5.3 Servikovajinal Sıvıdaki Organik Asitlerin Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Örneklerdeki Miktar Farklılıklarının Araştırılması	88
5.4 Servikovajinal Sıvıdaki Belirli Oksisterollerin Sağlıklı ve Hasta Bireylere Ait Örneklerdeki Miktar Farklılıklarının Araştırılması.....	90
5.5 Servikovajinal Sıvıdaki Protein Oksidasyonunun Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Örneklerdeki Farklılıklarının Araştırılması	91
5.6 Limitasyonlar	92
6 SONUÇ	94
7 KAYNAKLAR.....	96
8 EKLER.....	112
EK 1. ATADEK - 2020/01 Etik Kurul Kararı.....	112
EK 2. Bilgilendirilmiş Onam Formu	114
EK 3. ATADEK - 2022/07 Etik Kurul Kararı.....	119
EK 4. Bilgilendirilmiş Onam Formu	121
9 ÖZGEÇMİŞ	Error! Bookmark not defined.

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

ACTN4	Actinin-alpha-4
α	Alfa
AGUS	Atypical glandular cells
ANXA2	Annexin-a-2
ANXA3	Annexin-a-3
ASC-H	Atypical squamous cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesions
ASC-US	Atypical squamous cells of undetermined significant
AUC	Area Under Curve
β	Beta
BSA	Bovin Serum Albümin
CALM3	Calmoduline-like-3 protein
CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia
CIS	Carcinoma in situ
DNPH	Dinitrophenylhydrazine
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTT	Dithiothreitol
DTT	Ditiyotretol
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ET	Ekstraksiyon tamponu
GC	Gas Chromatography
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High performance liquid chromatography
HPV	Human Papillomavirus
Hr-HPV	High-risk HPV
HSIL	High-grade Squamous Intraepithelial Lesion
IAA	Iodoacetamide
ICC	Invasive cervical carcinoma
KETEM	Kanser Erken Teşhis Tarama ve Eğitim Merkezi
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometer

LEEP	Loop electrosurgical excision procedure
LLEZT	Large loop excision of the transformation zone
LSIL	Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
MRM	Multiple Reaction Monitoring
OKK	Oral kontraseptif kullanımı
PBS	Phosphate buffered salin
PROF1	Profillin 2
ROC	Receiver Operating Characteristic
SCC	Squamous cell carcinoma
SCCA1	Squamous cell carcinoma antigen 1
SCCA2	Squamous cell carcinoma antigen 2
SIL	Squamous Intraepithelial Lesion
SKB	Skuamö-kolumnar bileşke
SVS	Servikovajinal sıvı
TOF	Time of flight
7- KC	7-ketokolesterol
7β-OHC	7β-hidroksikolesterol
7α,27-diOHC	7α,27-dihidroksikolesterol
26-OHC	26-hidroksikolesterol
27-OHC	27-hidroksikolesterol

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Dünya genelinde servikal kanser taraması için kullanılan yöntemler	12
Şekil 2. Servikal kanser taraması uygulaması.....	13
Şekil 3. Türkiye'de servikal kanser tarama programında hastane dışı birincil sağlık merkezlerinde izlenen adımlar	15
Şekil 4. Servikal kanserin gelişimi.....	18
Şekil 5. Ürünün üç boyutlu çizimi	23
Şekil 6. Oksidatif stresin serviks hücrelerinde sebep olabileceği senaryolar.....	38
Şekil 7. Çalışmalar için biyobanka oluşturma sürecinin özeti	43
Şekil 8. Örneklerin birleştirilme (pooling) dizaynı	55
Şekil 9. Örneklerin SDS-PAGE jel görüntüsü	56
Şekil 10. Kalibrasyon eğrisi grafikleri	67
Şekil 11. Elisa test sonuçlarının gruplar üzerindeki dağılımını gösteren kutu grafikleri.....	69
Şekil 12. İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunan CALM3, ANXA3, PROF1 proteinlerinin boxplot grafikleri.....	71
Şekil 13. SVS proteomunun bileşimi: bu çalışmada tanımlanmış tüm proteomun hücresel lokasyona göre dağılımı.....	71
Şekil 14. Proteomik verilerinin analizi	73
Şekil 15. Tüm örneklerde ortak olarak tanımlanan organik asitlerin boxplot grafikleri.....	75
Şekil 16. Total protein ve total kolesterol konsantrasyonu değerlerinin dağılımı	76
Şekil 17. Oksisterol miktarlarının gruplara göre dağılımı	77
Şekil 18. Protein karbonil ölçüm sonuçları	79
Şekil 19. PCA grafiği	82

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Ürünün üç boyutlu yazıcıdan basılan prototipleri.....	24
Resim 2. Toplanan örnek materyalinin görüntüleri	44
Resim 3. Örneklerin swab materyalinden geri kazanımı	45
Resim 4. SVS lavaj aspirasyon örnekleri.....	47



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Servikal histopatolojilerinin sınıflandırılmasında kullanılan terminolojiler	11
Tablo 2. Servikal kanser gelişiminde SVS'teki potansiyel protein biyobelirteçleri tespit etmek için yapılan proteomik çalışmaları.....	31
Tablo 3. Doktora tezi kapsamında yapılan tüm çalışmaların özeti	41
Tablo 4. Literatürde potansiyel biyobelirteç olduğu öne sürülen ACTN4 proteinin bu çalışmadaki ölçüm değerleri için tanımlayıcı istatistik veriler	70
Tablo 5. Örnek gruplarında en fazla bulunan proteinler	72
Tablo 6. Bileşenlerin rol oynadığı biyokimyasal yollar	75
Tablo 7. Normalize edilmiş total spektra verisine göre: Karbonil modifikasyonlarına göre, belirlenmiş aminoasit rezidülerinden karbonillenmiş olan proteinlerin listesi .	80
Tablo 8. Gruplara göre örneklerde en yüksek bağıl bollukla tanımlanmış ilk on protein	81
Tablo 9. Toplam benzersiz peptit sayısı verilerine göre: Modifikasyonlardan ve kantitatif karşılaştırmadan bağımsız olarak, normalize total spektraya göre kontrol grubunda ve kanser grubunda en yüksek miktarda tanımlanmış ilk 10 proteinin listesi	82

ÖZET

Servikal Kanserde Servikovajinal Sıvıdaki Biyolojik Belirteçler Kullanılarak Yeni Erken Tanı Yöntemlerinin Araştırılması

Servikal kanser, ülkemizde yüksek görülme sıklığına sahip, yavaş ilerleyen ve erken tanı sayesinde ilk evrelerde minimal cerrahi yöntemlerle tedavi edilebilir bir kanser çeşididir. Her ne kadar serviks kolay ulaşılabilir ve gözlenebilir bir bölgede olmasına, erken evre lezyonların sitolojik boyama preparatları ile saptanabilir olmasına rağmen, mevcut tarama yöntemlerinin yetersiz oluşu ve bu tarama programlarına katılımın yetersizliği sebebiyle halen uygulanabilir ve makul bir tarama yöntemi arayışı literatürde devam etmektedir. Bu çalışmada, servikovajinal sıvıdaki potansiyel biyobelirteçler ve bunların uygulamaya geçirilme ihtimalleri araştırılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Servikal kanser, Servikovajinal sıvı, Biyobelirteç, Proteomik, Displazi gelişimi.

ABSTRACT

Investigation of New Early Diagnostic Methods Using Biological Markers For Cervical Cancer

Cervical cancer has a high incidence in Turkey which progresses slowly and can be treated with minimal surgical methods in the early stages thanks to early diagnosis. Although the cervix is in an easily accessible and observable region and early-stage lesions can be detected with cytological staining preparations, the search for a feasible and reasonable screening method still continues in the literature due to the inadequacy of current screening methods and the inadequacy of participation in these screening programs. In this study, potential biomarkers in cervicovaginal fluid and their application possibilities were investigated with different aspects.

Keywords: Cervical cancer, Cervicovaginal fluid, Biomarker, Proteomics, Dysplasia development.

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Servikal kanser, Dünya genelinde ve ülkemizde yaygın görülen kadın kanserlerinden biridir. Halihazırda pek çok ülkede ulusal kanser tarama programlarınca takip edilen ve sağlık bakanlıkları denetiminde uygulanan tarama yöntemleri ve aşılamalara rağmen, servikal kanser kadın sağlığı üzerindeki ciddiyetini halen korumaktadır (1,2). Yaygın olarak kullanılan tarama testlerinin yanlış-negatif ve yanlış-pozitif sonuç verme oranları yüksek olduğundan ve tarama programlarına katılım oranlarının yetersizliğinden dolayı, alternatif yöntemlerin araştırılmasına dair çalışmaların sayısı literatürde giderek artmaktadır (3).

Bu tez çalışmasında, servikal bölgeden alınan klinik örnekler ile çeşitli biyomoleküllerin vaka/kontrol farklılıkları üzerine farklı yöntemler içeren analizler yapılmıştır. Bu tez çalışmasının amacı, servikal kanser riski taşıyan veya servikal kanser geliştirmiş preinvaziv ve invaziv hastalara ait örneklerdeki çeşitli biyomolekül gruplarının miktar farklılıklarını ortaya çıkarak, potansiyel bir erken tanı belirtecinin belirlenebilmesine katkı sağlamaktır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kadın Sağlığı

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sağlık kavramını “yalnızca hastalık veya sakatlığın olmayışı değil; fiziksel, zihinsel ve sosyal yönden tam bir iyilik hâli” olarak tanımlamaktadır. Kadın sağlığı hususunda, ilk akla gelen problemler ergenlikten itibaren başlayan genital sağlık ve üreme sağlığıdır. İnsanoğlunun soyunun devamı için kadın üreme sisteminin sağlığı büyük önem arz eder ve kadın üreme sağlığı pek çok parametreye bağlıdır.

Yalnızca menstrüasyon, gebelik ve doğum ele alındığında dahi, kadınlar için büyük sağlık riskleri taşıyan ve toplumsal düzeyde yadsınamaz bir öneme sahip olan bu konular, kadınların sağlık kavramını erkeklerden ayırmaya yeterli düzeyde bir öncelik teşkil etmektedir. Bu bağlamda kadın sağlığı başlığı altında menstrual siklus sorunları, infertilite ve gebelik sorunları, doğum ve laktasyon sırasında meydana gelen sorunlar, aile planlamasında kadın odaklı doğum kontrol uygulamaları ve planlanmamış gebelikler, kadına yönelik fiziksel ve psikolojik şiddet, kürtaj ve düşükler, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar ve diğer ürogenital enfeksiyonlar, cinsel yaşam sorunları ve vajinal rahatsızlıklar ile kadın genital sisteminin kanserlerinden bahsedilebilir. Bu tez kapsamında, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlarla ilişkili kadın genital sisteminin kanserlerinden biri olan servikal kanser üzerine yapılan doktora çalışmaları anlatılmıştır.

2.2 Servikal Kanser

Rahim ağzı kanseri veya uterin serviksin kanseri olarak da bilinen serviks kanseri, kanserin orijininin bilinmesi, kanserleşen bölgeye dışarıdan kolay erişim, kanserin sebepsel ajanının (HPV) bilinmesi, aşılama ile risk oranının azaltılabilmesi, rutin tarama yöntemleriyle erken evrede tespit edilebilmesi, HPV enfeksiyonunun zaman içerisinde konak immün sistemi tarafından bertaraf edilebilmesi, yavaş ilerlemesi, virüs kaynaklı oluşan lezyonların zaman içerisinde kendiliğinden

gerileyebilmesi, preinvazif evrelerde tedavi başarısının yüksek olması gibi faktörler sayesinde, servikal kanser son derece önlenebilir bir kanser türü olarak görülmektedir (4,5).

2.2.1 Servikal kanserin epidemiyolojisi

Serviks kanseri Türkiye’de meme ve kolorektal kanserden sonra kadınlarda üçüncü sırada ve 4.3/100.000 sıklıkla görülen bir kanser türüdür (6). Dünya genelinde ise 2020 yılında 604.127 yeni vaka teşhis edilmiş olup bu rakam tüm kanserlerin %3.1’ini oluşturmaktadır (2,7); genel kanser ölümlerinin ise 341.831 rakamıyla %3.3’ünü oluşturmaktadır.

Dünya genelinde serviks kanseri insidansının otuzlu yaşlarda pik yaparken, ülkemizdeki vakaların %65’i, 40 ile 60 yaş aralığındaki kadınlarda görülmektedir (6). Servikal kanser insidansı, taramanın yaygınlaşması ve aşılama nedeniyle Dünya genelinde 1970’lerin ortalarından bu günlere dek kümülatif olarak yarıdan fazla azalmıştır (8,9). Fakat insidansı ve mortalitesi ülkelerin gelişmişlik durumuna, sosyokültürel ve sosyoekonomik düzeye bağlı olarak bölgeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Dolayısıyla, düşük-orta gelirli/gelişmekte olan ülkelerde, kadınlar arasında servikal kanser insidans oranları diğerlerinden özellikle 65 yaş altı genç kadınlarda ortalama %30 daha yüksektir (10–12).

2.2.2 Servikal kanserin risk faktörleri ve korunma yolları

Servikal kanserin doğrudan risk faktörleri arasında birinci sırada HPV enfeksiyonu (%99) gelirken, onu takiben tütün kullanımı, diğer genital enfeksiyonlar (herpes virüs, AIDS, vb) gibi faktörler sıralanabilmektedir (13).

Dolaylı faktörler arasında ise erken yaşta cinsel ilişki veya gebelik, yüksek doğum sayısı, poligami (veya multipl partner şartlarına uymasa da partneri dolayısıyla) ve oral kontraseptif kullanımı (OKK) sayılabilir. HPV haricindeki diğer genital enfeksiyonların servikal kansere yol açabilmesi, servikovajinal alandaki

mikrobiyota dengesinin değişip, pH değişimi, enflamasyon, oksidatif stres sonucu homeostazisinin bozularak karsinogeneze yol açma potansiyeli oluşundan kaynaklıdır (14–17).

Servikal kanserden en etkili korunma yolu, ona sebep olan HPV enfeksiyonunu önleme amacıyla güvenli cinsel ilişkiyi sağlamaktır. Ardından, kanser gelişiminde ve DNA mutasyonlarındaki ve HPV enfeksiyonunun kalıcılığındaki tetikleyici etkisi bilinen tütün kullanımından uzak durmak, 9-14 yaş aralığında HPV aşısı olma ve cinsel olarak aktif kadınların düzenli tarama testlerine katılmak servikal kansere yakalanmayı önleme yolları arasında sayılabilir (18).

Pek çok ülkede bivalan (Cervarix: yalnızca HPV-tip 16 ve 18'i hedefler), kuadriyalan (Gardasil: HPV-tip 6, 11, 16 ve 18'i hedefler) ve nonavalan (Gardasil9: HPV-tip 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 ve 58'i hedefler) olmak üzere farklı HPV tiplerini hedefleyen çeşit HPV aşıları bulunmaktadır (9,19). Bunların hepsi, HPV'nin konak hücrenin genomuna entegrasyonunu ve ardından dokuda lezyon gelişimini önlemeyi sağlayan profilaktik aşılardır (20).

HPV aşısına atfedilen bir gelişmeye örnek olarak, aşılanmış bireylerde 2010-2017 yılları arasında 15-20 yaşları arasında servikal kanser gelişiminde yılda %22,5'lik dūřuř oranı bildirildi (7). Amerika Birleřik Devletlerinde ise HPV pozitifliğinde 2003-2018 yılları arasında aşı olanlarda %90, aşı olmayanlarda ise %74 oranında azalma tespit edildi (21). İve ise 2020'de 17 yaşından önce aşılanan kadınlar arasında invaziv servikal kanser insidansında nüfus düzeyinde %78'lik bir azalma bildiren ilk ülke oldu (22). Ardından, İngiltere'de 12-13 yaşlarında aşılanmış olan 20-29 yař arası kadınlar arasında 3. derece servikal intraepitelyal neoplazi görölme oranında %97'lik bir azalış olduğu gösterildi (23).

Aşıların verimli olabilmesi için, kişinin henüz HPV ile enfekte olmaması gereklidir, zira virüsle enfekte olmuş bireylerdeki etkisi tartışmalıdır (24). Ayrıca, aşılar yalnızca belirli birkaç HPV tipine karşı etkilidir, dolayısıyla aşılanmış olursa dahi güvenli cinsel ilişki ve tarama programlarına katılım sürdürölmalıdır.

2.2.3 Servikal kanserin gelişimi ve patofizyolojisi

HPV, zarfsız, kapsülsüz, çift sarmallı bir DNA virüsü olup, doğada 150'den fazla tipi tanımlanmıştır (25). HPV'nin yaklaşık 20 farklı türünün genital enfeksiyona neden olduğu bilinmektedir. Enfeksiyonlarının yaklaşık %80'i herhangi bir şikayete neden olmaz ve 1-2 yılda kendiliğinden iyileşir veya sadece ciltte geçici siğil şeklinde bulgu verebilir (26,27). Tanımlanmış 200'e yakın HPV türünün 40 tanesi genital bölgeyi enfekte etmekte ve bunlardan 15 tanesi servikal kanser gelişimi için yüksek riskli(Hr-HPV)dir (28).

Virüsün yerleştiği dokuda malign transformasyon meydana gelmesi için viral E6 ve E7 onkoproteinlerinin ekspresyonu gereklidir. Bu onkoproteinler, p16, p53, p21 ve Rb tümör süpresör genlerinin mutasyonuna neden olarak dokuda displazi başlatır (29). Virüsle karşılaşma ile virüsün salınımı arasında geçen süre, 3 hafta civarında olup virüs kaynaklı lezyonların dokuda ortaya çıkması birkaç hafta ile aylar arasında değişmektedir (30). Lezyonların %2'sinin karsinoma in situ (carcinoma in situ, "CIS")'ye dönüşme frekansı mevcuttur. Herhangi bir tedavi uygulanmayan CIS vakalarının %70'i 10 ile 15 yıl arasında; %10'u ise 1 yıl içerisinde invazif tümöre dönüşebilmektedir (31,32).

Dünya genelinde tüm servikal kanser vakalarının %99.99'unun HPV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (33). Türkiye'de ise servikal kanserli hastaların HPV prevalansı %93 oranında olup (6), tümör mevcudiyetinde HPV genetik materyaline saptanmadığı ender vakaların bulunduğu bilinmektedir (34,35).

Bununla birlikte, Dünya genelinde HPV enfeksiyonu görülme oranı her 50 kişiden biri (36) olarak, Türkiye'de ise 20-65 yaş arası kadın popülasyonu içerisinde ise %10 oranında (35) karşımıza çıkmakta ve fakat HPV enfeksiyonlarının %80'i geçici olup 2-15 yıl içerisinde servikal maligniteye yol açmadan kişinin immün sistemi tarafından bertaraf (self-clearance) edilmektedir (37,38). Bu durum, "neredeyse tüm servikal kanser vakalarında HPV enfeksiyonu görülür, fakat çoğunlukla HPV enfeksiyonu servikal kansere yol açmaz" şeklinde özetlenebilir.

2.2.3.1 Serviksin histolojik yapısı

Servikal kanserin patofizyolojisini anlamak için, hücresel kompozisyonu gözden geçirilmelidir. Serviksin rahim içine bakan kısmı endoserviks, vajen içine bakan kısmı ise ektoserviks olarak adlandırılır, HPV ile ilk enfekte olan bölge olan ektoserviks, skuamöz epitel (çok katlı yassı epitelyal hücreler) tabaka ile kaplıdır. Bu tabaka, glikojen içeren keratinize olmamış çok katmanlı epitel hücrelerden oluşur. Endoservikal bölgedeki mukus salgılayan stroma ise tek katlı kolumnar epitel ile döşelidir. Ektoservikal skuamoz epitel ile endoservikal kolumnar epitel sınırına “skuamö-kolumnar bileşke (SKB)” adı verilir. Puberte öncesinde SKB'nin bulunduğu esas nokta eksternal servikal os'dur; fakat bu nokta puberte, gebelik, OKK, menstrüasyon ve menapoz dönemi gibi değişimlere yanıt veren dinamik bir alandır (39,40).

Gebelik ve OKK esnasında SKB ektoservikse doğru ilerlerken, menopozal dönemde endoservikal kanala doğru çekilmektedir (39). Puberte evresinden sonra SKB, farklılaşmış (matür) bir hücre tipi olan serviks kolumnar epitelin, başka bir farklılaşmış hücre tipi olan skuamoz epitele dönüşümü “skuamoz metaplaziye” uğrayarak ektoservikse doğru ilerler (39). SKB'nin bulunduğu eski lokasyonu ile bu yeni lokasyonu arasında kalan doku “transformasyon zonu” olarak adlandırılır ve burada müsinöz kolumnar epitel, artık çok katlı skuamoz epitele dönüşmüştür (39).

Dolayısıyla bu dinamik metaplastik hücreler onkojenik faktörlere karşı daha duyarlıdır ve neoplastik dönüşüme daha açık haldedirler (40). Reprodüktif dönemde metaplazi devam etmektedir, bu nedenle de menapoz sonrasına kıyasla, öncesi dönemde servikal kanser gelişimi daha sık görülür (40,41).

Buradaki metaplazi doğal bir süreç olsa da, HPV ajanı bu dokudaki hücrelere daha kolay entegre olarak konak hücrelerde bol miktarda kendi E6 ve E7 onkoproteinlerinin ekspresyonu ile özellikle p16, p53, p21 ve Rb tümör süpresör genlerini susturur ve sonuç olarak kontrolsüz hücre proliferasyonuna ve epitel-mezenkimal dönüşüme yol açar (28,42).

2.2.3.2 Serviksin enfeksiyonları

Dünya’da her gün 1 milyondan fazla birey, cinsel yolla bulaşan enfeksiyona (STDIs) yakalanmaktadır (43). HPV, insanlarda görülen üreme sisteminin son derece yaygın bir enfeksiyöz ajanı olup, morbidite ve mortalitesi yüksek pek çok kanser türünün sebeptel ajanıdır. Bunun yanı sıra, kansere sebep olmayıp genital siğillere veya ciltte papüllomatoza da sebep olabilir. Fakat serviksin enfeksiyonları HPV ile sınırlı değildir. Servikal enfeksiyon yani servisit, akut ise çoğunlukla mikroorganizma kaynaklı, kronik servisit ise bir histolojik tanı olup doğum yapmış çoğu kadında görülmektedir; tanıda kültür, smear bulguları ve kolposkopi kullanılmaktadır (44). Çeşitli mikroorganizmalar ürogenital sistemi hedef alarak sistit, vajinit, vulvit, servisit gibi hastalıklara yol açabilmektedir. Servikovajen, özellikle de serviksin kolumnar epitel tabakası, *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Calymmatobacterium granulomatis*, *Ureaplasma urealyticum* gibi bakterial enfeksiyonlara ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve herpes simpleks gibi virüslerle enfekte olmaya açıktır (45). Bu enfeksiyonlar, sekonder enfeksiyonların, şiddetli enflamasyonun ve kanserin riskini arttırmakla beraber, gebelik ve doğumla ilgili sorunlar da meydana getirmektedir (46,47).

2.2.4 Servikal kanserin gelişimi, nomenklatürü ve histopatolojik alt tipleri

DSÖ servikal kanserin histopatolojik sınıflandırılmasında alt tipleri doku grubuna göre ayırmaktadır. En sık görülen servikal kanser tipi %69 oranında skuamoz hücreli karsinom (SHK) ve %25 oranında endoserviksin mukus üreten bez hücrelerinden gelişen adenokarsinomadır (ADK) (33).

Persistan HPV enfeksiyonu %2 oranında dokuda lezyon oluşumuyla sonuçlanmaktadır (48). Lezyon, genel bir terim olmakla beraber, HPV kaynaklı servikal doku bozuklukları için yayın olarak kullanılan bir kavramdır. Günümüzde lezyon terimi servikte daha yüzeysel olan ve sitoloji ile tespit edilebilen hücresel değişimleri ifade etmek için kullanılmaktadır.

Displazi kavramı, genel olarak anormal gelişim anlamına gelip, kansere dönüşme ihtimali olan hücre yapı ve davranış bozukluğunun şiddetini ifade eder. Displastik hücrelerde profilerasyon normalden fazla, artmış çekirdek/sitoplazma oranı, hiperkromazi ve nükleer pleomorfizm görülür ve displazi şiddetlendikçe bu özelliklerde de artış gözlenir (49). Sitopatoloji alanının öncülerinden George Papanicolaou, kanser taramasında kullanılan “Pap smear” testin mucidi Yunan asıllı doktor, servikal kanserin vajinal yayma yoluyla teşhis edilebileceğini 1928 yılında bildirdi. Ardından 1954 yılında sitolojik örneklerin adlandırılması için oluşturduğu sınıflandırma, aşağıda verilmiştir (50):

- Class I : Normal, anormal bir hücre yok.
- Class II : Atipik sitoloji, ancak malignant bulgu yok.
- Class III : Prekanser şüphesi, hafif/orta/ağır displazi.
- Class IV : Karsinoma in situ, malignant olasılığı yüksek hücreler.
- Class V : Kesin kanserli hücrelerin varlığı

Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) kavramı ise 1967 yılında dokudaki neoplastik dönüşümün varlığını ve oranını ifade etmek için tanımlanmıştır (51). CIN, premalign ve malign değişimlerden tümör oluşumuna dek kademeli olarak dokudaki anormal değişimleri sınıflandırmak ve adlandırmak için kullanılıp, CIN dereceleri 1'den 3'e kadar, hafif displazi, orta displazi ve şiddetli displazi olmak üzere CIN1, CIN2 ve CIN3 olarak ifade edilir (52). CIN3 derecesinin bir üstü CIS olup, invazif kanserden bir önceki histopatolojik sınıftır; bazı kaynaklarda CIN3 ve CIS dereceleri aynı sınıfta değerlendirilmektedir.

2001 yılında Bethesda terminoloji sistemi ile revize edilerek bir grup sınıflandırma daha getirilmiştir (53,54): “servikal intraepitelyal neoplazi (SIL)”. SIL grupları no intraepithelial lesion or malignancy identified: NILM (intraepitelyal lezyon veya malignite gözlenmedi)”, “low grade squamous intraepithelial lesion: LSIL (düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon)”, “high grade squamous intraepithelial lesion: HSIL (yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon)” ve “atypical squamous cells of undetermined significant: ASC-US (atipik skuamöz

hücreli önemi belirsiz lezyon)” olmak üzere üç temel grup altında incelenmeye başlamıştır (55). Her ne kadar Dünya genelinde bir standardizasyon getirilmesi amaçlı revizyonlar yapılsa da, terminoloji tercihi halen kurumdan kuruma değişebilmektedir. Bugüne kadar yaygınlıkla kullanılan sınıflandırmaların karşılaştırılması Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Servikal histopatolojilerinin sınıflandırılmasında kullanılan terminolojiler (56)

Papannicolaou sistemi	CIN sistemi	DSÖ'nün kullandığı sistem	Bethesda Sistemi
Class-I		Normal	NILM
Class-II		Atypical inflammation (reaktif cellular changes)	ASC-US
Class-III	CIN1	Mild dysplasia	LSIL
Class-IV	CIN2	Moderate dysplasia	
Class-V	CIN3	Severe dysplasia	HSIL

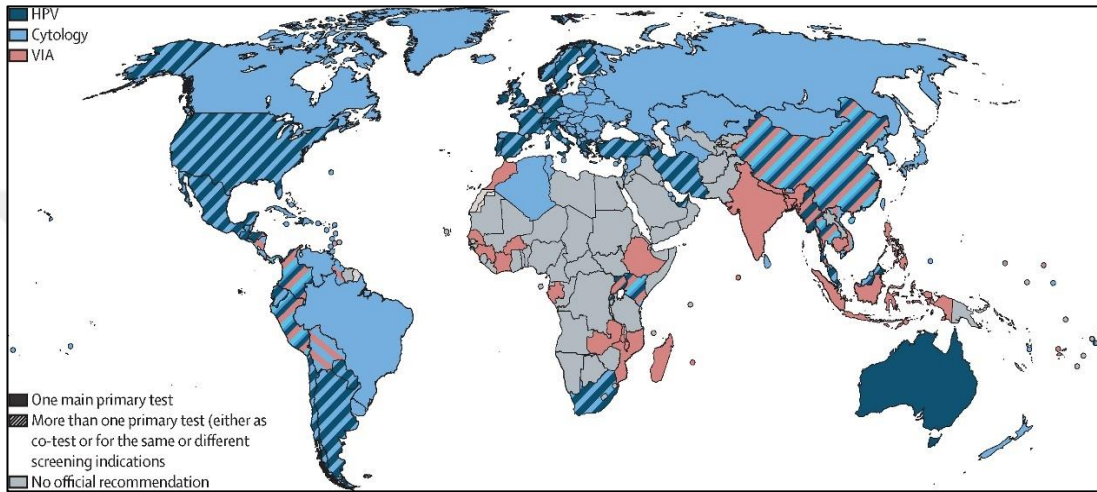
Bethesda sisteminin ardından, 2012 yılında LAST (Lower Anogenital Skuamous Terminology) terminolojisi de kullanılmaya başlanmıştır (57). Bu terminoloji daha kapsamlı olup, p16 gibi immünohistokimyasal bulguları da dikkate alan bir algoritmaya sahiptir, böylece hem uluslararası standardizasyonu sağlamak, hem şüpheli örneklerde hekimler arasındaki fikir ayrılığında belirleyici bir parametre sunulması hedeflenmiştir. Günümüzde, çoğunlukla sitolojik değerlendirmede Bethesda sistemi kullanılırken histolojik değerlendirmede CIN sistemi kullanılmaktadır (53).

2.2.5 Serviks kanserinde tarama ve erken tanı

Amerikan Kanser Derneği'ne göre; tüm kadınlarda servikal kanser taraması 21 yaşından itibaren uygulanmaya başlamalı ve 30 yaşına kadar 3 yılda bir yapılmalıdır (58). 30 yaşından sonra ise Pap-smear ve HPV test kombinasyonu (co-test) tercih edilmeli, bu kombinasyon 65 yaşına kadar beş yılda bir uygulanmaya devam etmelidir (58).

Dünya genelinde servikal kanserin taranması farklılık göstermektedir (bakınız: Şekil 1). Batı ve Orta Avrupa, Çin, Kuzey Amerikanın bir bölümü ve ülkemiz de

dahil olmak üzere belirli bölgelerde servikal kanser taraması için Pap-smear ve HPV genotipleme testleri primer taramada beraber kullanılırken, çoğu Afrika ülkesinde ve Güney Asya, Güney Amerika ve Kuzey Amerikanın bir bölümünde ya tarama uygulanmamakta ya da Pap-smear veya kolposkopik görüntüleme tek başına uygulanmaktadır (59). Elbette, bu duruma sebep olarak finansal koşullar başlıca sınırlayıcı faktörlerden biridir (60).



Şekil 1. Dünya genelinde servikal kanser taraması için kullanılan yöntemler (59)

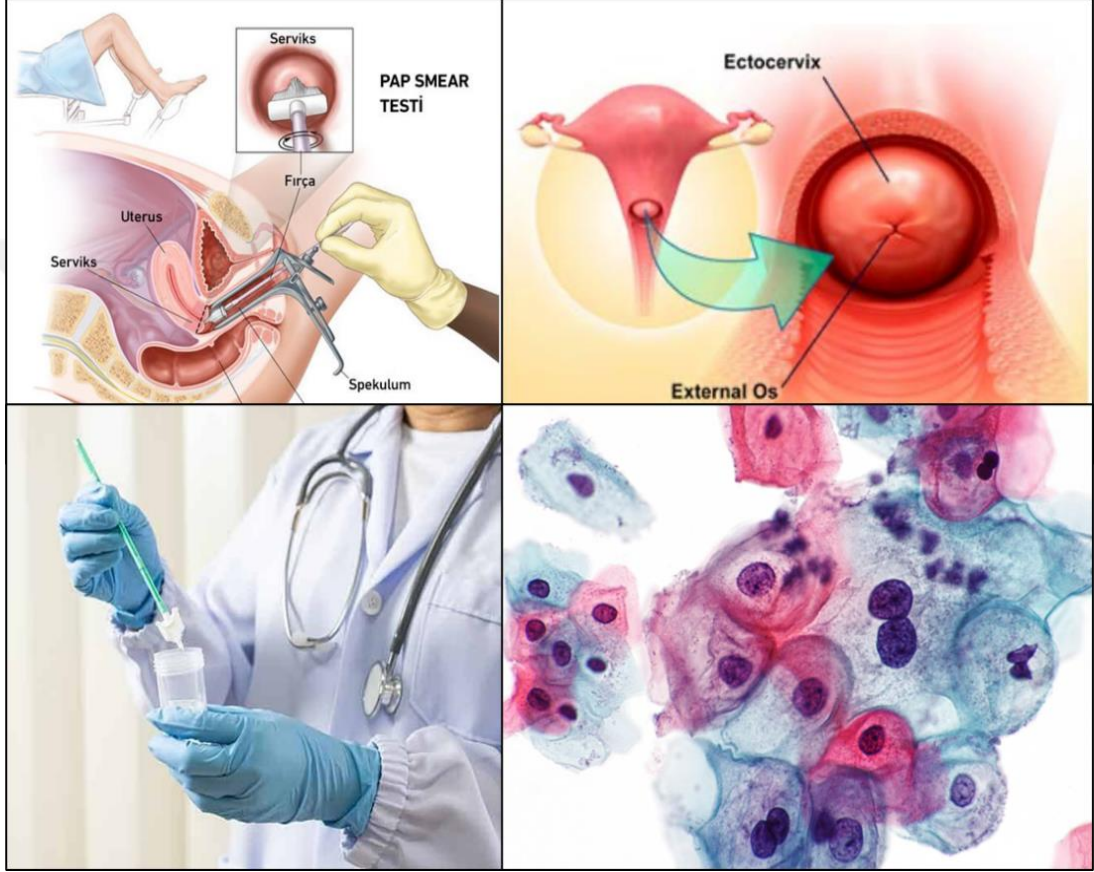
Sol-üst lejant, sırasıyla: HPV genotipleme, Pap-smear, asetik asit uygulaması ve kolposkopik görüntüleme (visual inspection with acetic acid); Sol-alt lejant: “tek renk, mavi lacivert veya pembe”: tek bir birincil tarama testi (HPV veya Pap-smear veya kolposkopik görüntüleme); “çizgili çift renk”: iki tarama testi (üç testten ikisi beraber uygulanıyor); “gri”: tarama uygulaması yok.

2.2.5.1 Pap-smear ve HPV genotipleme testleri

Pap-smear, son yıllarda ağırlıklı olarak sıvı fiksatif bazlı sitoloji tekniği ile patoloji laboratuvarlarında otomasyona dayalı olarak uygulanmaktadır. En sık kullanılan marka olan ThinPrep & PreservCyt gibi metanol içerikli hücre fiksatifleri kullanımı, örnekten alınan verimi arttırmaktadır (61).

Pap-smear testi günümüzde genel değerlendirme sağlık testleri listesine dahil olup, jinekolojik muayene esnasında, litotomi pozisyonunda (Şekil 2), vajene spekulum yerleştirilerek, smear fırçası serviksin eksternal os bölgesine süpürme hareketiyle sürülüp, fırça endoservikal kanalda kendi ekseninde çevrilerek sitolojik smear örnek alınır ve fırça sıvı fiksatif içeren örnek toplama tüpü içerisinde

çalkalanarak tüm örnek sıvının içerisine aktarılır (61,62). Sonrasında bu sıvı laboratuvarında özel bir filtreden geçirilerek kan, mukus ve debristen arındırılmış hücreler elde edilir ve lama yayılır. İnceleme, örneğin Papanicolaou boyası ile boyanarak ışık mikroskobu altında sitolojisinin (Şekil 2) morfolojik olarak incelenmesine dayanır.



Şekil 2. Servikal kanser taraması uygulaması

Sol-üst: Pap-smear örneğinin alınması illüstrasyonu: litotomi pozisyonu ve spekulumun işlevi (görselin kaynağı: <https://www.irfantarhan.com/smea-pap-smear/>); sağ-üst: Ektoserviks ve eksternal os bölgesi (görselin kaynağı: <https://www.gokhandemirayak.com/rahim-agzi-serviks-kanseri/>); sol-alt: servikal örnek fırçasının fiksatif içerisinde çalkalanarak ThinPrep sıvı bazlı sitolojik örneğin hazırlanması (görselin kaynağı: <https://cenkaskalli.com.tr/smea-testi-nedir-smea-testi-nasil-yapilir/>); sağ-alt: ThinPrep sitolojik yayma preparatı (görselin kaynağı: <https://hsgm.saglik.gov.tr/>).

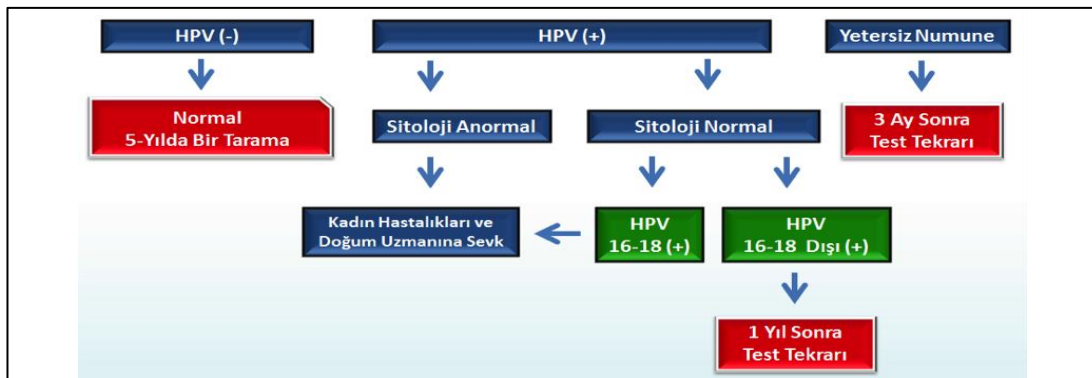
Pap-smear test, klinik teşhis koymaya değil de ileri testlere ihtiyaç duyulup duyulmayacağını belirleyebilen, yol gösterici bir yöntemdir. Kolay uygulanabilen, maliyeti düşük, ağrısız, enfeksiyon veya tahribat riski düşük, klinik olarak doğru-negatifi yakalama oranı (spesifisite) yüksek bir testtir ve ulusal programlarda uygulanmaya başlandığından bu yana morbidite ve mortaliteyi azaltmaya fayda

sağlamıştır (63). Ne var ki, sensitivitesi (doğru-pozitif yakalama oranı) düşük ve dolayısıyla yanlış-negatif sonuç verme oranı yüksek bir testtir. Literatürde Pap-smear testi için farklı sensitivite ve spesifisite oranları görülmektedir bunun sebebi de testin kullanıma göre (hekim, kullanılan sıvı bazlı sitoloji fiksatifinin markası [Hologic veya BD gibi] ve örnek hazırlama koşulları, laboratuvarın altyapısı, değerlendiren patolog) değişken olmasıdır. Günümüzde Pap-smear testinin %47.19 sensitivite ve %64.79 spesifisiteye sahip olduğu kabul edilmektedir (64). HPV genotipleme testi, polimeraz zinciri reaksiyonu (PCR) ve hibrid yakalama tekniklerine dayalı olarak Hr-HPV tiplerinden herhangi birinin örnekteki varlığı belirlenmektedir. HPV testi tek başına kanser gelişimi veya tedavi ihtiyacını belirleyebilecek bir test olmamakla beraber, Pap-smear testle beraber değerlendirildiğinde risk analizi yapılmasına yardımcıdır. Örneğin, ASC-US servikal sitoloji raporuna sahip HPV-pozitif hastaya olan yaklaşım, aynı sitolojiye sahip HPV-negatif hastaya yaklaşımdan farklıdır; HPV-negatif hasta için kolposkopi ve biyopsi gerekli görülmezken, HPV-pozitif hasta için kolposkopik görüntüleme ve biyopsi örneği alınması gerekli görülebilir. Ülkemizde hasta öyküsüne dayalı olarak hekim görüşüyle veya hastanın sigortasının kapsamına göre bazı hastanelerde ilk önce Pap-smear testi yapıp ardından testin sonucuna göre ($\geq$ ASC-US ise) HPV genotipleme testi yapılırken; bazı hastanelerde ilk önce HPV genotiplemesi, ardından Pap-smear yapılmaktadır, fakat özellikle 30-65 yaş aralığındaki kadınlar için esasen co-test uygulaması tavsiye edilmektedir. Ayrıca 2015 yılından bu yana ülkemizde, hastanelerin kadın doğum poliklinikleri dışında, Kanser Erken Teşhis Tarama ve Eğitim Merkezi (KETEM) gibi birinci basamak sağlık kuruluşlarında da Pap-smear testine erişilebilmektedir.

2.2.5.1.1 Sitolojik tanı sınıfları

SIL sonucu olan ThinPrep preparatlarında hücrelerde nucleus büyüklüğünde belirgin farklılık, mitotik artış, nükleer kromatin yoğunluğu ve düzensizlik mevcuttur. Servikal Pap-smear incelemesinde, büyük ve hiperkromatik nükleuslara sahip skuamöz hücrelerin çevresinde parlak bir boşluk (halo) bulunması, HPV ile enfekte olmuş hücreler için tipik bir görüntüdür ve bu görüntüdeki hücrelere genel olarak koilositoz adı verilir. Koilositotik atipiler genel olarak LSIL grubuna dahil

edilerek değerlendirilir. LSIL, genellikle HSIL'a göre daha sınırlı olup daha sık regresyon göstermekteyken, HSIL, daha ziyade progresyon göstermektedir (65). ASC-US smear sonucu için, hasta 6 ay veya 1 sene sonrası için takibe alınabilir ya da Pap-smear testi tekrarlanabilir veya kolposkopi yapılabilir (66). “atypical squamous cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion”: ASC-H (HSIL'in ekarte edilemediği ASC)” için ise hasta öyküsüne de bağlı olarak, kesin teşhis için mutlaka ileri testlere devam edilir çünkü bu tip smear sonucu yüksek riskli lezyonların dışlanamadığı atipik hücrelerin var olduğunu gösteren smeardır, ASC-US'tan daha ciddi bir sitolojik derecedir (54). Kanser progresyonunda ASC-US için oran %0.25, LSIL için %0.15, HSIL için ise %1.44 oranındadır (67,68). İyileşme yönünde regresyon için ise oranlar ASCUS'ta %68, LSIL'da %47, HSIL'da ise %35'tir (65,68). Bunlar haricinde kalan, glandüler hücre kökenli “atypical glandular cells”: AGUS (atipik glandüler hücreler)” smear bulgusu endoservikal adenokarsinom, endometrial adenokarsinom, intrauterin adenokarsinom ve orijini belirlenemeyen adenokarsinom gibi diğer tip maligniteleri düşündürebilmektedir, bu yüzden mutlak suretle bu smear sonucunu takiben kolposkopi ve eğer uygun görülürse servikal biyopsi, hatta bazı durumlarda endometrium biyopsisi gerektirir. Bazen mide, safra kesesi, kolon kanserleri gibi jinekolojik olmayan diğer kanserler bile AGUS'un nedeni olabilir. Bunun yanısıra, “atypical glandular cells of undetermined significance: AGUS (önemi belirlenemeyen atipik glandüler hücreler)” da ASC-US benzeri bir bulguyu glandüler hücreler için tanımlar ve genellikle klinik önem olarak önemi belirlenemeyen ve dolayısıyla üzerinde durulmayan bir bulgudur.



Şekil 3. Türkiye'de servikal kanser tarama programında hastane dışı birincil sağlık merkezlerinde izlenen adımlar (69)

Görselin kaynağı: <https://www.tjod.org/tjod-bilgilendirme/>

2.2.5.2 Kolposkopik görüntüleme ve biyopsi

Hr-HPV-pozitif ve anormal sitolojik smear bulgular saptanan hastalarda teşhis için çoğunlukla kolposkopiyle devam edilir. Kolposkopi, serviksin kolposkop adı verilen dürbün benzeri bir araçla, ışık altında 6-40 kat büyütülebilmek görsel olarak incelenmesi işlemidir. Kolposkopinin amacı, serviks üzerinde transformasyon zonunda ya da endoservikal kanalda bulunan lezyonların varlığının araştırılması ve biyopsi alınacak doku bölgelerinin tespit edilmesidir.

Kolposkopik görüntüleme için vajene spekulum yerleştirilir, serviks bir daire şeklinde hekimin göz hizasındadır. Tercihen, öncelikle serum fizyolojik ile yıkama yapılarak, bölge mukus salgısından arındırılır. Ardından %5'lik asetik asit ile yıkanır. Burada, asetik asidin epitel hücrelerdeki proteinleri geçici olarak denatüre etmesinden faydalanılır, zira eğer hücrede malignite gelişimi varsa bunlarda protein yoğunluğu çok daha fazla olacak ve yaklaşık bir dakika boyunca bu bölgelerde opak beyaz bir renk (aceto-white epitel) oluşacaktır (39,65,68). Bazı durumlarda servikse lugol solüsyonu uygulanarak glikojen ve iyot reaksiyonundan faydalanılarak kanserli hücrelerde glikojen olmamasına dayalı bir test olan Schiller testi de uygulanabilmektedir (65).

Kolposkopide hekimin servikal anatomi ve patofizyoloji bilgisi ön plandadır, zira yüzeyde herhangi bir anormal mozaik bir görünümün olması da atipi kriterlerindendir (65). Anormal kolposkopik görüntüleme bulguları asetik asit beyazı, iyot tutmayan alan (Schiller testi), lökoplaki, punktuasyon, atipik damarlanma, akantoz, skuamöz metaplazi, kronik servisit, enflamasyon, atrofi, granülasyon veya kondilom gibi farklı kavramlardan biri veya birkaçı da olabilir (70,71). Ancak günümüzde kolposkopi servikal maligniteler için tek başına bir tanı yöntemi olarak kullanılmamaktadır. Daha ziyade, histopatolojik değerlendirme için doku parçası (punch biyopsisi) alınacak bölgelerin tespit edilmesi için kullanılmaktadır.

Kolposkopik görüntüleme esnasında, asetik asit uygulamasında anormal olarak değerlendirilen bölgelerden biyopsi örneği alınmaktadır. Serviks, bir analog duvar

saati gibi işaret edilir ve eğer kolposkopide belirgin bir anormallik tespit edilememişse, saat yönünde 3, 6, 9 ve 12 hizalarından, transformasyon zonunu da içerecek şekilde örnekler alınır, son olarak, endoservikal kanalın minimal kazınarak doku alınması yöntemi olan endoservikal küretaj (ECC) prosedürüyle tamamlanır (72).

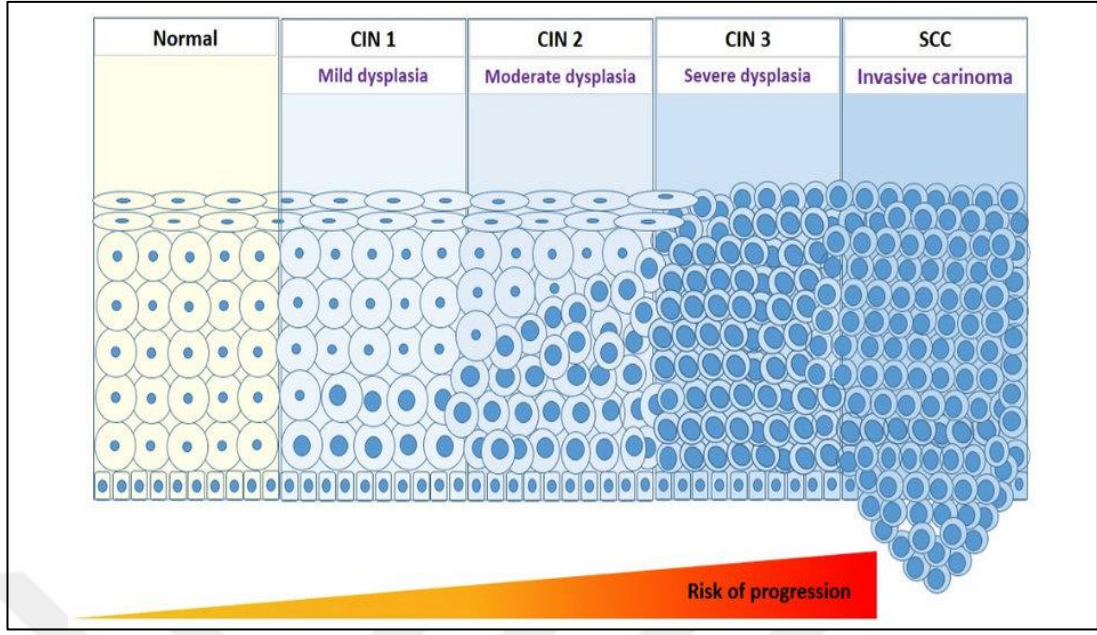
2.2.5.2.1 Biyopsi için histolojik dereceler

Kolposkopik biyopsi örneği değerlendirilirken CIN terminolojisi kullanılır. Türkiye’de anormal servikal smear vakalarına kolposkopi uygulanmasının ferkanısı %3.8 olup (71) kolposkopik biyopsinin CIN2+ olgularını saptamadaki sensitivite ve spesifite oranlarının sırasıyla %96 ve %48 olduğu bilinmektedir (73).

Pap-smear bulguları ile kolposkopik biyopsi bulguları arasındaki oranlar şu şekildedir; ASC-US tanılı hastalarda CIN2 veya CIN3 saptama olasılığı %5 veya %17; ASC-H için ise bu oran, %24 veya 94’tür (64). LSIL vakalarının biyopsi sonuçlarının %15’i CIN2, %30’u CIN3 olup, kendi kendine gerileme oranı çok yüksektir ve LSIL vakaları sadece %1 ihtimalle invaziv kansere ilerlemektedir (64). HSIL vakalarının, %70’i CIN2, %75’i CIN3 olup, HSIL vakaları sadece %2 ihtimalle invaziv kansere ilerlemektedir (64).

Lezyonlar ile CIN dereceleri arasındaki fark, lezyonlarda bazal membran bozulmamış iken CIN’lerde invazyon ihtimali vardır (39,70). Hafif displazi olan CIN1 dereceli dokuda, epitel tabakanın 1/3’ünde sınırları bozulmamış yapı bozuklukları vardır. Orta derecede displazi olan CIN2 dereceli dokuda bu yapı bozuklukları epitel tabakanın 2/3’ünde; şiddetli displazi olan CIN3 dereceli dokuda ise epitelin 3/3’ünde bulunmaktadır (74).

Dokunun tamamı atipik hücreler içeriyorsa bu örneğe CIS tanısı koyulur. CIN dereceleri büyük oranda kansere ilerlemek yerine geriler. Fakat CIN1 evre yani düşük dereceli neoplazi, %11 olasılıkla CIN2 ve CIN3 olarak yüksek dereceli neoplazilere ilerlerken (75,76); yüksek neoplaziler %1.6 invaziv kansere ilerleme olasılığı taşır (74,77,78).



Şekil 4. Servikal kanserin gelişimi (79)

2.2.5.3 İlmelektrocerrahi eksizyon prosedürü (LEEP)

“Loop electrosurgical excision procedure: LEEP (ilmelektrocerrahi eksizyon prosedürü)” veya “large loop excision of the transformation zone: LLETZ (transformasyon zonunun büyük ilmek eksizyonu)”, malignant doku bölgesini cerrahi olarak çıkarmak için, içinden elektrik akımı geçen ince bir tel halka kullanılan bir prosedürdür. Kanserleşme şüphesi olan vakalarda, yüksek dereceli neoplazinin kansere ilerlemesini önlemek amacıyla yapılan cerrahi müdahaledir ve aynı zamanda halihazırda çıkarılan doku histopatolojik olarak incelenerek kesin tanının konması için de kullanılır ve bu yöntem klinikte altın standart olarak değerlendirilir (80,81). Çıkarılan dokunun büyüklüğü lezyonların genişliğine ve endoservikal kanala yayılmış olup olmamasına bağlıdır. Fakat LEEP sonrasında servikte enfeksiyon gelişmesi veya gebelikle alakalı birtakım riskler söz konusudur. Serviksin doku bütünlüğünün bozulmasından kaynaklı olarak düşük yapma veya erken doğum ihtimali, gebelikte normalin altında bebek ağırlığı gibi istenmeyen durumlarla karşılaşılabilir (82,83). Yapılan pek çok çalışma sonucu, kolposkopi ve LEEP histoloji sonuçları arasında ortalama %60 civarında örtüşme mevcuttur (81,84,85). Bir çalışmada ise, 389 Hr-HPV-pozitif LSIL vakasının LEEP sonuçlarının %63’ünde CIN2, CIN3 veya invaziv kanser rapor edilmiştir (74).

2.3 Literatürdeki Servikal Örnekler Kullanılarak Servikal Kansere Yeni Bir Tarama Testi Geliştirme Amacıyla Yapılan Çalışmalar

Servikal kanser taraması için Pap-smear testinin yüksek oranda hatalı sonuç vermesi nedeniyle ve HPV'nin kendi kendini temizlenme oranının yüksek olmasıyla enfeksiyonun tek başına bir risk analizi yapmaya yeterli olmaması nedeniyle, literatürde servikal prekanser evrelerinin tespiti ve prognozu için yeni biyobelirteçler ile yeni bir tarama yöntemi arayışı mevcuttur. Bununla ilgili olarak son 20 yıldır yeni alternatif tarama yaklaşımlarının araştırılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (86,87). Bu bağlamda, biyobelirteç arayışı için alternatif örnekleme yöntemlerine başvurulmakta ve çeşitli omiks tekniklerle bu örneklerde tespit ve prognozda kullanılabilecek moleküller aranmaktadır.

2.3.1 Sıvı örnekleme yöntemi: servikovajinal lavaj aspirasyonu

Servikovajinal sıvı (SVS) örnekleme, sitolojik sürüntü olan smear örneklemeye kıyasla daha zengin bir içeriğe sahiptir (88–91). Zira sürüntü örneklemede yalnızca swab fırçayla serviksin epitel tabakası üzerindeki hücrelerin alınması sağlanırken, SVS örneklemede, özellikle de lavaj aspirasyonun yöntemiyle, daha fazla sekresyon ve dökülmüş hücreler elde edilir. Ayrıca, toplanması daha kolay olup smear'in aksine servikal yüzeyde hiçbir tahribat meydana getirmez. Buna göre, ilk defa 1970'lerdeki birkaç yayında kullanılmış olan bu örnekleme özellikle son 16 yıldır genomik, transkriptomik, epigenomik, proteomik, metabolomik, lipidomik ve mikrobiyomik yapısı çeşitli jinekolojik durumlar için farklı yöntemlerle araştırılmaktadır (92,93). Bilhassa, erken doğum biyobelirteçlerinin tespiti üzerine yapılan çalışmaların sayısı yoğunluktadır. Günümüzde “cervicovaginal fluid preterm birth” anahtar kelimeleriyle arama yapılırca PubMed'de 108, Mendeley'de ise 180 yayın sıralanmaktadır.

Biyolojik salgılar veya diğer deyişle vücut sıvılarıyla, bu materyallerin elde edildikleri bölgenin/sistemin/organın sağlık durumunu değerlendirmek amacı güden ve doku biyopsisine kıyasla daha kolay, daha az invazif, daha düşük enfeksiyon riski

bulunan ve çoğu zaman daha ekonomik olan “sıvı biyopsi” yaklaşımı popülerdir. Elbette, omiks teknolojilerinin yükselişiyle beraber vücut sıvılarının içeriğinin ileri seviyede araştırılması ve sıvı biyopsiye dayalı testlerin geliştirilmesinde paralel bir artış olmuştur (94,95).

Kan, idrar ve beyin-omurilik sıvısına ek olarak literatürde bazı hastalıkların taranmasında gözyaşı, tükürük, burun mukozası, ter, sebum, meme ucu salgısı veya süt, dışkı, semen, servikal mukus gibi diğer vücut salgıları da araştırma amacıyla değerlendirilmekte ve çeşitli amaçlarla tüm-içerik analizleri yapılmaktadır (96).

SVS, ağırlıklı olarak mukoza içeren fakat bununla beraber kadın genital sisteminin homeostazı ve bölgesel immün savunma sistemi için gerekli diğer biyomolekülleri de içeren, 4.5 ve aşağısı pH düzeyini sağlayan *Lactobacillus* cinsi hakim florası ve yüksek laktat düzeyi ile karakterize olan, ~%95'i su, ~%5'i ise iyon, çözünür biyomakromoleküller ve ağırlıklı olarak proteinleri içeren bir vücut salgısıdır (90). SVS içeriğindeki çözünür makromolekülleri arasında DNA, RNA, küçük moleküller, proteinler ve özellikle de büyük miktarlarda glikoproteinler, proteoglikanlar ve lipitler vardır. Bu bileşenlerin oranları fizyolojik koşullar tarafından düzenlenir, SVS materyalini önemli kılan da budur. İnsan servikovajinal serklajın miktarını, bileşimini, içerik oranlarını ve özelliklerini birçok faktör etkileyebilir; sadece bakteriyel, fungal, viral enfeksiyonlar veya kanser gibi patolojik durumlar değil, aynı zamanda adet döngüsü, hormonal dengesizlik, puberte ve menopoz, doğurganlık/kısırlık, cinsel ilişki, gebelik ve doğum, hatta sigara içmek bile SVS kompozisyonunu değiştirebilir (90,97–99).

SVS bileşenleri başlıca vajinal epitel ve servikal mukus olmakla birlikte endometriyum ve fallop tüplerine kadar üst genital bölgedeki dokulardan salgılanan mukozal bir sıvılar ve dökülen hücreleri içerir. Ağırlıklı olarak müsin proteinlerinin oluşturduğu mukus, genital sistemin birincil basamak immün savunmasını sağlamaktadır. Ayrıca immünoglobulinler, antimikrobiyal peptitler, lökosit proteaz inhibitörleri ve defensin proteinlerini bu nedenle SVS'nin protein içeriği, bakteri ve HPV gibi virüslere karşı immün savunmada oldukça önemlidir.

Şu anda SVS içeriğinde binden fazla farklı protein tanımlanmıştır ve bu proteinlerin bazıları vajinal disbiyoz (15), amniyotik inflamasyon (100), erken doğum (101) preklampsi (102), yumurtalık kanseri (103), endometrium kanseri (104), HIV enfeksiyonu (105), HPV enfeksiyonu (14,38) veya servikal kanser (106,107) gibi patolojik durumlarla ilişkili olduğu keşfedilmiş potansiyel biyobelirteçlerdir.

SVS, kadın genital sisteminin patolojilerine işaret eden olası biyolojik belirteç moleküller için önemli bir kaynağa sahiptir. Fakat SVS materyali stabil bir vücut sıvısı değildir, kan veya idrar gibi iyi tanımlanmış ve içeriğindeki olası ve olması imkansız bileşenler belirlenmiş bir materyal de değildir. Üstelik, SVS için birey-içi ve bireyler-arası varyasyon da önemli bir handikaptır (108).

Dolayısıyla, özellikle herhangi bir molekülün SVS'deki miktarının kantite edilmesine dayalı analizler için, literatürde bu varyasyonları belli bir ölçüde minimize etmeye yönelik birtakım yöntemler geliştirilmiştir. Özellikle SVS'nin en etkin biçimde elde edilmesini sağlayan lavaj aspirasyonu örneklemede, varyasyon listesine dilüsyon faktörü de eklenmektedir. Bu doğrultuda, lavaj solüsyonuna kolay ölçülebilir, SVS'nin doğal içeriğinde bulunması beklenmeyen ve çok reaktif olmayan bazı maddeler eklenerek dilüsyon faktörünü hesaplama yahut her örneğe örnek-içi-değer düzeltmesi uygulanarak örnekleri normalize etmek gibi uygulamalar geliştirilmiştir. Servikoavjinal alanın yıkanması için kullanılacak avaj solüsyonuna referans olarak Lityum iyonu eklenmesi veya glukonat içeriğinden dolayı lavaj solüsyonu olarak Normosol-R kullanılması yahut her örneğin total protein konsantrasyonunu veya total kolesterol konsantrasyonunu ölçüp bu değerlerin esasen araştırılmakta olan parametreye oranlanarak ölçümlerin örnekler arası normalize edilmesi hedeflenmiştir (109–113).

Günümüze dek, SVS içeriğini tanımlamak amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır (87). Literatürde SVS örneği elde etmek amacıyla yaygın olarak iki yöntem kullanılmaktadır: Aspirasyon ve emdirme. Aspirasyon yönteminde serum replasmanı elektrolit çözeltiler, PBS veya kolposkopi sırasında kullanılan %5'lik asetik asit ile yıkama yapıp sıvının çekilmesiyle gerçekleştirilir. Bu yöntemlede kullanılan

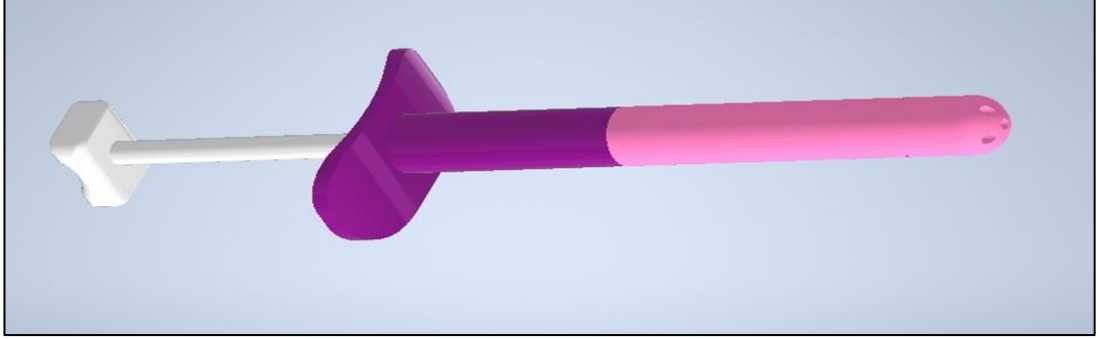
araçlardan biri, HPV enfeksiyon testi için özel olarak geliştirilmiş “self-sampling device” olarak bilinen (88,89) hijyenik plastik aspiratörlerdir (bakınız: “Deplhi Screener”). Bu aparatlar içerisinde lavaj solüsyonu bulunduran ve bireylerin kendi kendine de SVS örneği alabilmesini mümkün kılan, ticari olarak satın alınabilen kişisel ürünlerdir. Bunun haricinde, literatürde plastik pastör pipeti, luerlock enjektör, burun aspiratörü gibi aparatlar kullanılmıştır. Emdirme yönteminde ise pamuk veya polyester uçlu eküvyon çubukları, cerrahi süngerler, oftalmolojik köpükler, gazlı bez, tampon, medikal pamuk, fitil gibi ürünler kullanılmıştır. Bu materyallere emdirilen SVS, sonrasında çeşitli tampon çözeltilerde bekletme, santrifüjleme ve enjektör ile sıkıştırma teknikleriyle geri kazanılmıştır (89,109,110,114).

İdeal bir tarama stratejisi, kansere ilerleyebilecek yüksek riskli semptomları teşhis etme üzerine kurgulanmalıdır. Son 20 yılda, farklı fizyolojik koşullara yanıt olarak SVS'nin protein ekspresyon profillerindeki değişiklikleri tespit etmek için birçok çalışma yapılmıştır (92). SVF'nin serviksin lezyonların olduğu doku bölgesindeki hücrelerle temas halinde olduğu göz önüne alındığında, malign transformasyonun değerlendirilmesi için iyi bir biyobelirteç kaynağıdır (87). Ayrıca, HPV enfeksiyonu ve servikal kanser taraması için serum ve idrar numune biyobelirteçleri geniş çapta araştırılmış olsa da, bu biyolojik numuneler transformasyon alanına özgü değildir ve vücuttaki diğer fizyolojik durumların varlığını da gösterebilir (91,115). Buna karşılık, SVF'nin protein bileşimi, direkt mevzubahis dokudaki patolojik değişikliklerde yer alan biyokimyasal yollara ilişkin bir fikir sağlar.

2.3.2 SVS örnekleme aparatı

Doktora çalışmaları sırasında, yeni bir buluş olarak SVS örnekleme aparatının prototipi geliştirilmiştir (bakınız Şekil 5). Bu aparat, rutin jinekolojik muayene esnasında hekim tarafından uygulanabileceği gibi, evde bireysel olarak da rahatlıkla kullanılacak bir sıvı örnek elde etme yöntemidir. Örnek, servikovajinal alanda lavaj aspirasyonu yöntemiyle SVS örnek materyalinin basitçe elde edilmesini sağlar. Aparat, içerisindeki lavaj solüsyonu servikovajinal bölgeye önce boşaltılıp

sonrasında geri çekilme prensibiyle çalışan ve böylece bölgeye dökülmüş olan hücreler ve ekstrasellüler sekresyonlar toplanmış olacak bir yaylı aksamdır.



Şekil 5. Ürünün üç boyutlu çizimi

Autodesk Fusion yazılımı ile hazırlandı

Rutinde kullanılan Pap-smear ve HPV genotipleme testlerinde kullanılan tüm malzemeler ülkemizde ithal edilmektedir ve yılda yaklaşık 1 milyon kadın için kullanılmaktadır. Smear örneklemede, endoservikal fırçayla rahim ağzının dış yüzeyinden sürüntü alınarak hücre örneği elde edilmekte; aynı örnek, DNA içeriği ile HPV genotipleme testi için de kullanılmaktadır. Smear örneklemede endoservikal fırça, serviksin yüzeyinde irritasyona sebep olur ve çoğu zaman kılcal kanamaya yol açar (116). Doku tahribatından dolayı, smear örnekleme kısa süre içerisinde üst üste birkaç kez örnek almaya uygun değildir, tekrar örnek alabilmek için belirli bir süre (genellikle en az 2 hafta) geçmesi gerekmektedir. Kan ve mukus bulaşından dolayı alınan örnek materyali ile direkt çalışılamaz, bu sebeple firmalar özel olarak bir filtre geliştirmiştir ve bu filtre tek kullanımlık olup maliyeti yüksektir. Oysaki diagnostik testler için hücre, DNA, RNA, protein, metabolit gibi her türlü örnek materyali ihtiyacının lavaj metodları ile giderilebileceği literatürde pek çok çalışmada gösterilmiştir (117–119). Üstelik, smear örneklemede vajinaya spekulum yerleştirilerek hazne açılmalıdır ve bu uygulama da çoğu zaman bireyler için rahatsızlık verici bir yöntem olarak ifade edilmekte ve tarama programına katılımdan kaçınma sebeplerinden biridir (120,121).

Literatürde fırça ile smear örnekleme ve lavaj-bazlı servikovajinal sıvı örnekleme kullanımı pek çok çalışmayla araştırılmıştır. Bazı karşılaştırmalı

çalışmalarda smear ve servikovajinal sıvı arasında uygulanabilirlik ve hasta konforu açısından bu ikisi arasında çok büyük farklılıklar olmadığı, kadınların her ikisini de olumlu karşıladığı, fakat spekulumu rahatsız edici buldukları saptanmıştır (89,122–124). Ayrıca farklı yöntemlerle elde edilen hücre sürüntüsü ve lavaj örneklerinden yapılan HPV DNA testlerinin sonuçları kıyaslanmıştır ve lavaj örnekleme hücre sürüntüsünden farklı sonuçlar vermediği ortaya çıkarılmıştır (124–127). Bunlara ek olarak, aynı swab çubukları ile hem sağlık personeli hem de bireyin kendi kendisinin örnek alması ve bu örneklemelemlerin karşılaştırılması üzerine yapılan çalışmaların sonucuna göre, HPV genotipleme test sonuçları yüksek oranda (%60-80) uyumludur ve kadınlar kendi kendine örnekleme konusunda isteklilerdir, hatta bu yöntem tarama programlarına katılımı artırabilecektir (127–130). Tüm bunlara dayanarak, yeni bir örnekleme yöntemi ihtiyacı mevcut olduğu düşünülmektedir: Daha verimli, daha kolay, daha konforlu, daha güvenli ve daha ekonomik bir örnekleme yöntemi.



Resim 1. Ürünün üç boyutlu yazıcıdan basılan prototipleri

Basım, Acıbadem Üniversitesi Kuluçka Merkezinden hizmete ark.ımı ile yapılmıştır. ek-bırak yaylı sistemi ile kolaylıkla kullanılan PVC aspiratör pipet. ller: Toplam uzunluk 18 cm, dış çap genişliği 1.2 cm, içerisinde 2.8 mL hacimde lavaj solüsyonu ile sıvı haznesi toplamda 5 mL'dir.

Tasarlanan ve prototipi üretilen bu rnle (şekil 6), servikovajinal alanda doku bütünlüğü bozulmadan, kanamaya yol açmadan, servikovajinal salgı sıvısının kolaylıkla elde edilmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca, bir sebepten ötürü rutin jinekolojik muayene için hastaneye gidemeyen bireyler eczaneden veya internve ark.işverişi ile ürünü bir web sitesinden temin edip ev ortamında bizzat kendileri

kolaylıkla örnek alıp bu örneği hastaneye veya özel bir laboratuvara postalayabileceklerdir. Buna ek olarak, hastaneye ulaşımı kolay olmayan mahrumiyet bölgesinde yaşayan kadınlar için de bir kolaylık sağlanmış olacaktır. Dünya genelinde bu uygulamaların rutine dahil edilişi giderek yaygınlaşmaktadır (131–135).

Ürünün dizaynı, içerisinde lavaj solüsyonu ihtiva eden yaylı bir sistem ile iç aksam ve plastik mama/şurup şırıngası (dozaj pipeti) benzeri bir dış aksamdan oluşmaktadır. Lavaj solüsyonu, servikovajinal alandaki salgılarla karışacak, karışan bu sıvı yaylı sistem sayesinde örnek toplama haznesine çekilecektir. Elde edilen örnek sonrasında tıpkı geleneksel yöntemlerde de olduğu gibi, örnekteki hücrelerin laboratuvardaki test aşamasına dek uygun koşullarda muhafaza edilebilmesi için, içerisinde koruyucu solüsyon bulunan “örnek toplama tüpü”ne aktarılacaktır. Bu örnekleme yöntem ve sürecinin geleneksel yöntemden farkı, fırça ile sürüntü almak yerine aplikatör ile lavaj aspirasyonu uygulanması ve lavaj solüsyonunun içeriğidir. Kit içeriğinde yer alacak aplikatörün benzeri Dünya genelinde daha önce yalnızca tek bir firmada (Delphi Dd Bioscience Global Pte. Ltd.) mevcuttur. “Delphi Screener” isimli bu ürün, son kullanıcıya hitaben geliştirilmiş bir servikovajinal lavaj aspiratörüdür. Aparat, içerisinde lavaj solüsyonu olarak izotonik salin içeren, yaylı iç aksama sahip otomatik bir şırıngadır. Bu ürün, üretici firmanın kendisi ve ayrıca Rovers Medical Devices firması tarafından 140,00 ile 180,00 dolar fiyat aralığında web sitesinde satışa sunulmuştur. Literatürde bu ürün ile alakalı 2011 yılından bu yana pek çok bilimsel makale yayınlanmış olup, 10 yıl içerisinde Dünyanın pek çok yerinde yaklaşık 40.000 kadın tarafından kullanılmış ve kullanıcılar tarafından olumlu karşılanmıştır (136,137).

Tasarımı Yapılan Örnekleme Kitinin Halihazırda Ulusal Kanser Tarama Programında Kullanılan Geleneksel ThinPrep Pap-smear Yönteminden Fark ve Üstünlükleri:

- 1) Bu ürün, smear örnekleme ile değil, lavaj aspirasyonu (yıkı ve geri çek) yöntemi ile çalışır. Bu yöntem smear örneklemenin aksine (a.) spekulum

kullanımı gerektirmez, (b.) endoservikal yüzeyde doku tahribatı ve kanama meydana getirmez, (c.) tekrar tekrar örneklemeyi mümkün kılar ve (d.) daha bol miktarda örnek eldesi sağlar.

- 2) Servikovajinal alanı yıkamak için kullanılacak olan lavaj solüsyonu, izotonik salin içermektedir. Örnek toplama tüpünün içerisinde bulunan örnek koruyucu solüsyon mukolitik bir ajan olan N-asetilsistein içerir, ki bu ajan bölgeden salgılanan yoğun mukozayı çözüp berrak bir sıvı haline getirir. Böylece mukozal viskoziteden dolayı örneğin çalışılmasında zorluk meydana gelmez.
- 3) Günümüzde smear testinde kullanılan endoservikal fırçaların aksine, ürünün üretildiği ham madde, doğada çözünebilen, antialerjik ve antibakteriyel polimerden üretilir, böylece plastik atık oluşturmamak hedeflenir.
- 4) Alınan örnek, sitolojik inceleme ve HPV genotipleme testleri için, bu amaçlara uygun olan koruyucu solüsyona aktarılır, ki bu solüsyon metanol ve sodyum azit gibi biyolojik materyali (hücrelerin patlaması, DNA materyalinin degrade olması, bakteri üremesi vb.) koruyan maddeler ve mukolitik ajan içerir. Böylelikle örnek materyalinin soğuk zincir koşullarında saklanması gerekmez.
- 5) Bu ürün ülkemizde yurt dışından ithal olarak temin edilen Pap-smear test kitlerinin (Hologic ThinPrep® & PapTest PreservCyt® Solution, BD SurePath™ vb.) yerini alma potansiyeli olan bir üründür. Üstelik kullanımı medikal uzmanlık gerektirmediği için kadınlar tarafından evde uygulanıp alınan örneğin hastaneye gönderilmesi ile özellikle rutin muayenelerin pandemi gibi koşullarda aksatılması açısından da çok daha erişilebilir, kolay, konforlu, güvenli ve ekonomik bir örnekleme yöntemi olacaktır.

Tasarımı yapılan aplikatör ürünün piyasadaki rakibi delphi screener'dan fark ve üstünlükleri:

- 1) Tasarlanan ürünün beraberinde, kit içerisinde bir örnek koruyucu solüsyonu da mevcut olacaktır. Bu solüsyon, örnekteki serbest hücreleri fiks eden metanolü ve örnekte bakteri üremesini ve bozunmayı engelleyen sodyum

azidi ve mukozal yapıyı çözecek N-asetilsistein'i içerecek, bu sayede örnek bozulmadan korunacağından soğuk zincir koşulu gerektirmez ve bireyler tarafından laboratuvar veya hastaneye kargolanabilecektir.

- 2) Tasarlanan ürünün içerdiği lavaj solüsyonu, izotonik salin çözeltisi yerine hücre eldesi daha yüksek olan ve kronik servisit mevcudiyetinde tuzdan ötürü yanma hissi vermeyecek olan fosfatlı tampon (PBS) çözeltisi içerecektir.
- 3) Tasarlanan ürünün hammaddesi antialerjik, antibakteriyel, doğada çözünebilen ve geri dönüşümü mümkün bir biyopolimerden elde edilecek olup, hem kullanıcı dostu hem de çevre dostu bir ürün olacaktır.
- 4) Tasarlanan ürün, ülkemizde yerli ve milli bir üretim olacağı için çok daha düşük bir maliyet ile ulaşılabilir olacağı düşünülmektedir, üstelik Hollanda menşeli Delphi Screener ürününün tek rakibi olacaktır. Özellikle Türkiye'nin potansiyel müşterisi olan ve kendi kendine örnekleme yönteminin yaygınlaşmaya başladığı Asya-Pasifik ülkelerinde uygulanacak pazar stratejileri ile uluslararası ihracatta talebi karşılayarak hızlıca yerini alabilecektir.

Ürünün sürdürülebilirlik ve ticarileşme potansiyeli:

- 1) Sürekli olarak kullanılacak bir ürün oluşu:

Servikal Örnekleme Kiti, servikal kanser yaygınlığını yitirene dek kullanılabilecek bir üründür. HPV aşılarının gelişmesine ve uygulandığı bölgelerdeki kanser artışını azaltmasına rağmen, ne yazık ki servikal patolojiler görülme sıklığından dolayı klinik önemini halen korumaktadır. Zira HPV virüsü son derece bulaşıcı ve yaygın olarak görülen bir virüs olup, servikal lezyonların ana (%99) sebebidir. Bu sebeple, ürün piyasaya çıkmasından itibaren yurt içi ve yurt dışında sürekli olarak kullanılacak ve ürüne olan ihtiyaç daimî olacaktır.

- 2) Ulusal ticari kazanımlar:

Bu ürünle, ulusal servikal kanser taraması kapsamında, ülkemizde yılda ortalama 1 milyon kadının Pap-smear test yaptırdığı büyük bir markete hitap edilecektir (2,6). Bu yerli üretim ile ülkemizin çok yüksek adetlerde ithal

ederek temin ettiği ürünler bir alternatif sunarak, ülkemizin bu alandaki harcamalarının azaltılması sağlanabilecektir.

3) Örneklem kiti ile beraber çalışan bir hızlı tani kiti geliştirilmesi:

Bu projede geliştirilecek ürünü takiben, bu aplikatörle birlikte çalışacak, biyosensör niteliğinde bir in vitro tani kiti geliştirilmesi de hedeflenebilecektir. Bu kit, bireylerin evde kolaylıkla servikal kanser taramalarını gerçekleştirmeye yönelik bir uygulamayı kolaylaştıracaktır. HPV enfeksiyonu varlığını basitçe gösterecek olan cihaz, servikojinal lavaj sıvısı ile çalışan, HPV onkoproteinlerine karşı hedeflenmiş, yatay akışkanlı işlem (lateral flow assay) prensibiyle çalışan, mikroakışkan immünokromatografik biyosensör olacaktır. Bu açıdan, ekibin bu projeyi tamamladıktan ve örneklem kitini satışa sunduktan sonra ikinci aşamadaki hedefi, aplikatörle beraber çalışan bu test kitini de geliştirmek ve üretmektir.

Not: Ürün tasarımı için fikri mülkiyet hakkı başvurusu yapılmıştır. Henüz sadece prototip aşamasında olup, klinik deneyleri yahut performans testleri yapılmamıştır. Ürünün klinik ortamda test edilebilmesi için hijyenik medikal ürün üretimi yapılan bir üretim tesisinde pilot üretimi yapılmalı ve Sağlık Bakanlığı ve Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) mevzuatına uygun olarak klinik araştırmalar etik kuruluna başvurulmalıdır.

2.3.3 Proteomik çalışmaları

Servikal kanser gelişimindeki protein biyobelirteçlerin araştırılması için SVS örnek materyalinden yapılan çalışmalar Tablo 2’de özetlenmiştir. SVS mukozal salgıların yoğunlukta bulunan bir sıvı olmasıyla beraber, SVS proteomu yalnızca hücre dışı proteinleri içermez, aynı zamanda intraselüler proteinler, iskelet veya membran proteinleri de mevcuttur (138). Kanser gelişimiyle ilişkili olabilecek istatistiksel olarak anlamlı (significant) proteinler de muhakkak biyokimyasal yollarda aktif rol oynayan proteinler olmak zorunda değildir; hücre iskeleti, sitoplazma veya membran proteini olabilir, enzim/inhibitör veya immün savunmayla ilişkili bir protein olabilir (139). Tablo 2'deki çalışmalardan anlaşıldığı üzere, SVS proteomu iki fraksiyona ayrılabilir: çekirdek (core) proteom ve değişken (variable)

proteom (140). Lokalize floral mikrobiyomun katkıda bulunduğu proteom da dahil olmak üzere, çekirdek proteom daha bol miktarda bulunurken, değişken proteom esnektir ve daha düşük miktardadır (138,141–143). Çekirdek proteom geniş ölçüde glikoproteinler, proteoglikanlar ve immünoglobulinlerden oluşur. Siyalik asit gibi karbonhidrat grupları ile birleşen müsin proteinleri, mukus bileşiminde yer alır ve herhangi bir üyenin değişmesi mukusun fiziksel özelliklerini bozabilir (90,144) ve böylece lokal homeostazı etkileyebilir. Bir biyobelirteç, hem çekirdek hem de değişken proteomdan ortaya çıkabilir. Yüksek ve düşük miktarlarda bulunan proteinler, servikovajinal bölgenin herhangi bir atipik durumundan kaynaklanabilir; bununla birlikte, daha yüksek miktarda saptanan proteinler örnek alım yöntemindeki varyasyon ve serviksin epitel hücre tabakasının bozulma derecesi nedeniyle de ortaya çıkmış olabilecektir. İşte bu noktada örnek toplama yönteminin önemi ortaya çıkmaktadır. Zira, servikovajinal bölgenin lavaj aspirasyonu, serviks ve çevresindeki hücre tabakasında minimal bir bozulmaya sebep olmakta, yalnızca sekresyonları ve kendiliğinden dökülmüş olan hücreleri toplamayı sağlamaktadır.

Tablo 2'de SVS'de servikal kanser gelişiminde istatistiksel olarak anlamlı bulunan proteinlere yer verilmiştir. Bu çalışmalar, shotgun proteomik tekniği ile, SVS proteomunun indeksini çıkarmak üzere tasarlanmış ve bunlardan bazıları sağlıklı ve hasta gruplarının proteomunu mukayese ederek serviksin malign transformasyonundaki aday protein biyobelirteçleri belirlemiştir.

Bu çalışmalardan yalnızca üçü, yeni bir tarama testinin geliştirilmesini amaçlayan potansiyel biyobelirteçlerinin kantitatif doğrulamasını da gerçekleştirmiştir (106,107,145). Bu üç çalışmaların ilki, Van Ostade ve arkadaşları tarafından 2014 yılında (106), Hr-HPV ile enfekte ve premalign servikal lezyonların farklı evrelerinde olan bireylerden alınan örneklerdeki SVS proteom profillerindeki farklılıkları ortaya çıkarma amacıyla yapılmıştır. Bu doğrultuda, 6 sağlıklı birey, 4 LSIL hastası ve 2 HSIL hastasının kolposkopik muayeneleri esnasında toplanan SVS lavaj aspirasyonu örnekleriyle shotgun proteomik analizi gerçekleştirilmiştir. Proteomik analiz, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi (MALDI-TOF/TOF) kütle spektrometresi

(MS) kullanılarak yapılmış ve hasta grupları arasında anlamlı olan (farklı seviyelerde eksprese edilmiş) 16 adet protein saptanmıştır. Bunlar arasında istatistiksel olarak en ayırıcı (p-değeri: 0.001) olan aktin-alfa-4 (ACTN4) proteininin erken evre servikal kanser taraması için en uygun biyobelirteç olduğunu öne sürülmüştür. Ardından, toplanan 16 adet sağlıklı ve 12 adet HPV ile enfekte prekanseröz bireyden toplanan yeni numunelerde ACTN4'ün miktarı ELISA testi ile ölçülmüştür. Bu çalışmadan bulunanlarla klasifikasyon analizi yapılarak alıcı işlem karakteristik ("Receiver Operating Characteristic", ROC) eğrisi çizilmiş, %84 sensitivite, %86 spesifisite ve %86'lık bir eğrinin altında kalan alan (area under curve: AUC) değeriyle ACTN4'ün serviksin prekanseröz lezyonları için bir tanısal biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür.

İkinci çalışma ise, 2019 yılında Starodubtseva ve arkadaşları (107) tarafından, serviksin neoplastik dönüşümündeki erken biyobelirteçleri ortaya çıkarmak için etiketsiz (label-free) yarı-kantitatif bir protein ekspresyon analiziyle yapılmıştır. Jinekolojik muayene esnasında hastalardan alınan servikovajinal lavaj aspirasyon numuneleri toplandı ve çalışma iki kısma ayrılmıştır: İlk aşamada 24 tane kontrol, 18 tane LSIL, 16 tane HSIL ve 15 tane kanserli bireyden; ikinci aşamada ise 14 tane kontrol, 8 tane LSIL, 6 tane HSIL ve 5 tane kanserli bireyden örnek toplanmıştır. İlk aşamada, nano-ölçekli HPLC ve tandem MS ile shotgun proteomik analizi yapılarak potansiyel protein biyobelirteçler belirlenmiştir. Burada belirlenen biyobelirteçler, ikinci aşamada ELISA testiyle her bir örnekte ölçülerek kantitatif olarak doğrulanmıştır. Çalışmada istatistiksel olarak en anlamlı bulunan protein alfa-aktin-4 (ACTN4). ELISA testi sonuçlarına göre, ACTN4 grupları birbirinden %77 sensitivite ve %94 spesifisiteye sahip olan potansiyel bir biyobelirteç olarak tanımlanmıştır.

Literatürdeki kantitatif SVS protein biyobelirteci çalışmalarının üçüncüsü, Gutiérrez ve arkadaşları (145) tarafından 2021'de yapılmıştır. Bu çalışmada, diğer çalışmalardan farklı olarak, SVS örnekleri pamuk bazlı FTA (Flinders Technology Associates) mikrokartlarına endoservikal fırça ile absorbe edildi filtre bazlı protein digestion yöntemini kullandılar. Çalışma, 40 adet kontrol yani hasta olmayan ve 59 adet HPV-negatif bireylere ait örneklerin Hr-HPV-pozitif ve CIN2+ histopatolojik

evrelerde olan hasta bireylerden ayıran biyobelirteçlerin keşfi üzerineydi. Peptit separasyonu için nano ölçekli ters fazlı sıvı kromatografi (RP-LC) sistemi, tandem MS analizi için ise Q-Exactive Plus orbitrap kullanıldı. Sonuç olarak %90 sensitivite ve %55 spesifisite ile CIN2+ histopatoloji gruplarını sağlıklı numunelerden ayırt edebilecek için “prediktif 7-proteinli model” geliştirdiklerini belirttiler. Fakat geliştirdikleri bu modeli herhangi bir immün deteksiyon veya MS bazlı kantitasyon ile doğrulamadılar.

Bu çalışmalarla ilgili olarak, bunlardan ikisinde (106,107) ACTN4 ve ANXA2 proteinleri ortak hedeflerdir (bakınız: Tablo 2). Bilindiği üzere, shotgun yöntemiyle yapılan keşif proteomiği (discovery proteomics) çalışmalarında varyasyon olasılığı çok çeşitli sebeplerden dolayı yüksektir. Üstelik örnekleme yöntemi, cihazın marka ve modeli, kullanılan separasyon yöntemindeki farklılıklar bu varyasyonu daha da arttırmaktadır. Bu noktada, saptanan olası markır proteinlerin kantitatif bir yöntemle, özellikle de immüneteksiyon ile farklı bir örneklemede doğrulanması, elde edilen sonuçları tasdikleyici niteliktedir.

Tablo 2. Servikal kanser gelişiminde SVS'teki potansiyel protein biyobelirteçleri tespit etmek için yapılan proteomik çalışmaları (146)

	Yazar Bilgisi	Örnek Toplama	Separasyon Yöntemi	Kütle Spektrometresi	Bulgular	Anlamli Proteinler
1	Venkataraman ve ark., 2007	SVS; Sağlıklı bireylerden menstrual cup ile toplanmış	2D SDS-PAGE	MALDI-TOF/TOF	Shotgun proteomik: 18 polipeptit tanımlandı	
2	Tang ve ark., 2007	SVS; Sağlıklı bireylerden lavaj aspirasyonu ile toplanmış	2D SDS-PAGE	MALDI-TOF/TOF	Shotgun proteomik: 59 protein tanımlandı	
3	Shaw ve ark., 2007	SVS; Sağlıklı bireylerden gazlı bezle toplanmış	SDS-PAGE, SCX-LC ve RP-LC	ESI-Linear IT	Shotgun proteomik: 685 protein tanımlandı	
4	Zegels ve ark., 2009	SVS; Kolposkopi esnasında asetik asit yıkaması toplanmış	C4 ve ardından C18 kolonu ile RP-HPLC	MALDI-TOF/TOF	Shotgun proteomik: 339 protein tanımlandı	

Tablo 2. Servikal kanser gelişiminde SVS'teki potansiyel protein biyobelirteçleri tespit etmek için yapılan proteomik çalışmaları (146) (devam)

Yazar Bilgisi	Örnek Toplama	Separasyon Yöntemi	Kütle Spektrometresi	Bulgular	Anlamlı Proteinler
5 Boylan ve ark., 2014	Sıvı bazlı sitolojik numune (SurePath); Sağlıklı bireylerden fırça ile toplanmış	HPLC	LTQ Orbitrap Velos	Shotgun proteomik: 714 protein tanımlandı; 153'ü "servikojenik bölgenin sağlıklı çekirdek proteomu" olarak belirlendi	
6 Van Raemdonck ve ark., 2014	SVS; Kolposkopi esnasında asetik asit yıkaması toplanmış	C4 ve ardından C18 kolonu ile RP-HPLC	MALDI-TOF/TOF	Shotgun proteomik: 371 protein tanımlandı	ACTN4, SERPINB3, ANXA2, PKM2 PGK1, VTDB, CFAH, YWHA, CFH, CRABP2, NAMPT, SERPINB13, ACTR3, HP, ATP5F1B, UBIQ
7 Borgdorff ve ark., 2015	SVS; Lavaj aspirasyon ile çeşitli cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlara sahip kadınlardan toplanmış	nanoACQUITY-nanoLC sistemi	LTQ Orbitrap Velos	Shotgun proteomik: 549 protein tanımlandı	
8 Starodubtseva ve ark., 2019	SVS; Lavaj aspirasyonu ile HPV-pozitif olan prekanseröz evre kadınlardan toplanmış	HPLC	LTQ FT MS/MS	Shotgun proteomik: 675 protein tanımlandı	ACTN4, ANXA1, ANXA2, VTN, CAP1, MUC5B
9 Ma ve ark., 2020	Servikojenik mukus; Sağlıklı, endoservikal adenokarsinom , adenokarsinom a in situ evre kadınlardan toplanmış	iTRAQ işaretleme, Ultimate 3000 HPLC sistemi	TripleTOF LC-MS/MS	Shotgun proteomik: 711 protein tanımlandı	

Tablo 2. Servikal kanser gelişiminde SVS'teki potansiyel protein biyobelirteçleri tespit etmek için yapılan proteomik çalışmaları (146) (devam)

Yazar Bilgisi	Örnek Toplama	Separasyon Yöntemi	Kütle Spektrometresi	Bulgular	Anlamli Proteinler
10 Gutiérrez ve ark., 2021	SVS; HPV-pozitif olan prekanseröz evre kadınlardan fırça ile toplanmış	C18 kolon ve ters faz EASY-nanoLC sistemi	nano-LC-MS/MS	Shotgun proteomik: 3699 protein tanımlandı	RAB6A, RPS27A, TRIM29, PHB2, ARPC5, KARS1, TES

2.3.4 Küçük molekül ve lipid çalışmaları

SVS, metabolit içeriği açısından zengin bir salgıdır ve lokal homeostaz için önemli bir sekresyondur ve içeriğindeki küçük moleküller ve ara metabolitler, lipidler ve mikrobiyotası literatürde çok sayıda yayında araştırılmıştır; bu başlık altında bunların birkaç tanesinden bahsedilecektir.

Karsinogenez sırasında, hücrel metabolik yollar değişebilir, dolayısıyla ilişkili metabolitlerin kompozisyonu ve/veya sayısı da değişebilir. Genellikle servikal malignite gelişiminin başlangıcı asemptomatik iken, ilerleyen aşamalarda aminler gibi bazı metabolit gruplarının arttığı ve vajinal pH'ın yükselmesine (>4.5) ve vajinal akıntının değişmesine yol açtığı bilinmektedir (147–149). Değişen metabolit profili, karsinogenez sırasında değişen yolların analizinde önemli bir bilgidir. Servikovajinal alanın metabolit bileşimindeki varyasyonlar adet döngüsü, gebelik, cinsel aktivite, oral kontraseptifler ve hatta sigara içme gibi birçok faktörden kaynaklı olabilir. Bu varyasyon özellikle dış etmenlere karşı son derece hassas olan lokal mikrobiyom değişikliklerine ve dolaylı olarak östrojen ve progesteron seviyeleri gibi hormonal değişikliklere bağlıdır (150–152). Şimdiye dek, servikovajinal metabolomdaki birtakım farklılıklar cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar, gebelikte amniyon enfeksiyonu, erken doğum, karsinogenez veya vajinal bakteriyel disbiyoz ile bağdaştırılmıştır (15,16,115,153).

Servikal kanser gelişiminde SVS metabolitlerini ortaya koyan az sayıda çalışma yapılmıştır. 2018 yılında Rodriguez-Esquivel ve arkadaşları (154) kadın genital

bölgesinin uçucu organik bileşiklerini (volatile organic compounds) GC/MS ile tanımlayarak sağlıklı ve servikal kanserli servikovajinal alanın volatolomik profil verilerini ortaya çıkarmıştır. Moleküllerin çoğunluğu alkan sınıfı organik bileşikler olup bunlar arasından bir grup molekül yalnızca servikal kanser hastalarında tespit edilmiştir. Uçucu organik bileşikler, aslında basit tabirle koku molekülleridir. Halihazırda, vajinal akıntının koku ve formunun değişiminin bölgenin sağlığı hakkında bilgi verebildiği ve bu sebeple kadınların bu belirtileri takip etmesi gerektiği zaten bilinmektedir. Bu doğrultuda, vajinal sağlığın mühim belirteçlerinden olan koku markırlarının, metabolit profillemeye önemli bir araç olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda enteresan bir çalışmaya örnek olarak, 2017 yılında koku ile tespit için özel olarak eğitilmiş Beagle cinsi bir köpeğe, çalışmada gönüllü olan sağlıklı ve servikal kanserli bireyler tarafından bir gün boyunca kullanılmış olan özel medikal hijyenik pedler koklatılarak, bu uçucu organik bileşikler yani koku markırları sayesinde köpeğin servikal kanserli hastaları ayırt edebildiği gözlenmiştir (155).

Kadın genitoüriner sisteminde belirli metabolitler, belirli lokal floral bakteri türleri ile belirgin bir şekilde ilişkilidir. Bu nedenle, değiştirilmiş bir metabolit bileşimi bozulmuş bir mikrobiyom dengesine işaret edebilir ve bozulan mikrobiyom, nihayetinde homeostazın da bozulmasına yol açabilir (38,156–159). 2018’de Sanches ve arkadaşları vajinal akıntıdaki belirli lipid moleküllerinin kompozisyon değişiklikleri, bir mantar enfeksiyonu olan vulvovajinal Kandidiyazis (*Candida albicans*) ile ilişkilendirilmiştir (160).

Persistan HPV enfeksiyonu, servikal karsinogenezin esas ajanıdır; fakat bununla birlikte, her HPV enfeksiyonu kanser geliştirmez, bu sebeple, servikovajinal mikro ortamın diğer özellikleri öne çıkmaktadır. Burada konakçı, virüs ve vajinal mikrobiyota arasındaki karmaşık etkileşimi daha iyi anlamak için literatürdeki kanser belirteci proteinler ile vajinal mikrobiyota özellikleri arasındaki ilişkiler 2019 yılında Łaniewski ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır. Çok değişkenli analiz (multivariate-analysis) platformlu çalışmada, invazif servikal karsinomalı kadınlar, Hr-HPV-pozitif olan düşük ve yüksek dereceli SIL sonucu olan kadınlar ve ayrıca

sağlıklı HPV negatif kontrollerden alınan örnekler analiz edilmiş ve kanser belirteçlerinin genital enflamasyonla bağlantılı ve *Lactobacillus* bolluğu ile negatif, anormal vajinal pH ile pozitif korelasyon olduğunu ortaya çıkarmışlar ve hastalığın progresyonunu bu parametrelerin belirlediğini öne sürmüşlerdir.

Yine servikal karsinogenezde metabolit kompozisyonunun değişimi ve lokal mikrobiyota ile olan ilişkisini daha kapsamlı şekilde araştırmak için 2019 yılında İlhan ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışma, belirli lipid sınıflarının invaziv servikal karsinomlu hastaları sağlıklı HPV-negatif bireylerden ayırdığını ortaya koymuştur (38). Ekip, bu çalışmayı HPV-negatif ve displastik olmayan kontrol grubu bireyler ile HPV-pozitif düşük ve yüksek dereceli displazi ve SCC olan bireylerden alınan örnekler ile gerçekleştirmiştir ve servikovajinal metabolik profilin genital inflamasyon, HPV enfeksiyonu ve vajinal mikrobiyota tarafından yönlendirildiğini bulmuşlardır. Bir diğer deyişle, disbiyotik vajinal mikrobiyotanın persistan HPV enfeksiyonuna, genital enflamasyona ve dolaylı olarak servikal kanser gelişimine katkıda bulunduğu öne sürülmüştür.

Benzer yöntemlerle erken doğum biyobelirteçleri üzerine yapılan çalışmaların sayısı literatürde daha fazladır. Servikovajinal bölgenin kendine has bir immün savunma mekanizması vardır . Bu homeostazın ne kadar mühim olduğu, erken doğum örneği üzerinden incelenebilir. Bakteriyel vajinal disbiyoz esnasında *Lactobacillus* cinsi hakim floranın bozulup başka cins bakterilerin çoğalmasından kaynaklı pH artışı meydana gelir ve böylece immün yanıtta rol oynayan bu floranın kemotaksisi de bozulur. Bu da enfeksiyöz organizmaların proliferasyonunun artmasına yol açarak proinflatuar sitokinlerin, kemokinlerin, matriks metallo-proteinazların (MMP), prostaglandinlerin ve bazı araşidonik asit metabolitlerinin üretimini uyarır. Araşidonik asit metabolitleri, servikal yeniden şekillenme ve uterusun kasılmasını indükler, bu esnada MMP'ler servikal hücre dışı matrisi ve fetal membranları bozar ve sindirir ve erken membran ruptürü nihayetinde erken doğuma yol açılır (161–163). Bir çalışmada ise, yüksek asetat seviyesinin 2 hafta içerisinde erken doğum gerçekleşeceğinin habercisi olduğu öne sürülmüştür (164). Asemptomatik erken doğum riski taşıyan kadınlarda, SVS örnekleme ile yapılacak

bir erken doğum tarama testi son derece mühim olduğundan ötürü literatürde bu konuda çok sayıda çalışma mevcuttur. PubMed’de “cervicovaginal fluid preterm” anahtar kelimeleriyle yapılan aramada 161 adet yayın bulunurken; Mendeley’de bu sayı 278’dir.

2020 yılında Oliver ve arkadaşları, bu kez gebelik servikovajeninin metabolit bileşimini ortaya çıkarmak için erken, orta ve geç gebelik döneminde olan 18 kadından SVS örnekleri alıp LC-MS/MS ile lipidomik analiz gerçekleştirmiştir (156). Lipidom bulgularını servikovajinal bölgenin mikrobiyota çeşitliliğine entegre ederek, belirli floral bakteri grupları ile sıkı bir şekilde ilişkili olan belirli metabolitleri ortaya çıkarmış ve *Lactobacillus crispatus* cinsi tarafından domine edilen bölgede yüksek manitol seviyesinin karakteristik olduğunu bildirmişlerdir. 2023 yılının başında yayınlanan Hong ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka lipidomik çalışmasında (162) ise, boylamsal (longitudinal) bir çalışmayla erken doğum yapan ve normal süresinde doğum yapan gebe kadınlardan alınan SVS örneklerinin tüm lipidomu çıkarıldı ve farklı sınıflardan 35 farklı lipid türünün erken doğum ile ilişkili olduğu öne sürüldü. Özellikle fizyolojik olarak temel rolleri olan sfingolipidlerin erken doğum sürecinde olan SVS örneklerinde önemli ölçüde down-regüle olduğu gösterilmiştir. Başka bir metabolit profillemeye amaçlı çalışma 2021’de Pruski ve arkadaşları tarafından (165), gebelik ve erken doğum riski üzerine, hamile kadınlardan oluşan iki farklı kohortta servikovajinal metabolomun tanımı için Desorpsiyon-Elektrosprey İyonizasyon MS (D-ESI MS) kullanarak metabolit profillemeye ve mikrobiyom üzerine bir çalışma yaparak spesifik lipid türlerinin servikovajinal bölgedeki immün yanıt ve inflamasyonun metabolik belirtilerinin ana bileşenleri olduğunu göstermiştir. Kanserin metabolik bir hastalık olduğu göz önüne alındığında, servikovajinal mikroçevredeki küçük moleküller ve lipidleri içeren metabolik profillemeye, bu alanda HPV-aracılı kanser gelişiminin fonksiyonel etkilerini ortaya çıkarabilmektedir (38,156,165).

2022 yılında, bu alanda literatürde çok sayıda yayını olan Emmanuel Amabebe ve arkadaşları tarafından (166), düşük erken doğum riskine sahip asemptomatik 168 mid-trimester kadından alınan SVS örneklerinde yapılan çalışmada glutamat, asetat

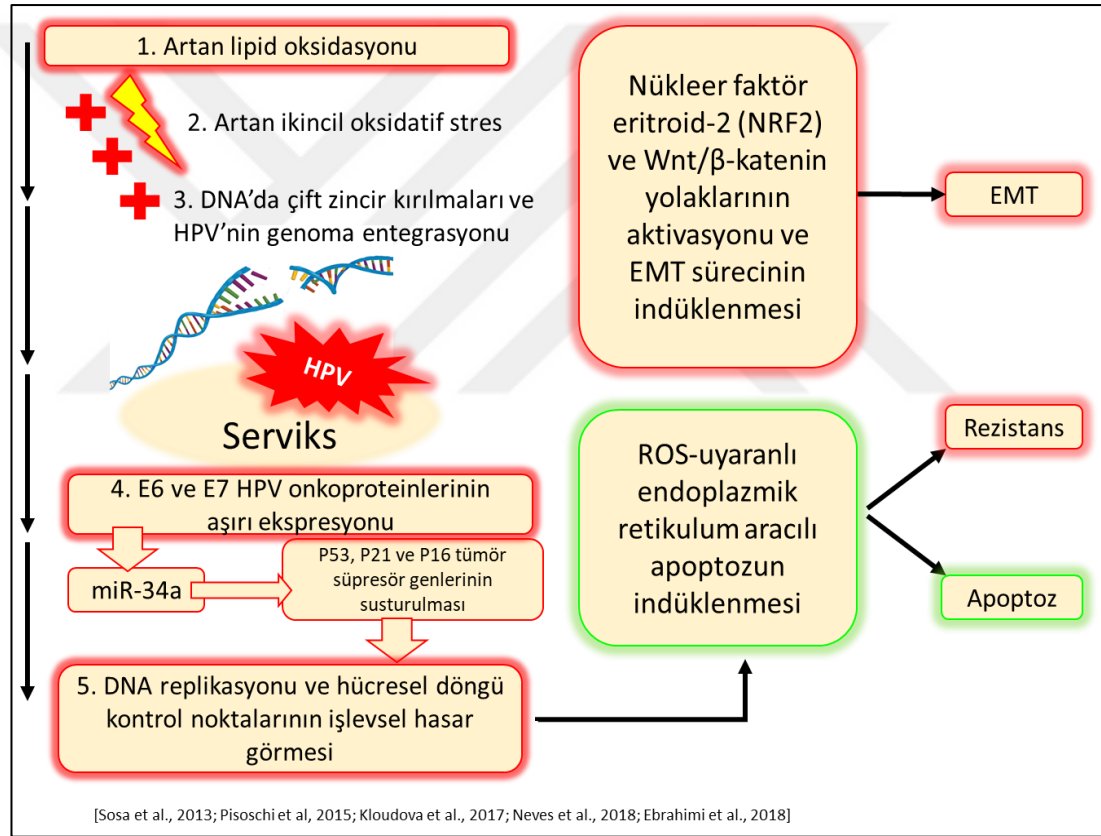
ve D-laktattan oluşan bir parametreler kombinasyonunun, çok düşük yanlış-pozitif oranı ve oldukça yüksek pozitif prediktif değer ile servikal uzunluk ve fetal fibronektinden daha güvenilir bir şekilde erken doğumu tahmin ettiğini öne sürdü.

2.3.5 Servikal kanser ve oksidatif stres

Oksidasyonun enflamasyon ve yaşlanmanın patofizyolojisinde anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Kanser, oksidatif stres ile tetiklenebilen metabolik hastalıklardan biridir (167–169). Oksidatif stresin servikal kanser açısından iki yönlü etkisi vardır (170,171): 1.) HPV'nin konakçı genoma entegrasyonunu kolaylaştırmak ve 2.) Yapı değişimi ve fonksiyon kaybına neden olabilen geri dönüşümsüz biyomolekül oksidasyonunu arttırmaktır. Literatürde özellikle artmış lipid peroksidasyon düzeylerinin ciddi hücresel oksidatif yaralanmalar, DNA'da çift zincir kırıkları ve nihayetinde karsinogenez ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (172), çünkü HPV enfeksiyonu temel olarak viral DNA'nın konakçı hücrelerin genomuna entegrasyonudur ve bu entegrasyon DNA kırıklarının artışıyla kolaylaşır, eğer konakçı bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılamazsa ve persistan kalırsa bu durum hücrede E6 ve E7 onkoproteinlerinin aşırı ekspresyonu ile sonuçlanır (171). Tümör baskılayıcı proteinlerin ekspresyonunu veya aktivitesini inhibe ederek hücresel proliferasyonu ve transformasyonu tetikleyebilen bu proteinler, hücrede karsinogeneze davetiye niteliğindedir. İşte bu süreçler, yüksek oksidatif stres koşullarında kolaylaştırılmış olur. Ayrıca, yüksek oksidatif stres koşulları altında antioksidanların ekspresyonu da artar fakat bu, anormalleşme potansiyeli olan hücrelerin hayatta kalmasını desteklemeyle sonuçlanabilir (171). Bu esnada ROS varlığı da hücrede "ROS-aracılı apoptoz direnci" oluşturup immortalizasyona katkıda bulunabilir (173). Halihazırda tümör baskılayıcı proteinlerinin aktiviteleri de inhibe edilmiş olduğu için apoptozu baskılar ve sonunda epitelyal-mezenkimal geçiş (Epithelial-Mesenchymal Transduction: EMT) indüklenir (174).

Oksidatif stres, yüksek oranda yağ asidi peroksidasyonu ve kolesterolün oksidasyonuna neden olmaktadır (175). Kolesterol, son derece biyoaktif olan ve hücresel sinyalleşmenin önemli bir düzenleyicisidir, bu nedenle kolesterolün

oksidasyon ürünleri olan oksisterollerin miktarındaki yükseliş hücre içi toksisiteyi artırarak hayati bir tehlike oluşturur (176). Endojen oksisteroller, ROS tarafından yapılan ataklarla veya sitokrom oksidaz ailesi enzimleriyle sentezlenir (177). Normal koşullarda oksisteroller kolesterole kıyasla hücre içinde miktar bakımından 10-1000 kat daha düşüktür ve yüksek konsantrasyonlarında sitotoksik oldukları bilinmektedir (178). Oksisterol bolluğunun yükselmesi redoks dengesizliğine, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına ve apoptoza neden olabilir yahut karsinogenezi destekleyebilir (177). Bununla birlikte, bugüne kadar servikal kanser gelişimini temsil eden hasta örneklerinde oksisiterollerin bir değerlendirmesi yapılmamıştır.



Şekil 6. Oksidatif stresin serviks hücrelerinde sebep olabileceği senaryolar

Lipid oksidasyonunun yanı sıra, hücreye zarar veren oksidatif stres sonuçlarından biri de protein oksidasyonudur. Lipid peroksidasyonunun zıddına, protein oksidasyonu daha (10-100 kat daha uzun turnover süresi) stabildir (179). Proteinlerin belirli amino asit residülerine bir karbonil grubu kazanmalarıyla gerçekleşir ve bu amino asitleri yapısal değişikliğe uğrattır (180). Protein

oksidasyonu, ROS tarafından veya dolaylı olarak lipitler gibi farklı biyomoleküllerin oksidasyonu ile indüklenen geri dönüşümsüz bir kovalent modifikasyon olarak tanımlanır (179). Karbonilasyon, protein oksidasyonu için en ciddi ve yaygın moleküler hasarlardan biri olup (180,181) ayrıca oksidatif stresin hücredeki en önemli belirteci ve ayrıca hücresel toksisite sebebi olarak kabul edilir (182). Lipit oksidasyonuna ek olarak, hücreye zarar veren oksidatif stres bilançolarından biri de proteinlerin oksidasyonudur. Karbonil ürünleri, özellikle prolin, treonin, lizin ve arginin aminoasitlerinde, bir protein içinde veya hatta ikiden fazla protein arasında protein oluşumunu sonlandırarak reaksiyona girebilen doğrudan veya dolaylı oksidasyonla ortaya çıkmaktadır (183). Literatürde farklı kanser türleri için kontrole kıyasla yüksek oksidatif stres seviyelerine karşılık gelen daha yüksek total protein karbonilasyonu rapor edilmiştir (184). Bunlardan birinde, serum alfa-tokoferol ve askorbik asit gibi vitaminler, SOD gibi antioksidan enzimler ve katalaz seviyeleri servikal kanser hastalarının serum örneklerinde kontrollere kıyasla azalmış; total protein karbonil içeriği, serum nitrik oksit, kolesterol/fosfolipid oranı ise hastalarda kontrole kıyasla artmıştır (185).

Ayrıca servikal kanserli hastaların kemoterapi öncesi ve sonrasında yapılan serum karbonil içeriği ölçüldüğünde kemoterapi etkinliği ile karbonil miktarının ters orantılı olarak değiştiği gözlenmiştir (186,187). Kemoterapinin, ilk 24 saatte serumdaki protein karbonil miktarını artırır, fakat sonrasında tedavi etkinliğiyle beraber karbonilasyon da dahil olmak üzere serum oksidatif stres markırlarının miktarında azalma gözlenmiştir (187).

İlginç olarak, servikal dokular üzerinde yapılan bir çalışmada, kansere giden süreç boyunca, displazi evrelerindeki örneklerde, yüksek miktarda protein karbonil içeriği saptanırken, hücreler kanserleştikten sonra, CIS örneklerinde, protein karbonilasyonunuda selektif bir azalma gerçekleştiği, kanser hücrelerinin bazı proteinleri karbonillemeyi azalttığı öne sürülmüştür (188,189). Çalışmaya hem sağlıklı, hem displazili, hem de kanserli doku örnekleri dahil edilmiş ve kanserli dokudaki protein karbonil miktarının neoplastik dokuya kıyasla azaldığı saptanmıştır. Örnekler proteomik yöntemlerle analiz edilmiş ve kanser örneklerinde keratin, aktin,

kornulin gibi proteinlerin displazi örneklerine kıyasla daha fazla; Serpin-B3, Annexin-2 ve gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz gibi proteinlerin ise daha az karbonile halde olduğu ifade edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarından kanserli hücrelerin invazyon, migrasyon gibi süreçler için önemli olan detoksifiye edici veya pro-survival proteinler üzerindeki karbonilasyonu seçici olarak azaltmakta olduğu çıkarılmıştır.



3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Tez Çalışmasının Amacı ve Projelerin Bilgileri

Bu tez çalışması kapsamında: ELISA çalışması proteomik çalışması, organik asit çalışması, lipidomik çalışması ve redoks proteomikliği olmak üzere beş farklı alt çalışma yapılmıştır. Tüm bu çalışmalar SVS örnek materyali ile kontrol ve farklı aşamalarındaki neoplastik evre örnekler arasındaki farkların ortaya çıkarılarak hastalığın biyolojisini araştırmak ve klinikte kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Tablo 3. Doktora tezi kapsamında yapılan tüm çalışmaların özeti

Süre	Çalışma	Malzemeler ve Cihazlar	Kurumlar	Deney Dizayni	Yöntemler
Kasım 2019 - Haziran 2020	Optimizasyon çalışmaları ve biyobankanın (SVS) oluşturulması	ELISA Kitleri ve spektrofotometre	Acıbadem Maslak Hastanesi, Acıbadem Üniversitesi	20 kontrol - 20 hasta örneğinde dört protein için birer plakada ELISA testi ölçümünün yapılması	
Temmuz 2020	Proteomik analiz için pilot deneme çalışması	FASP ve LC-MS/MS	Acıbadem Maslak Hastanesi, Acıbadem Üniversitesi	Bir adet SVS örneğinin proteom içeriğinin tanımlanması	
Haziran 2020 - Aralık 2021	Servikal neoplazi gelişiminde SVS örnekleriyle 4 hedef proteinin kantitatif olarak değerlendirilmesi	ELISA Kitleri ve spektrofotometre	Acıbadem Maslak Hastanesi, Acıbadem Üniversitesi	122 kontrol, 125 (86 CIN1, 39 CIN2&3) hasta örneği ile ELISA testi	247 örneğin 4 farklı hedef proteinin SVS örneklerindeki miktarının toplamda 16 ELISA plakasında test edilmesi
Eylül - Ekim 2021	Servikal neoplazi gelişiminde SVS örnekleriyle proteomik analiz yapılması	FASP ve LC-MS/MS	Acıbadem Maslak Hastanesi, Acıbadem Üniversitesi	12 tüpte 5'erli pool edilmiş 60 SVS örneği (20 kontrol, 20 CIN1, 20 CIN2&3) ile proteomik analiz	Örneklerin “untargeted, label-free, bottom-up” proteomik analizi ile proteom ekspresyon farklılıklarının ortaya çıkarılması
Ağustos 2021	Servikal neoplazi gelişiminde SVS örnekleriyle organik asit profilinin incelenmesi	Organik asit ekstraksiyon kimyasalları ve GC-MS	Acıbadem Altunizade Hastanesi, Acıbadem ClinLab, Acıbadem Üniversitesi	10 kontrol, 10 CIN1, 11 CIN2+ hasta örneği GC-MS (scan mode)	GC-MS kullanılarak SVS örneklerinde bulunan organik asitlerin ortaya çıkarılması

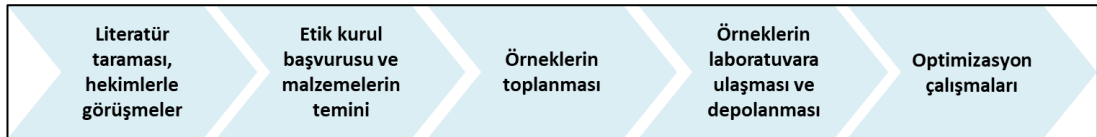
Tablo 3. Doktora tezi kapsamında yapılan tüm çalışmaların özeti (devam)

Süre	Çalışma	Malzemeler ve Cihazlar	Kurumlar	Deney Dizayni	Yöntemler
Ocak - Haziran 2022	Servikal neoplazi gelişiminde SVS örneklerinde okside lipid profilinin incelenmesi	Lipid ekstraksiyon kimyasalları, izotop işaretli standartlar ve LC-MS/MS	Acıbadem Altunizade Hastanesi, İTF Çapa Hastanesi, Aston University (Birmingham , İngiltere)	10 kontrol, 14 CIN1 ve 14 CIN2+ hasta örneği Lipidomik (targeted)	Belirli oksi-sterollerin SVS örneklerindeki miktarının ölçümü ve klinik evreler arasındaki farklılıkların ortaya çıkarılması
Ekim 2022 - Şubat 2023	Servikal neoplazi gelişiminde protein karbonilasyonunun ölçümü ve redoks proteomik yaklaşımıyla karbonillenmiş amino asitlerin belirlenmesi	Protein karbonilasyon immünoassay kimyasalları, tryptic digestion malzemeleri ve LC-MS/MS	Acıbadem Altunizade Hastanesi, İTF Çapa Hastanesi, Acıbadem Üniversitesi, Aston University (Birmingham , İngiltere), Erasmus MC (Rotterdam, Hollanda)	10 kontrol, 17 CIN1, ve 16 CIN2+ hasta örneği	Servikal neoplazi gelişiminde protein karbonilasyon analizi
Haziran 2022 - Haziran 2023	Veri analizi, istatistiksel analizler, makale ve tez yazımı				

3.2 Tez Çalışmasının Biyobankasının Oluşturulması

Bu doktora tezi kapsamında yapılan beş çalışmada da SVS örnek materyali kullanılmıştır. Örnek toplama işlemi, Acıbadem Üniversitesi ve Acıbadem Sağlık Kuruluşları Tıbbi Araştırma Etik Kurulu (ATADEK) tarafından 2020/01 sayılı 2020-01/30 karar numarası ile ilk başvuru ve sonrasında 2022/20 sayılı 2022-20/02 karar numarasıyla ikinci başvuru onayıyla etik yönden uygun bulunmuştur. Tüm gönüllü katılımcılardan örnek alınmadan önce imzalı onam formu temin edilmiştir. Örnekler Jinekolojik Onkoloji Polikliniklerinde Acıbadem Maslak Hastanesinde Prof. Dr. Mete Güngör ve Doç. Dr. Özgüç Takmaz; Acıbadem Altunizade Hastanesinde Prof. Dr. Serkan Erkanlı ve Dr. Alper Koçak; İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Çapa Hastanesinde Doç. Dr. Hamdullah Sözen tarafından, çalışmayı kabul etmiş olan gönüllü bireylerden alınmıştır. Alınan örneğin kolposkopi ile bir ilişkisi olmamakla

birlikte, kolposkopik biyopsi tekniğinin güvenilirliği Pap-smear testinden daha yüksek olduğu için, örnek sınıflandırmasında histopatolojik bilgilerin kullanımı tercih edildi ve bu sebeple, örnekler kolposkopi hastalarından alındı. Biyobanka oluşturulurken depolama standardizasyonuna son derece önem verilmiştir. Örnekler günlük olarak soğuk zinciri kırılmadan Acıbadem Hastanelerinden Acıbadem Merkez Laboratuvarı Örnek Kabul Birimine kurye ile transfer edilmiştir. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Çapa Hastanesinde alınan örnekler için ise iki haftada bir kurubuzlu paket ile gidilip buzlukta biriktirilen örnekler poliklinikten teslim alınmıştır. Laboratuvara ulaşan tüm örnek tüpleri için ivedilikle hasta kodu, tarih gibi bilgilerle işaretlenip (labeling), hastane ekibi vasıtasıyla hasta çizelgesine klinik bilgilerin işlenip, örneklerin koruyucu solüsyon ile karıştırılıp alikotlanıp deney zamanına dek uygun şekilde depolamaya kaldırılması adımları takip edilmiştir. Tüm örnek tüpleri herhangi bir karışıklık ihtimaline karşın fotoğraflanmıştır. Tüm çalışmalar için genel toplamda 468 adet örnek toplanmıştır, bunların bir kısmı hastanın verilerine sistemde ulaşamama, örnekte çok yoğun kan kontaminasyonu, tentürdiyot kontaminasyonu, örneğin total protein konsantrasyon değerlerinin çok düşük olması, örnek hacminin yetersiz oluşu, aynı bireyden mükerrer örnek alınmış olması, örneğin hastanede etiketlenmemiş olması gibi çeşitli sebeplerle deneylerde kullanılamamıştır.

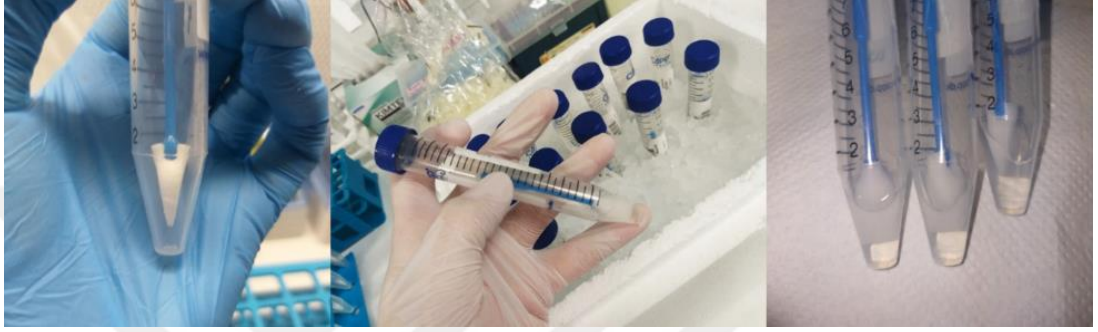


Şekil 7. Çalışmalar için biyobanka oluşturma sürecinin özeti

Microsoft PowerPoint ile oluşturulmuştur.

Çalışmaların dördünde SVS materyali lavaj aspirasyonu ile elde edilmiş iken, ilk çalışmada (ELISA çalışması) SVS materyali direkt olarak absorban malzemeye emdirme yöntemiyle elde edilmiştir. Örnek almada, literatürde de düşük hacimli sıvı örnek almada kullanılmış olan, ucunda polivinil alkol köpük bulunan steril swab çubuklar kullanılmıştır. Bu swab çubuklar esasen “göz mızrağı (eye spear)” olarak bilinen, oftalmolojik ameliyatlarda kullanılan, hızlı sıvı emiciliğine sahip, poröz yapıda süngersi bir materyaldir. Örnekleme işlemi, jinekolojik muayene esnasında

litotomi pozisyonunda, kolposkopik muayeneden hemen önce, servikovajinal alandaki sekresyon direkt bu sünger dokundurularak absorbe edilmiştir. Ardından çubuklar steril 15 mL'lik plastik santrifüj tüplerinin içerisine alınarak hızlıca -20 derecede dondurulmuş ve aynı gün içerisinde soğuk koşullarda Acıbadem Maslak Hastanesinden Acıbadem Merkez Laboratuvarı Örnek Kabul Birimine kurye ile ulaştırılmıştır.



Resim 2. Toplanan örnek materyalinin görüntüleri

Sol: Hekimden laboratuvara ulaşan örnek; orta: Donuk örneklerin buzda yavaş yavaş çözündürülmesi; sağ: Ekstraksiyon tamponunda inkübe edilmekte olan çubuklar.

Ekstraksiyon Tamponu (ET):

1X PBS içinde, steril, pH: 7.4 :

- Sodyum klorür (50 mM, %1 final konsantrasyon)
- Amonyum bikarbonat (50 mM, %1 final konsantrasyon)
- Gliserin (%1 final konsantrasyon)
- Sodyum azit (0.5 M, %1 final konsantrasyon)
- Proteaz inhibitör karışım kokteyli (Expedeon #44204, 1X, %1 final konsantrasyon)

Ekstraksiyon protokolü:

- 1) Örnekler laboratuvara ulaşınca, buz üzerinde yavaş yavaş çözündürülür, +4 derecedeki ET'den her bir swab üzerine 800 µL eklenir, 10 sn vortekslenip gece boyunca +4 derecede inkübasyona bırakılır.

- 2) Ertesi gün, tüpteki sıvı çekilip 2 mL'lik plastik steril ependorf tüpe alınır, sünger 1000 μ L'lik steril plastik pipet ucunun içine sıkıştırılır, üzerine 200 μ L daha ET eklenip örnek tüpünün içerisinde 2000 g'de, 20 dk, +4 derecede santrifüjlenir, dibe inen sıvı da alınır.
- 3) Toplanan tüm sıvı 14.500 rpm'de 30 dk, +4 derecede santrifüjlenerek katı doku parçaları pelet halinde çöktürülür, berrak süpernatant ayrılarak her biri 500 μ L'lik aliquotlarla -20 derecede saklanır. (Toplam örnek hacmi değişken olmakla birlikte, elde edilen nihai örnek miktarı 1200 – 1500 μ L arasındadır.)



Resim 3. Örneklerin swab materyalinden geri kazanımı

Sol: Çubuğun pipet ucuna sıkıştırılarak süngerdeki sıvının aşağı inmesini amaçlayan santrifüjün sonrası; sağ: Tüm sıvı bir araya toplandıktan sonra, örnekteki debrisı sıvıdan ayırmak için yapılan santrifüjün sonrası.

Çalışmaların tamamında kullanılan tüm örneklerin total protein konsantrasyonu Thermo Fisher Scientific #232235 Micro BCA™ Protein Assay Kit ürünü kullanılarak ölçülmüştür. Kısaca, örnekler kitin ihtiva ettiği bişinkoninik asit içerikli solüsyon (working reagent) ile karıştırılmıştır, plakaya çift tekrarlı (duplike) olarak yüklenmiş ve 37°C'de 2 saat inkübe edilip 562 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Örnekler, tahmini olarak kitin ölçüm aralığına (20-200 μ L) denk geleceği düşünülen oranda (10 μ L örnek + 140 μ L tampon) seyreltilerek ölçülmüştür, ölçüm aralığının üzerine çıkılan örnekler ise bir kat daha (1:1) seyreltilerek tekrar ölçüm yapılmıştır. SVS örneklerinin total protein konsantrasyon ölçümünün önemi büyüktür, zira, SVS içeriğinin kantitatif olarak değerlendirilmesinde bir çeşit normalizasyon faktörü gerekmektedir. Bu tez kapsamında yürütülen çalışmalarda bu normalizasyon faktörü her bir örneğin kendi

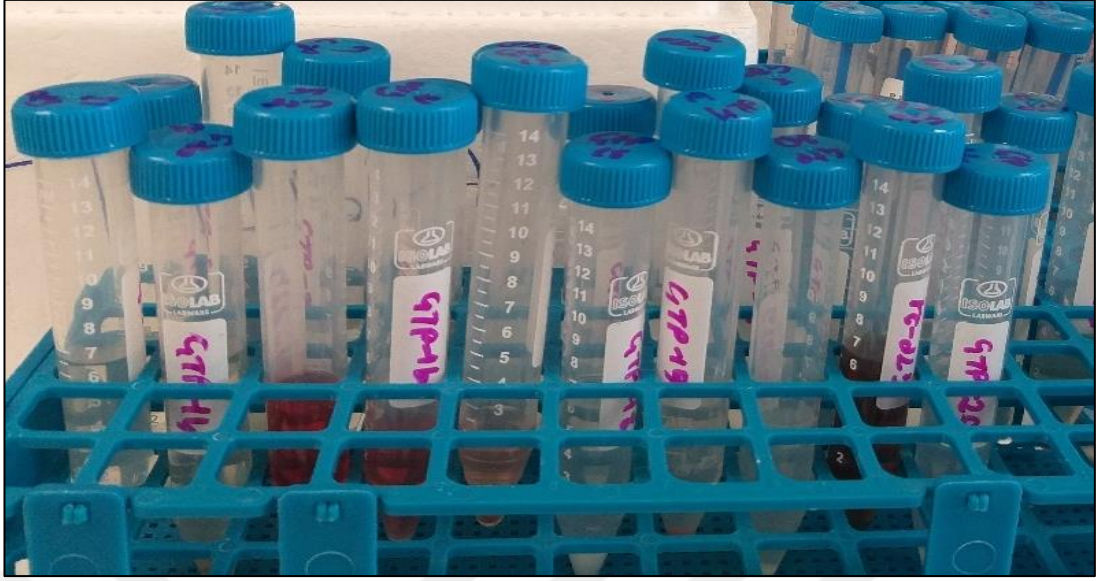
total protein konsantrasyonu olarak belirlenmiş olup, her çalışmada bir parametre olarak kullanılmıştır.

İlk çalışmada örneklerle ELISA testiyle absorbans ölçümü yapıldığı için, literatürdeki bu tür benzer çalışmalara (111,190–192) uyarlanmış şekilde swab çubuklar ile örnekleme yöntemi olarak kullanılırken, diğer çalışmalarda ise literatürdeki benzer omik çalışmalarda (106,108,193) yaygın olarak tercih edilen, lavaj aspirasyonu örnekleme yöntemi kullanılmıştır.

Bu yöntem, en fazla serbest madde içeriği kazandıran yöntem olup, örnekler jinekolojik muayene sırasında, bireyler litotomi pozisyonunda ve halihazırda vajinal spekulum vajene yerleştirilmiş iken, herhangi bir müdahale öncesinde uzman hekim tarafından alınmıştır. Servikovajinal alanın %0.09 NaCl izotonik solüsyon (serum fizyolojik) ile yıkanıp, bölgedeki salgılarla karışan solüsyonun steril 3 mililitrelik plastik pastör pipeti ile geri çekilip santrifüj tüpüne alınmasıyla tamamlanmaktadır.

Esasen bu işlem prosedürde ek bir işlem olmayıp, kolposkopi prosedürünün başlangıcında servikal yüzeydeki fazla mukusun uzaklaştırılması amacıyla hekimlerin çoğunlukla tercih ettiği bir yöntemdir. Örneğin alındığı tüpe ivedilikle toplam örnek miktarının %10'u hacimde örnek koruyucu solüsyon eklenmiş, katı partikülleri uzaklaştırmak için düşük şiddetli kısa bir (2500 g, 20 dk, +4 °C) santrifüj yapılmış, ardından örneklerin total protein konsantrasyonları ölçülmüş ve sonrasında kısa süreli depolama olarak -20 dereceye kaldırılmıştır.

Örnek koruma solüsyonu, fizyolojik pH'ta olup PBS ile dengelenmiştir; örneğin muhteviyatındaki proteinleri proteaz aktivitesinden korumak için proteaz inhibitörleri ve örnekte bakteri üremesini engellemek için sodyum azit içerir. Laboratuvar kabininde steril koşullarda ve tamamı “LC-grade” veya “molecular biology grade” ürünler ile hazırlanmış, pH ölçümünün sonunda 0.22 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Hazırlanan çözelti 50 mL hacimde santrifüj tüplerine ayrılarak +4 derecede en fazla 6 aya kadar saklanarak kullanılmıştır.



Resim 4. SVS lavaj aspirasyon örnekleri

Hastaneden laboratuvara 15 mL plastik steril santrifüj tüpleri içerisinde ulaşan, isimsizleştirilmiş örneklerin, içerisine örnek koruma solüsyonu eklenip santrifüjlenmeden önceki görüntüsü. (Kan kontaminasyonu çok fazla olan, şeffaf olmayan örnekler elenmektedir.)

Örnek koruyucu solüsyon:

Steril 1X PBS içerisinde, pH: 7.4 olacak şekilde:

- Sodyum azit (0.5 M, %1 final konsantrasyon)
- Proteaz inhibitör karışım kokteyli (Expedeon #44204) 1X, %1 final konsantrasyon

İsimsizleştirilmiş gönüllü popülasyonu esaslarında yapılmış olan bu çalışmalarda, gönüllülerin kimlik bilgilerine ulaşılamamaktadır. Hasta isimleri yerine hasta numaraları kullanılarak bir kodlama yöntemi ile jinekolojik bulgular yalnızca çalışmada yer alan hekim ve araştırmacıların erişebileceği şekilde kaydedilmiştir. Gönüllülerden alınan sıvı örneklerinden elde edilecek bilgiler yalnızca araştırma amaçlı ve yapılan çalışmaların tez, bilimsel konferans bildileri ve bilimsel dergilerde

yayınlanması üzere kullanılmıştır. Örnek alınan gönüllü bireylerin ürogenital enfeksiyon, önceden geçirdikleri jinekolojik operasyonlar, HPV genotipleme, Pap-smear, kolposkopi, cerrahi müdahale gibi jinekolojik tanı bilgilerinin yanısıra; yaş, etnik köken, vücut kitle indeksi (BMI), kontrasepsiyon yöntemi, parite bilgisi ve hekime başvuru sebepleri gibi bilgileri de kaydedilmiştir. Çok eşlilik durumu, cinsel yönelim tercihi ve sigara kullanımı gibi bilgilere örneklerin çok büyük bir çoğunluğunda erişilemediği için hasta çizelgesine dahil edilmemiştir. Etnik köken, BMI, kontrasepsiyon yöntemi ve parite bilgisi de örneklerin yarısından az kısmında mevcuttur. Her iki örnekleme yönteminde de uygulanan gönüllülerin araştırmaya alınma ve dışlanma kriterleri:

- 1) Bireylerin olağan menstrüasyon kanaması yahut olağan dışı bir kanaması olmamalıdır.
- 2) Son 24 saat içerisinde korunmasız cinsel ilişkiye girmemiş olmalıdır.
- 3) Son 24 saat içerisinde vajinal duş (vajenin içini yıkama) yapılmamış olmalıdır.
- 4) Son 24 saat içerisinde vajina içine ilaç, krem, vb gibi uygulamalar yapılmamış olmalıdır.
- 5) Total histerektomi geçirmiş bireylerden örnek alınmaz.
- 6) Gebelerden örnek alınmaz (gebelikle ilgili salgılanan farklı moleküller örnek kompozisyonunu farklı yönde etkileyebileceği için).
- 7) Post-menopozal, 70 yaşından büyük ve son 10 yıl içerisinde ard arda 3 tane negatif smear testi sonucu olan bireylerden örnek alınmaz.

3.3 Tez Çalışmasında Uygulanan Laboratuvar Deneyleri ve Analizler

3.3.1 Servikovajinal sıvıdaki potansiyel protein biyobelirteçlerin ELISA testi ile miktar tayini

Bu çalışmada, literatürde "2.3.2. Proteomik Çalışmalar" başlığında yer verilmiş olan, 2014 yılında Belçika'da Van Ostade ve arkadaşları tarafından ve 2019 yılında Rusya'da Staradoubdseva ve arkadaşları tarafından yapılan iki çalışmada istatistiksel

olarak anlamlı bulunmuş ve "potansiyel protein biyobelirteçler" olarak gösterilmiş en ümit vaadeden proteinler arasında olan alfa-aktinin-4 (ACTN4), annexin-a-2 (ANXA2), skuamöz hücreli karsinoma antijen-1 (SCCA1) ve skuamöz hücreli karsinoma antijen-2 (SCCA2) hedef proteinlerinin SVS örnek materyalindeki miktar ölçümleri ELISA testi ile tayin edilerek bu proteinlerin diagnostik ayırım gücü araştırılmıştır.

Bu hedef proteinler, literatürde araştırması yapılarak seçilmiş ve halihazırda literatürde hedef olarak gösterilmiş olan bu proteinlerin Türkiye'deki kadın popülasyonunda pre-validasyon çalışmasının yapılması hedeflenmiştir. Bu proteinler literatürde farklı çalışmalarda biyolojik olarak karsinogeneze katkıda bulunduğu öne sürülen proteinlerdir ve dolayısıyla, bu çalışmanın başlangıç hipotezi "sağlıklı bireylerden şiddetli servikal neoplazi aşamasına doğru SVS'de bu proteinlerin miktarları artar" olarak belirlenmiştir.

Bu doğrultuda, bu çalışma için toplamda 301 adet olmak üzere: Acıbadem Maslak Hastanesinden 146 Kontrol + 64 CIN-1 + 25 CIN-2&3 = 235 adet örnek; İstanbul Tıp Fakültesinden ise 32 Kontrol + 21 CIN-1 + 13 CIN-2&3 = 66 adet örnek toplanabilmiştir. Hasta örneklerinin tamamı (123), kontrol örneklerinin ise 122 adedi çalışmada kullanılmıştır. 123 örnek ile vaka grubu 86 adet CIN1 ve 39 adet CIN2&3 grubundan olmak üzere, toplamda 247 adet biyolojik numunenin 16 adet Elisa plakasında ölçümü yapılmıştır.

Çalışmanın başlangıcında, bu örnekler ile ELISA testiyle ölçüm yapılabilmesi için birtakım denemelerle optimizasyon yapılmıştır, zira o tarihte literatürde SVS örnek materyalinin ELISA testinde kullanımına dair herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. İlginçtir ki, önceki çalışmaların (Van Raemdonck vd., 2014; Starodubtseva vd., 2019) makalelerinde ne ELISA testi için bir optimizasyon yapıldığından ne de ELISA testi ile yapılan ölçüm sonuçları için herhangi bir düzeltme yönteminden bahsedilmektedir. Ancak ticari ELISA kitlerinin hiçbirinde SVS materyali için kullanım tavsiyesi olmadığı gibi, bu tür çalışmalarda yapılan ölçüm değerine bir normalizasyon uygulanması, verilere yapılacak önemli ve gerekli

bir müdahaledir. Zira SVS, salgılanmasında bileşim oranları korunan, stabil ve/veya iyi tanımlanmış bir vücut sıvısı değildir. Dolayısıyla, bu numune ile yapılan çalışmalarda bir iç kalibrasyon gerektirmektedir. Bu çalışmada, ELISA ile ölçülecek hedef proteinlerin miktarı, örnekteki total protein miktarına oranlanarak (correction) değerlendirilmiş, her bir örneğin kendi total protein konsantrasyonuna göre bir düzeltme denklemi kullanılarak ölçüm sonuçları normalize edilmiştir.

$$\text{Normalize ELISA ölçüm sonuçları: } \frac{\text{Hedef proteinin konsantrasyon değeri} \times 100}{\text{Total protein konsantrasyonu}}$$

Çalışma, her ne kadar SVS örnek materyali ile yapılmış olsa da, çalışmadaki klinik grupların dizaynı dokudaki neoplazi gelişimine göre hastanın biyopsi sonucuna bağlı olarak tasarlanmıştır ve örnekleme neoplazi gelişimine göre üç klinik grup ile çalışılmıştır. Kontrol grubu ile ilgili olarak; katılımcılarda mevcut olan genitoüriner sistem enfeksiyonlarını (Klamidya, akut sistit, vajinit, vulvit, servisit, vb.) veya cinsel yolla bulaşan HPV harici diğer hastalık semptomları dışlanmamıştır. Kısacası, displazi dışındaki tüm patolojiler kontrol grubuna dahil edilmiştir. Zira, servikal neoplazi taraması için kullanılabilecek bir test, diğer patolojilerin varlığında da çalışabiliyor olmalıdır, hedef patolojinin saptanmasını etkilememelidir.

Hastaların klinik verileri de örneklerle eş zamanlı olarak toplanmıştır. Hasta çizelgesinde yaş, BMI, etnik köken, geçmiş hastalık öyküsü, mevcut şikayetler, herhangi bir ürogenital enfeksiyonun varlığı gibi yan bilgiler ile Pap-smear testi sonucu, HPV genotipleme test sonucu, kolposkopik biyopsi ve cerrahi operasyon bilgileri yer almaktadır. Örneklem popülasyonunun ~%31'i postmenopozal olup yaş ortalaması 37.6 (± 8.68), modu 32, medyanı 36 olup popülasyonun en genç 22 en yaşlı 68 yaşında bireylerden oluşmaktaydı. Popülasyonun %4.45'i yabancı uyruklu olup geri kalanı Türk kadınlarıydı. Çalışmada kullanılan örneklerin total protein konsantrasyonlarının ortalaması 974.01 $\mu\text{g/mL}$; ortanca değer: 587.50 $\mu\text{g/mL}$; en yüksek değer: 8330.76 $\mu\text{g/mL}$; en düşük değer: 21.81 $\mu\text{g/mL}$. Toplamda 245 birey arasından 68 adet daha önce bir hastalık geçmişi bulunan, 109 adet rutin jinekolojik muayene için gelen, 69 adet önceden serviks için patolojik bir tanı almış veya cerrahi müdahale sonrası takip hastası olarak gelen, 11 adet vajinal yanma/kaşıntı/akıntı vb.

gibi bir şikayet (kandidiyazis) ile gelen, 5 adet menstrüasyon döngüsü ile alakalı şikayetler ile gelen birey mevcuttur. Ürogenital enfeksiyonlardan kontrol grubunda 14/122 adet, hasta gruplarında ise 23/123 bireyde akut vajinit mevcuttur. Kontrol grubunda 40/122 bireyde kolposkopik biyopsiye başvurulmuştur, geri kalanlarda yalnızca Pap-smear test uygulanmıştır. Kontrol grubunda 52/122 bireyde anormal Pap-smear test sonucu mevcuttur. Tüm hastalarda en sık görülen Pap-smear sonucu 66/245 birey ile LSIL; en sık görülen ürogenital enfeksiyon 36/245 birey ile akut vajinit; en sık görülen polikliniğe geliş sebebi ise daha önceki anormal bir smear/kolposkopi sonucuna istinaden, 67/245 birey ile takip muayenesi idi. Yüksek riskli HPV tipleri 74/245 bireyde saptanmış, 94/245 birey (yapılan testte genotipi belirlenmemiş) HPV ile enfekte idi. Geri kalan bireylere ya HPV testi yapılmamış yahut yapılan testin sonuç bilgisine sistemde ulaşılmamıştır.

Bu çalışmanın aşamaları, aşağıdaki gibi beş aşama altında incelenebilir:

- 1) Örneklerin hekimler tarafından toplanması ve laboratuvara ulaşması, örneklerin alındığı bireylere ait klinik bilgilerin toplanması
- 2) Örneklerin swab'dan ekstrakte edilmesi, total protein konsantrasyonlarının ölçülüp alikotlanarak saklanması
- 3) Optimizasyon çalışmaları
- 4) ELISA ölçümü
- 5) Hesaplamalar ve istatistiksel analiz

3.3.1.1 Kullanılan malzemeler

Bu çalışma 2020/01/04 numaralı Acıbadem Mehmet Akif Aydınlar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü (ABAPKO) lisansüstü proje fonu ve ve 120S237 numaralı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB) Hızlı Destek 1002 programı ile desteklenmiştir ve proje bütçesi ile toplamda 25 adet ticari ELISA kiti (ACTN4 için: 107-E-ELH1636, ANXA2 için: 107-E-ELH0448, SCCA1 için: 107-E-ELH1721, SCCA2 için: 107-E-ELH1722; Elabscience

Biotechnology Inc. ABD), örneklemede kullanılan swab çubuklar (Cenefom RS-01, Tayvan) ve deneylerde kullanılan santrifüj tüpü gibi genel plastik ürün ve PBS, NaCl gibi genel kimyasal sarf malzemeler ile Expedeon #44204 proteaz inhibitörleri karışım kokteyli ve Sigma-Aldrich #S2002 sodyum azid satın alınmıştır.

3.3.1.2 Optimizasyon çalışmaları

Bu başlık altındaki deneme çalışmaları, iyi tanımlanmış ve stabil bir vücut sıvısı olmayan SVS örnekleri için, seyreltme oranı, matriks etkisi gibi parametrelerin değerlendirilebilmesi için optimizasyon çalışmalarını kapsar. İlk aşamada, dört hedef proteinin her biri için 2'şer kez (yalnızca ACTN4 için 3 kez) olmak üzere toplamda 9 adet kit optimizasyon çalışmaları için kullanılmıştır.

Mevcut ELISA kitlerinin hiçbirisi SVS matriksine özel olarak geliştirilmiş olmadığı veya bu matriks ile kullanımı için bir tavsiyede bulunmadığı için, uygunluk kriterini ve seyreltme oranını belirlemek, matriks interferansını ve kitlerin örneklerde geri kazanımını (recovery) belirleyebilmek adına, her hedef protein için ilk aşamada birer kit ile deneme çalışması yapılmıştır.

Her dört hedef protein (ACTN4, ANXA2, SCCA1 ve SCCA2) için en az 3 adet rastgele fakat her biri farklı düzeyde (aritmetik ortalama ve çeyrekler açıklığına göre çok düşük, orta, çok yüksek olmak üzere) total protein konsantrasyonlarına sahip örnekler seçilmiştir. Örnekler, proteinlerin tahmini olarak beklenen hücre içi miktarlarına göre farklı oranlarda ET ile dilüe edilerek ELISA testiyle seri dilüsyon ölçümleri yapılmıştır.

Örnek matriksi ile ilgili olarak, Elisa testleri her numune materyalinin içerik zenginliği için belirli bir başlangıç konsantrasyonu gerektirdiğinden dolayı, absorbanslarını reaksiyon aralığı arasında olacak şekilde ayarlamak için bilinmeyen numuneler belirli bir oranda seyreltilmelidir. Ticari kullanıma hazır sandviç ELISA testi için SVS matriksinin her bir hedef protein için farklı total protein konsantrasyon düzeylerine sahip birkaç numune ile seri seyreltmeler yapılmıştır. Bu bağlamda,

düşük (150 µg/mL'nin altında), orta (150 ile 500 µg/mL arası) ve yüksek (500 ile 1000 µg/mL arası) total protein konsantrasyonu değerleri seçilmiştir. Bu düşük-orta-yüksek seviyeler, genel numunelerin total protein konsantrasyonlarının dağılımına ve çeyrekler açıklığına göre belirlenmiştir. ACTN4 denemeleri için toplamda sekiz numune çalışılmış ve her numune seri olarak 1:10, 1:100, 1:500 ve 1:1000 oranında seyreltilmiştir. ACTN4 bir hücre iskeleti proteini olduğundan ve diğer hedef proteinlerimize kıyasla biyolojik örneklerde daha bol miktarda bulunduğundan, direkt daha yüksek seyreltme oranları tercih edilmiştir. Bununla birlikte, diğer hedef proteinleri için 1:2 oranında dilüsyon ile deneme çalışmaları başlatılmıştır. Değişimi görebilmek için, aynı örneklerle 1) seyreltme olmaksızın, 2) 1:2, 3) 1:3, ve 4) 1:5 olmak üzere dört farklı matriks ölçümü dizayn edilmiştir. Tüm ölçümlerin sonuçlarına göre, her hedef protein için en uygun seyreltme oranı belirlenmiştir ve bu oranlar sonrasında deney için tüm örneklerle uygulanmıştır.

3.3.1.3 ELISA ölçümleri

ELISA testleri, gerekli tüm bileşenlerle birlikte ticari kitin kullanım klavuzu talimatlarına göre uygulanmış, santrifüjlenip debrisini uzaklaştırılmış örnekler herhangi bir ek uygulamadan geçirilmeden direkt duplike olarak çalışılmıştır. Her ölçümde hesaplanan her bir örneğin konsantrasyon değeri, daha önce yer verilmiş olan denklemde de açıklandığı gibi, her numunenin kendi total protein konsantrasyonu ile düzeltilmiştir. ELISA plakalarında, her 4 deney setinde de, her 3 klinik gruba ait örnekler bulundurulmuş çalışılmıştır, diğer bir deyişle, her plakada belirli sayılarda hem kontrol, hem CIN1, hem de CIN2&3 grubu örneklerinden de mevcuttur, böylelikle hem plakalar-arası hem de ticari kitlerin üretim partileri arasındaki varyasyonu elimine etmek hedeflenmiştir. ELISA testleri, ticari kitlerin kullanım kılavuzundaki protokole göre kullanılmıştır.

3.3.1.4 İstatistiksel analiz

Absorbans değerleri, standartların kalibrasyon eğrisi ile elde edilen grafiğin denkleminde konsantrasyon değerlerine dönüştürülmüş ve öncelikle Shapiro-Wilk

testi uygulanarak, gruplarda normal dağılım gösteren (>0.5) ve göstermeyen (<0.5) değerlere sahip gruplar belirlenmiştir. Ardından hedef proteinlerin miktarlarının klinik gruplar arasında istatistiki bir ayrımı olup olmadığı GraphPad Prism (v.9) yazılımında Kruskal-Wallis testi uygulanarak araştırılmış, p değerleri saptanmıştır. Ölçüm sonuçlarının görselleştirilmesi için kutu grafikleri (boxplot) çizilmiştir.

3.3.2 Servikovajinal sıvıdaki hasta ve sağlıklı bireylere ait örneklerdeki proteom farklılıklarının proteomik yöntemler ile araştırılması

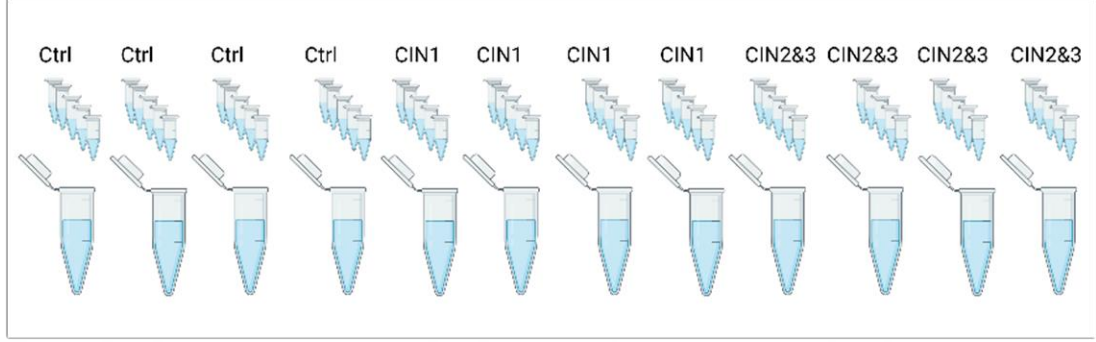
Bu çalışmada, LC-MS/MS platformunda etiketsiz (label-free) shotgun proteomik analiziyle CIN aşamalarındaki SVS örneklerinin proteomunu karşılaştırmayı ve neoplazi aşamalarında farklı şekilde eksprese edilen proteinleri ortaya çıkarmak amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, gönüllü bireylerden 20 kontrol, 20 CIN1, 10 CIN2, 10 CIN3 olmak üzere toplamda 60 adet SVS örneği 50 μ L hacimde 5'erli birleştirilerek (pooling) 12 tüp olacak şekilde hazırlandı ve filtre destekli numune hazırlama protokolü (FASP) ile hazırlanan triptik peptidler nano ölçekli HPLC ile tandem MS sisteminde örnekler analiz edildi.

Çalışmada kullanılan örneklem popülasyonunun yaş ortalaması 34.47 (± 6.55), modu 32, medyanı 34 olup en genci 20 en yaşlısı 49 yaşındadır. Kontrol grubunda 3, CIN1 grubunda 5 ve CIN2&3 grubunda da 5 birey akut vajinit enfeksiyonu tanısı almıştır.

Bu çalışmanın aşamaları, aşağıdaki gibi beş adımda incelenebilir:

- 1) Örneklerin hekimler tarafından toplanması ve laboratuvara ulaşması, örneklerin alındığı bireylere ait klinik bilgilerin toplanması
- 2) Örnekler örnek koruma solüsyonu eklenerek total protein konsantrasyonlarının ölçülüp alikotlanarak saklanması
- 3) Örneklerin SDS-PAGE ile görüntülenmesi
- 4) Optimizasyon için öncelikle tek bir örnek ile deneme çalışması yapılarak tanımlanan proteomun incelenmesi

- 5) Gerçek çalışma için örneklerin pool edilerek toplamda 12 tüpte 60 örneğin kütle spektrometrisinde çalışılması
- 6) Hesaplamalar ve istatistiksel analiz



Şekil 8. Örneklerin birleştirilme (pooling) dizaynı

Her grupta beşer adet örnek bir tüpte toplanarak Kontrol_1, Kontrol_2, Kontrol_3, Kontrol_4; CIN1_1, CIN1_2, CIN1_3, CIN1_4; CIN2&3_1, CIN2&3_2, CIN2&3_3, CIN2&3_4 şeklinde etiketlenerek 60 örnek 12 tüpte toplanmıştır. (BioRender ile oluşturulmuştur.)

Her örneğin total protein konsantrasyonu tek tek ölçülmüştür. Altmış örneğin ortalaması 723.931 $\mu\text{g/mL}$ (± 409.17 standart sapma, medyan: 605.67); kontrol grubunun 840.73; CIN1 grubunun 602.46; CIN2&3 grubunun 722.30 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Çalışmada kullanılan örnekler hekimlerden gelen kronolojik sıra ile tamamen rastgele seçilmiş olmakla beraber, sarı/kızıl gibi renk değişimi olup şeffaf/beyaz olmayan örnekler, yoğun kan kontaminasyonu ihtimali düşünülerek çalışmaya dahil edilmemiştir.

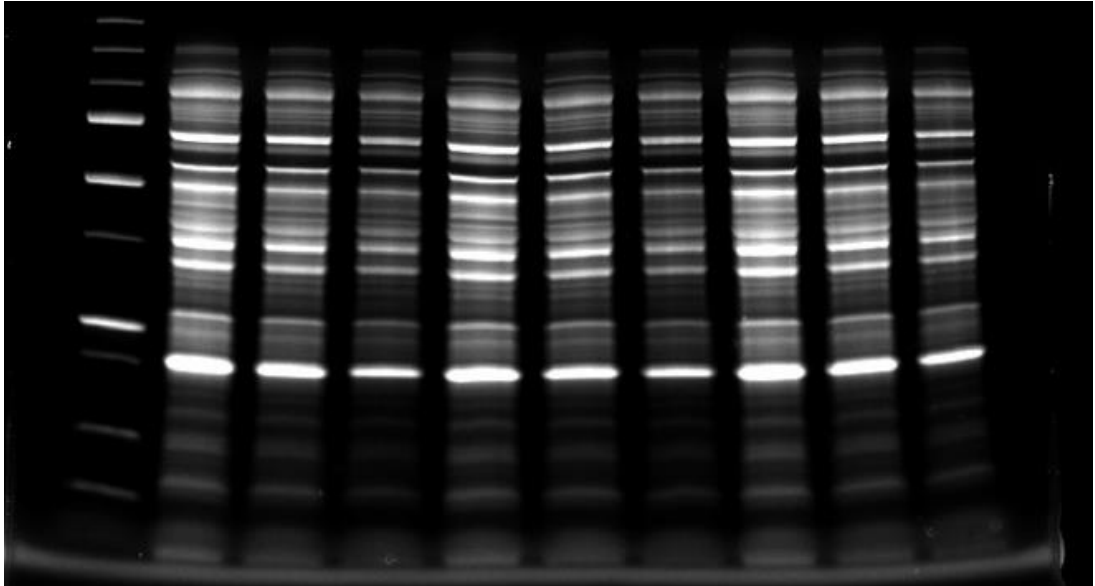
3.3.2.1 SDS-PAGE

Örnekler SDS ile muamele edilmiş, BioRad #1658000 Mini Protean Tetra Cell hazır jel kiti kullanılarak SDS-PAGE deneyi yapılmıştır. Jelden sindirim (in-gel digestion) yöntemi kullanılması amacıyla değil, SVS örneklerinden proteomik analiz bu laboratuvarda ilk defa yapılacak olduğu için, LC enjeksiyonu öncesinde örneklerin protein içeriğini görüntülemek amaçlanmıştır.

SDS jelinde görüntülenecek örnekler gruplar halinde tamamen karıştırılarak (5'er μL olmak üzere tüm kontrol örnekleri bir araya, tüm CIN1 örnekleri bir araya

ve tüm CIN2&3 örnekleri bir araya getirilerek) hazırlanıp üç teknik tekrar olmak üzere kuyucuklara yüklenmiştir.

Separasyon jeli, %12'lik konsantrasyonda hazır akrilamid-bisakrilamid karışımına %10'luk 80 µL amonyum persülfat (Sigma-Aldrich A3678) ve 8 µL tetrametiletildiamin (BioRad #FB2411) ilavesiyle hazırlanıp, 0,75 mm kalınlığında olacak şekilde iki cam plakanın arasına dökülmüştür. Örnekler 4X numune tamponu (Sigma-Aldrich #70607) ile karıştırılıp 95°C'de 3 dakika inkübe edilmiş ve protein ladder (Thermo Fisher Scientific #26616) ilk sırada olacak şekilde kuyucuklara 14 µL hacimde yüklenmiştir. Başlangıçta 100V, daha sonra mavi tampon boyası jelde görüldüğünde 120V elektrik potansiyeli ile elektroforez, BioRad Mini Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell sisteminde gerçekleştirilmiştir. Separasyon tamamlandığında jel, %40 metanol %10 asetik asit içerisinde çözünmüş 10 mL Coomassie blue (Merck #42655) içeren küçük bir plastik kutuya koyulup boyanması için çalkalayıcıda 45 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Fazla boyayı giderme amacıyla destain işlemi %5 asetik asit ile çalkalama işlemi 15'er dakikalık zaman aralıklarıyla 3 kez tekrarlanmış ve ardından jel BioRad ChemiDoc™ MP Imaging System cihazı ile görüntülenmiştir.



Şekil 9. Örneklerin SDS-PAGE jel görüntüsü

Kuyucuklar sırasıyla: Protein ladder, Kontrol grubu miks (sıradaki üç kuyucuk), CIN1 grubu miks (sıradaki üç kuyucuk), CIN2&3 miks (sıradaki üç kuyucuk)

3.3.2.2 Proteomik analiz

Triptik peptitleri elde etmek için, daha önceden optimize edilmiş (194,195) protokoller ve Universal Protein Extraction Kit Expedeon #44101 ile FASP yöntemi uygulanmıştır. İlk adımda, Protein-LoBind tüplerinin içinde her 250 µL örneğe 100 µL hacimde 1:100 oranında karıştırılmış proteaz inhibitör kokteyli (Expedeon #44204) ve SDS içerikli protein ekstraksiyon (Expedeon #44101, Universal Protein Extraction) solüsyonu eklenip protein denatürasyonunu sağlamak için 95 °C'de 15 dakika kaynatılmıştır. Denatürat, filtreli tüpe alınmış, her kimyasal muamele adımından sonra filtreli tüpün santrifüjlenmesiyle devam edilmiştir. Denatürat, ditiyotretol (DTT) ile indirgendi ve iyodoasetamid (IAA) ile alkile edildi ve peptitleri serbest bırakmak için filtre üzerindeki deterjan ve tuzları arındırmak için yıkama adımları gerçekleştirilmiştir. Önce SDS içeriği 8 M konsantrasyonlu üre ile, sonrasında üre içeriği ise 50 mM amonyum bikarbonat ile, her biri 15'er dakikalık 14.000 rpm'de olan santrifüjleme adımlarıyla elimine edilmiştir. Örnekler tripsinizasyon için Pierce #390057 tripsin enzimi ile gece boyu 37 °C etüvde inkübe edilmiştir.

Triptik peptidlerin konsantrasyonu, Pierce™ Kantitatif Kolorimetrik Peptid Test Kiti (Thermo Fisher Scientific #23275) ile tayin edilmiş ve enjeksiyon hacimleri, 200 ng/mL nihai konsantrasyon olacak şekilde belirlenmiştir.

Separasyon ve spektrometri analizi için nanoUHPLC ile Xevo G2-XS Quadrupole Time-of-Flight (QToF) sistemi (Waters, UK) kullanılmıştır. Symmetry guard C18 (100Å, 5 µm, 180 µm x 20 mm) kolonunda asetonitril (ACN) gradyanı ile (%4 ila %40 ACN, 0.3 µL/dak akış hızı) toplamda 60 dakikalık sürede CSH C18 (1.7 µm, 75 µm × 250 mm) analitik nano ölçekli kolondan elüt edilmiştir. SONAR pozitif iyon modu uygulanarak peptitler HSS T3 (Waters #186008818) kolonunda asetonitril gradyanında hidrofobik karakterlerine göre ayrılmış ve fraksiyonlanmıştır. Sinyaller 50-2000 m/z aralığında toplanmıştır. MS/MS'ten elde edilen ham veri dosyası, Progenesis QIP (V.2.4 Waters, 2018) yazılımına aktararak veriler normalleştirilmiş bolluk değerlerine (normalized abundance values) dönüştürülmüştür. Proteinleri

tanımlamak ve sınıflandırmak için Progenesis QIP yazılımı ve UniProt insan protein veritabanı kullanılmıştır. Her bir protein için en az 3 farklı peptid tanımlanmış olması koşuluyla ve $<1\%$ yanlış keşif oranı (False Discovery Rate, FDR) sınırlamasıyla filtreleme yapılmıştır, üç grup için hizalama (alignment) yapılarak tüm enjeksiyonlarda ortak olarak tanımlanan proteinlerin bağıl bolluk değerleri elde edilmiştir.

3.3.2.3 İstatistiksel analiz

Progenesis QIP programından tanımlanan proteinlerin ekspresyon seviyelerini ifade eden miktar değerleriyle beraber bir excel dosyası olarak alınan protein listesi, öncelikle her bir grup için Shapiro-Wilk testi uygulanarak, gruplarda normal dağılım gösteren (>0.5) ve göstermeyen (<0.5) değerlere sahip proteinler belirlenmiştir. Ardından proteinlerin gruplar arası farklı oranda miktar değerleri olup olmadığını araştırmak için SPSS ve GraphPad yazılımları kullanılarak istatistiksel anlam analiz testlerine tabi tutulmuştur. Çalışma gruplarında normal dağılım gösteren örneklerle One-way ANOVA; göstermeyenlerde ise Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) olan proteinler için, kutu grafikleri çizilerek gruplar arası dağılımları gözlenmiştir. Gruplardaki dağılımı gradyan olan proteinlerin klinik ayırım gücünü ifade eden sensitivite ve spesifisite değerlerinin ortaya çıkarılması için GraphPad yazılımı ile alıcı işlem karakteristik ROC eğrisi çizilmiş, AUC değeri hesaplanmıştır. Gruplardaki dağılımı gradyan ve istatistiksel olarak anlamlı olan proteinler için Temel Bileşenler Analizi ("Principal Componen Analysis", PCA) grafiği ve ısı dendrogramı (heatmap) çizilmiştir.

3.3.3 Servikovajinal sıvıdaki organik asitlerin hasta ve sağlıklı bireylere ait örneklerdeki miktar farklılıklarının araştırılması

Bu çalışmada, SVS bileşimindeki organik asitler araştırılmıştır. Bu doğrultuda, Acıbadem Altunizade Hastanesi Jinekoloji Polikliniğine gelen ve dışlama sebeplerini bulundurmayan 18-65 yaş arası çalışmaya gönüllü olan kadınlardan alınan 10 tane kontrol, 10 tane CIN1, 5 tane CIN2, 4 tane CIN3 ile 2 adet CIS olmak üzere deneyin

başlangıcında toplam 31 SVS örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Fakat bunlardan 10 adet örneğin kromatografisi başarısız olduğu için ölçüm yapılamamış ve analize dahil edilmemiştir. Dolayısıyla bu elenme sonrasında 7 kontrol, 5 CIN1, 5 CIN2, 2 CIN3, 1 CIS örneği ile analize devam edilmiştir.

Örneklere önce metanol ekstraksiyonu, sonra organik asit ekstraksiyonu ile türevlendirme (derivatization) işlemleri uygulanmış ve gaz kromatografisi (GC-MS) ile tarama (full scan) modunda, SVS materyalindeki tüm organik asit içeriğinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

3.3.3.1 Organik asit ekstraksiyonu

SVS örneklerine öncelikli olarak metanol ekstraksiyonu yapılarak proteinli debris çöktürülüp uzaklaştırılmıştır. Örnekler buz üzerinde çözdürüldükten sonra, 500 µL SVS örneğine -20 °C'de soğutulmuş 500 µL LC-grade saf metanol eklenip 20 saniye vortekslenmiştir. Ardından +4°C'de 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve bu iki aşama bir kez daha uygulandı. Pellet bozulmadan yaklaşık 1 mL süpernatant çekilip yeni tüplere aktarıldı. Daha sonra, dahili standart olarak her tüpe 200 uL 1 mM/L konsantrasyonda 4-fenilbütirat (MS sonuçlarında kütüphanede “4-phenylbutyric acid trimethylsilyl ester” olarak tanımlanmıştır) eklenerek organik asit ekstraksiyon protokolüne başlanmıştır. Her bir tüpe 1 gr NaCl ve 250 µL 6M HCl ilave edilerek 15 saniye vortekslendi. Daha sonra her bir tüpe 3 mL etil asetat ilave edilerek 15 saniye vortekslendi. Tüpler 2.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı. Etil asetat ekstraksiyon adımı tekrarlandı. Daha sonra her bir tüpe 1 gr sodyum sülfat ilave edildi ve 15 saniye vortekslendi. Örnekler 2.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve süpernatant temiz tüplere aktarıldı. Süpernatant daha sonra nitrojen gazı altında tamamen kurutuldu. Kurutma işleminden sonra, türevlendirme için trimetilklorosilan (BSTFA + TMCS; Thermo Fisher Scientific #TS38831) ile 25 µL N,O-bis(trimetilsilyl)trifloroasetamid ve 75 µL piridin eklendi ve tüpler 15 saniye vortekslendi ve ardından 80 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Örneklerin yanısıra, bir adet sadece örnek koruma solüsyonu içeren blank de tüm deneylere negatif kontrol olarak dahil edilmiştir.

3.3.3.2 GC-MS analizi

Soğutulan örnekler GC-MS (Thermo Fisher Scientific TRACE™ 1300 Single Quad GC-MS ISQ-LT sistemi) ile analiz edilmek üzere cam viallere aktarılmıştır. Pulsed splitless mod kullanılarak 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm (Thermo Fisher Scientific TG-5SILMS) ölçülerindeki kolon ile, 1 µL hacimde örnek enjeksiyonuyla analiz başlatılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak 1.5 mL/dk sabit akış hızında helyum kullanılmıştır. Fırın sıcaklığı 80 °C'de 4 dakika tutuldu, ardından 8 °C/dk hızla 290 °C'ye kadar yükseltip ve 10 dakika tutulmuştur.

3.3.3.3 Kromatogram ve pik analizi

OpenChrom (openchrom.net) yazılımında her bir örneğin kromatogramında pik entegrasyonu yapıp NIST-08 (chemdata.nist.gov) veritabanı kullanılarak spektrum listesi çıkarılmıştır.

3.3.3.4 İstatistiksel analiz

Normalize edilmiş pik alanlarının gruplar arası fark analizi için GraphPad yazılımında Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. Anlamlı fark bulunan bileşenlerin gruplar üzerindeki dağılımını görebilmek için kutu grafikleri çizilmiştir.

3.3.4 Servikovajinal sıvıdaki belirli oksisterollerin hasta ve sağlıklı bireylere ait örneklerdeki miktar farklılıklarının araştırılması

Bu çalışmada, SVS örnekleri kolposkopik biyopsi ve/veya LEEP hastası olan bireylerden alınmış ve çalışma grupları histopatolojik değerlendirme sonuçlarına göre dizayn edilmiştir. Neoplastik olmayan 10 örnek ile kontrol grubu (n: 10), 14 adet örnek ile CIN1 ve 14 adet örnek ile CIN2&3 grubu örnek ile çalışma gerçekleştirilmiştir.

3.3.4.1 Örneklerin lipid ekstraksiyonu

Daha önce geliştirilmiş olan ekstraksiyon metodu kullanılarak örneklerden lipid ekstraksiyonu yapılmıştır. Özetle, 500 µL örnek 1 mL soğuk metanol ile karıştırılıp, bir ultrasonik banyo sonikatöründe (ThomasSci Branson CPX5800H) sonike edilmiş, $14.000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve SpeedVac'ta 2 saat boyunca içeriğindeki metanol ve su uçurularak kurutulmuştur. Kurutulan örneklerle %0.5 formik asit ile 40 µL %40 metanol:su içinde çözülmüştür.

3.3.4.2 Total kolesterol ölçümü

Örneklerin içeriğindeki total kolesterol miktarı Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen™ #A12216) ile ölçülmüştür. Özetle, 25 µL örnek 25 µL reaksiyon tamponu ile karıştırılmış ve mikrolaka kuyucuklarına alınmıştır. Amplex® Red reaktifi/HRP/kolesterol oksidaz/kolesterol esterase içeren çalışma solüsyonu da örneklerin üzerine eklenmiştir. Plaka 30 dakika boyunca 37°C'de ışıktan korunarak inkübe edildi ve 570 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Bu ölçümün yapılma sebebi, 1-) örneklerin içeriğinde kolesterol ve türevlerinin miktarı hakkında bilgi sahibi olmak ve deneye başlangıç konsantrasyonunun belirlenmesi gibi birtakım analiz parametrelerini buna göre şekillendirmek; 2-) örneklerdeki total kolesterol miktarının tespit edilip daha sonra oksisteroller ile arasında bir korelasyon olup olmadığını görmektir.

3.3.4.3 Hedeflenen lipidler ve kullanılan kimyasallar

Beş hidroksisterol: 7 α ,27-dihidroksikolesterol (7 α ,27-diOHC), 27-hidroksikolesterol (27-OHC), 26-hidroksikolesterol (26-OHC), 7 β -hidroksikolesterol (7 β -OHC) ve 7-ketokolesterol (7- KC); daha önce literatürde açıklandığı gibi çoklu reaksiyon izleme (Multiple Reaction Monitoring: MRM) yöntemi kullanılarak hedefli tandem MS ölçümü yapılmıştır. Otantik (authenticated) ve döteryum işaretli (radyoizotopik) standartlar Avanti Polar Lipids (Alabama, ABD) ve Cayman Chemicals (MI, ABD) firmalarından hazır olarak satın alınmıştır. HPLC-grade

bütülasetat, heksan, izopropanol, metanol ve formik asit Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, ABD) firmasından; bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), Waters firmasından (Manchester, BK) satın alınmıştır.

3.3.4.4 MRM yöntemiyle LC-MS/MS ölçümü

Separasyon, bir ters faz C18 kolonu (NUCLEOSIL® C18, 100 mm, 5 µm pore size, Macherey-Nagel, Germany) kullanılarak sıvı kromatografi chromatography (LC, DIONEX UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific UK Ltd., Hemel Hempstead, UK) ile gerçekleştirilmiştir. Kütle ölçümü ise MRM yöntemiyle triple quadrupole MS (QTRAP 5500, AB Sciex UK Ltd., Warrington, UK) sisteminde yapılmış ve Analyst yazılımı (sürüm 7.1) kullanılarak hedeflenen tüm oksisteroller için pik seçimi ve pik alanının hesaplanması, karşılık gelen izotoplu dahili standartların kalibrasyon eğrisi kullanılarak yapılmıştır. Döteryumlu 7,27-diOHC standardı ticari olarak bulunmadığından, sadece bunun için işaretli referans (otantik) standardın seri dilüsyon ölçümü kullanılarak ölçüm yapılmış ve bu ölçüme göre bir rölatif hesaplama yapılmıştır. Elde edilen verilerin güvenilirliğini sağlamak ve ölçümler arası varyasyonu görebilmek için, veri kalitesinin değerlendirilmesinde (her 3 ölçümde bir) kalite kontrol (QC) numuneleri kullanılmıştır.

3.3.4.5 İstatistiksel analiz

SPSS ve GraphPad Prism yazılımları kullanılarak kantitasyonu yapılan her bir oksisterolün her bir örnekteki değeri için fark analizi yapılmış, kutu grafikleri çizilmiştir.

3.3.5 Servikovajinal sıvıdaki protein oksidasyonunun hasta ve sağlıklı bireylere ait örneklerdeki farklılıklarının araştırılması

Literatürde karbonillenmiş proteinlerin ölçümü birkaç adet ticari hücre hattı (Perluigi ve diğerleri, 2009) ve hastalardan alınan serum veya plazma örneklerinde (Gautam ve diğerleri, 2017) yapılan çalışma haricinde, yalnızca bir adet servikal

doku örnekleriyle yapılmış çalışma mevcuttur. Bu doğrultuda, literatürdeki ilk örnek olan bu pilot çalışmada üç grup olmak üzere 10 adet kontrol, 17 adet CIN1, 16 adet CIN2+ (6 adet CIN2, 4 adet CIN3, 1 adet AIS, 1 adet SCC, 1 adet uterin serviksin lenfoması [primary diffuse large B cell lymphoma of the uterine cervix: pDLBUCx] ve 3 adet CIS) örnekleri kullanılarak ELISA plakalarında 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile karbonillenmiş proteinler arasında oluşan hidrazon yapısının spektrofotometrik ölçümü yapılmıştır. Ardından bu örneklerdeki karbonillenmiş olan proteinleri saptamak amacıyla, redoks proteomiği yaklaşımıyla amino asit modifikasyonları araştırılmıştır.

3.3.5.1 Protein karbonil deneyi

Karbonil ELISA yöntemi, Buss ve arkadaşları tarafından geliştirilen yönteme göre yapılmıştır (196). Protein karbonil ölçümü, üçüncül yapıdaki proteinlerdeki karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenil hidrazin (DNPH) ile türevlendirilmesine ve anti-DNP antikoru ile tespit edilmesine dayalı bir yöntemdir. Kalibrasyon eğrisini oluşturacak pozitif kontrol örneği olarak, daha önceden hazırlanmış (197) redükte sığır serum albümin (bovine serum albumin: BSA) protein standartları kullanılmıştır.

Normalizasyon amacıyla, örneklerin her biri total protein konsantrasyonu 20 µg/mL olacak şekilde taze hazırlanmış karbonat tamponunda (pH: 9.6; 0.05 M) seyreltilmiştir. Deney için düz tabanlı, şeffaf, absorban bir plaka (Merck #CLS9018) kullanılmıştır. İlk adımda örnekler 50 µL hacimde yani 1 µg protein içeriği olacak şekilde kuyucuklara yüklenmiş ve 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltılıp yıkama tamponuyla (1X PBS içinde, %0.05 Tween-20) yıkanmış ve 50 µL DNPH eklenip 1 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında tekrar yıkanıp bu kez bloklama tamponu (1X PBS içinde %1 Tween-20) ile plaka gece boyunca buzdolabında bekletilmiştir. Ertesi gün, önce primer antikor (Sigma #D8406 monoclonal anti-DNP) sonra konjuge sekonder antikor (rat anti-mouse IgE heavy chain secondary antibody, HRP Thermo Fisher Scientific #MA5-16781) ile muamele edilerek sırasıyla 2 saat ve 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ardından kuyucuklar yine yıkanıp 50 µl o-fenilendiamin

dihidroklorür (Sigma-Aldrich #P8287) içerikli (0.15M 10 mL sitrat fosfat tamponu içinde çözülmüş 20 mg o-fenilendiamin + 8.8M 10 µL hidrojen peroksit ile hazırlanmış) substrat ile 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir. Reaksiyon, 8.8M 10 µL sülfürik asit (H₂SO₄) ile durdurulmuş ve bir mikropilaka okuyucu cihaz (Tecan Life Science, Zürih, İsviçre) ile 490 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır.

3.3.5.2 Proteomik analiz

Protein karbonil ölçümü yapılan örnekler arasından dört adet kontrol, iki adet kanser (SCC ve lenfoma) örneğinin shotgun proteomik analizi de yapılmıştır. Toplamda 6 adet numune ikiye bölünerek deneysel ve cihazda ölçüm varyasyonunu minimize etmek amacıyla tripsinizasyondan itibaren biyolojik tekrar olarak duplike halde ölçülmüştür.

Proteomik deney için 50 µL SVS numunelerine %0.1 oranında 100 µL MS-uyumlu deterjan RapiGest (50 mM amonyum bikarbonat [Waters, Milford, MA, ABD] içinde çözündürülmüş) eklenmiştir. Karışım, sonikasyon ile homojenize edilmiş ve 95°C'de 400 rpm'de çalkalanarak 10 dakika kaynatılmıştır. DTT ile indirgeme ve IAA ile alkilasyon sonrası 10 µL hacimde 100 ng/µL tripsin (trypsin gold MS-grade, Promega) enzimi ilave edilmiş ve tüpler 37°C'de 400 rpm'de çalkalanarak bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Tripsinizasyon, %0.1 trifloroasetik asit (pH: 2) ile sonlandırılmış ve numuneler, debris çöktürmek için 12.000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Her örnek 100 uL hacimde LC cam şişelere aktarılmıştır.

Örnekler separasyon için Ultimate 3000 HPLC sistemine (Thermo Fisher Scientific, Germering, Almanya) 5 uL hacimde enjekte edilerek ilk olarak bir tuzak (trap) kolona (PepMap C18, 300 µm ID, 5 mm uzunluk, 5 µm partikül boyutu, 100 Å gözenek boyutu; Thermo Fisher Scientific) yüklenmiştir. Tandem MS için yüksek rezolüsyonlu Orbitrap Fusion Lumos Tribri (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, ABD) veriye bağlı edinim modu (data-dependent analysis: DDA) ile analiz edilmiştir.

HPLC’de ilk 10 dakika boyunca %0.1 trifluoroasetik asitte 20 µL/dak akış hızında yükleme solventi kullanılmış, daha sonra tuzak kolondan analitik kolona (PepMap C18, 75 µm ID × 250 mm, 2 µm partikül boyutu ve 100 Å gözenek boyutu, Thermo Fisher Scientific) geçirilmiştir. Peptitler, 250 nL/dak'da %3 - %30 aralığında değişen 90 dakikalık bir asetronitril gradyanı (ve sırasıyla %0.1 ila %0.08 formik asit konsantrasyonu) ile yıkanmıştır. MS/MS spektrumları ProteoWizard yazılımı (sürüm 3.0.9248) kullanılarak kaydedilmiştir.

Elde edilen .mgf dosyaları daha sonra, tripsinizasyon ve partikül iyon kütle toleransı kullanılarak insan UniProtKB/Swiss-Prot veritabanına (sürüm 2012_12, Human Taxonomy) karşı protein tanımlaması için Mascot yazılımına (sürüm 2.3.01, Matrix Science) gönderilmiştir. 0,80 Da, ana iyon kütle toleransı 10 ppm ve maksimum kaçırılan yarıлма (cleavage) sayısı ikidir. Metioninin oksidasyonu değişken bir modifikasyon olarak ve IAA kullanıldığı için sisteinin karbamidometilasyonu sabit bir modifikasyon olarak belirtilmiştir.

Maskot araştırmasından elde edilen peptit verileri, filtreleme için Scaffold (sürüm 5.1.2, Proteome Software Inc.) kullanılarak işlenmiştir. Proteinlerin sayısı <%1 yanlış pozitif oranı (false-discovery rate) şart koşularak, >%95 doğru protein tanımlama olasılığı, %99 doğru peptit tanımlama olasılığı ve her protein için en az bir adet peptit tanımlanmış olması koşullarını ihtiva eden "Peptide Prophet" algoritmasının kriterlerine göre Scaffold yazılımında listelenmiş ve tüm peptit dizilimleri ve aminoasit modifikasyonlarla beraber görüntülenmiştir. Tanımlanan proteinlerin biyolojik fonksiyon ve hücresel lokasyon analizi ayrıca Panther web sitesinde (pantherdb.org) gerçekleştirilmiştir.

3.3.5.3 Aminoasit modifikasyonları için informatik analiz

Literatürde karbonillenmeye en meyilli olduğu bilinen lizin, prolin, arjinin ve treonin aminoasitlerinin hangi proteinlere ait hangi peptidlerde olduğunu araştırmak için Mascot Daemon veri tabanı araştırması kullanılmıştır. Ham verinin Mascot işlenmesi esnasında MS konfigürasyon parametreleri içinde C, H, N veya O

atomlarını kaybederek veya kazanarak karbonilasyon nedeniyle kütle kaymasına ilişkin aminoasit modifikasyonları ayarlandı. Prolinin ($C_5H_9NO_2$) piroglutamik aside ($C_5H_7NO_3$) geçişi için iki adet Hidrojen ve bir adet Oksijen atomu kazanması sebebiyle kütle kaydırma (mass shift) modifikasyonu “H(+2) O” girilmiştir. Arjinin ($C_6H_{14}N_4O_2$) ile glutamik-5-semialdehit ($C_5H_9NO_3$) için “C(-1) H(-6) N(-3) O” girilmiştir. Treonin ($C_4H_9NO_3$) ile 2-amino 3-oksobutanoik asit ($C_4H_7NO_3$) için “H(-2)” girilmiştir. Son olarak lizin ($C_6H_{14}N_2O_2$) için 2-aminoadipik asit ($C_6H_{11}NO_4$) için “H(-3) N(-1) O(2)” modifikasyonu girilmiştir.

3.3.5.4 İstatistiksel analiz

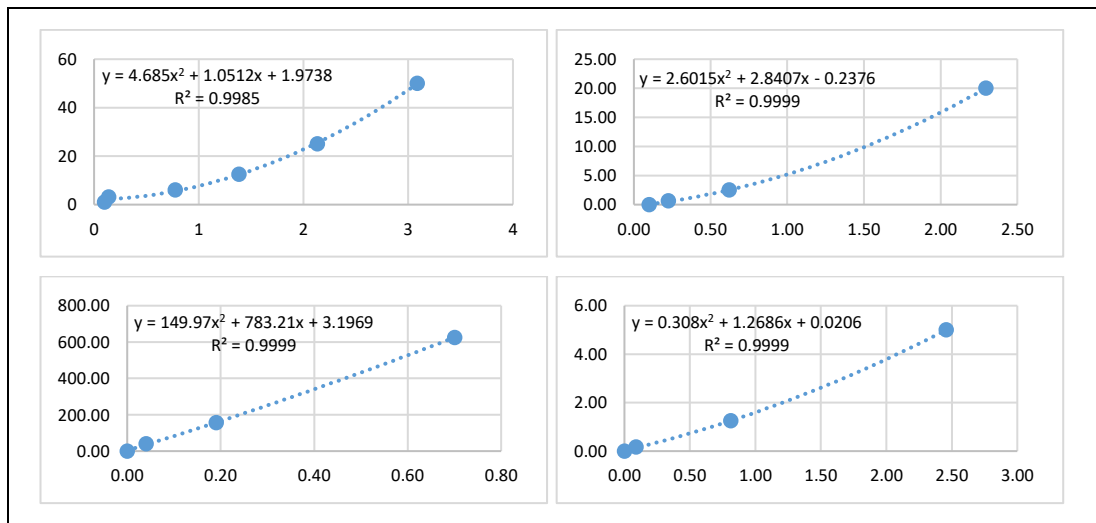
Protein karbonil ELISA ölçüm sonuçlarından elde edilen veriler ile gruplar Kontrol, CIN1, CIN2&3 ve Kanser olmak üzere dört grupta değerlendirilirken; ROC eğrisi analizinde Kontrol ve CIN2+ olarak değerlendirildi, CIN1 grubu her iki gruba da dahil edilemeyecek geri dönüşüm ihtimali çok yüksek olan hafif displazi olduğu için bu hesaplamadan ekarte edilmiştir. ROC eğrisi grafiği, iki bağımsız değişkeni bağımlı değişkenlerin (control versus cases) klasifikasyonu açısından kıyaslayan matematiksel bir teknik olduğu için bu analizde Kontrol grubuna “0”; CIN2, CIN3 ve kanser örneklerini de içeren CIN2+ grubuna ise “1” değerleri atanarak grup sayısı ikiye indirilmiş ve verilerin grupları ayırım gücü ortaya çıkarılmıştır. GraphPad yazılımı kullanılmıştır.

4 BULGULAR

4.1 Servikovajinal Sıvıdaki Potansiyel Protein Biyobelirteçlerin Elisa Testi ile Miktar Tayini

4.1.1 Optimizasyon sonuçları

Yapılan çalışmanın sonunda, matriksin yoğun bir negatif etkisinin olmadığı gözlenmiş, fakat her bir biyobelirteç için ayrı ayrı olmak üzere, farklı düzeyde total protein konsantrasyonlarına sahip örneklerde farklı oranlarda seri seyreltmeler uygulanmış ve her bir örnek ve her bir biyobelirteç için özel olarak optimum seyreltme oranı saptanmıştır. Kitlerin geri kazanım çalışması için ise kitin ihtiva ettiği standartlar ile örnekler belirli oranlarda karıştırılarak “spike” yöntemi uygulanmış ve kitin geri kazanımında teknik bir sorun olmadığı belirlenmiştir. Her bir hedef protein için 24 kuyucuklu ikişer ELISA plakası kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmalarına ait grafikler ve ölçüm sonuçları aşağıdaki gibidir. ACTN4 için, farklı düzeylerdeki total protein konsantrasyonlarıyla sekiz adet numune ile çalışılmıştır: 571,58 µg/mL, 44,58 µg/mL, 1021,05 µg/mL, 120,13 µg/mL, 1910,09 µg/mL, 1525,51 µg/mL, 1137,22 ug/ mL ve 54,73 µg/mL. Her örnek ayrı ayrı seri olarak 10’da 1, 100’de 1, 500’de 1 ve 1000’de 1 oranında seyreltilmiştir.



Şekil 10. Kalibrasyon eğrisi grafikleri

Yukarıdan aşağı: ACNT4, ANXA2, SCCA1, SCCA2 için yapılan optimizasyon çalışmasının kitteki standartların (rekombinant protein) absorbans değerleriyle elde edilen kalibrasyon eğrisi. X eksen: protein konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$); Y eksen: cihazın absorbans değeri. (Microsoft Excel ile oluşturulmuştur.)

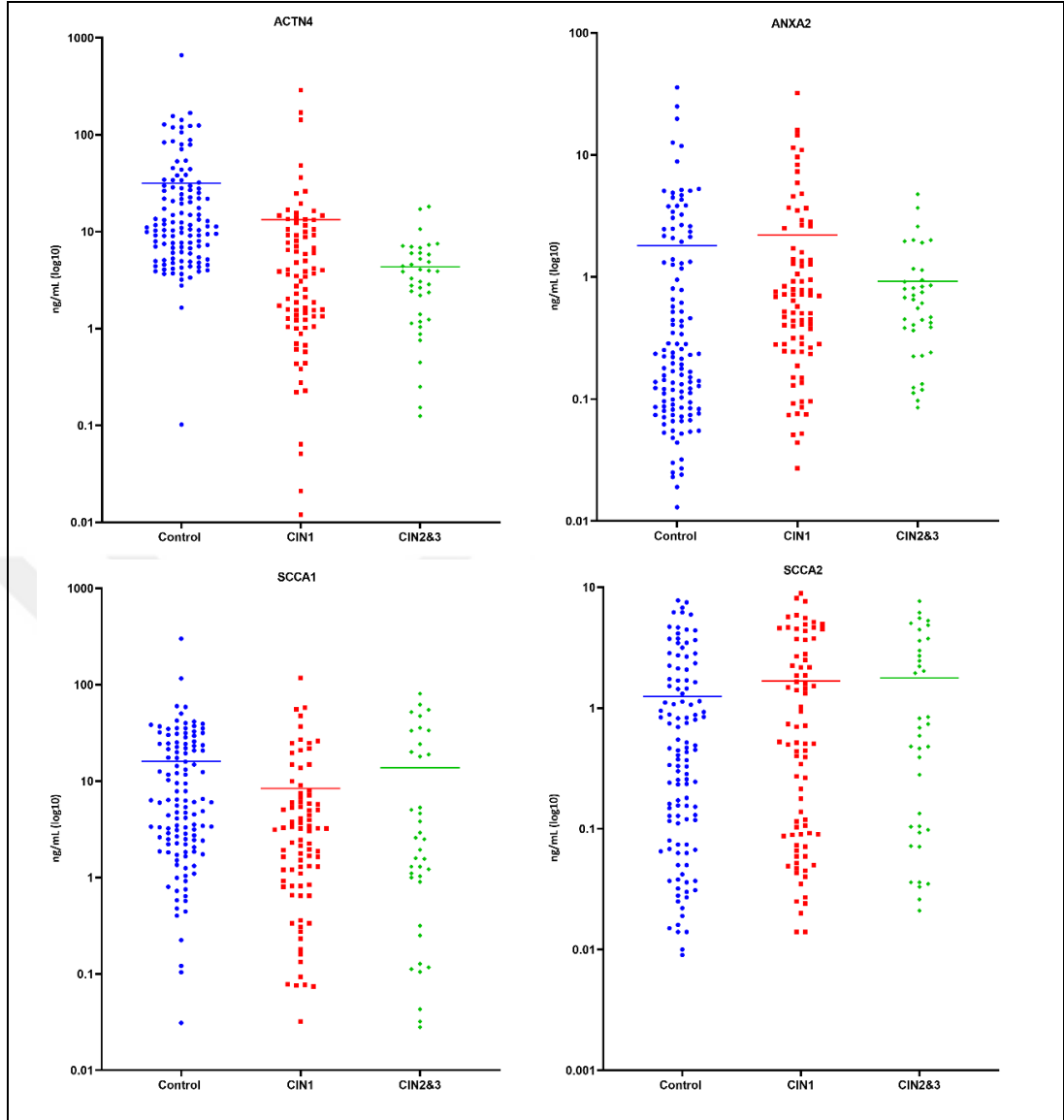
Aynı numuneler diğer hedef proteinler için ayrıca 2'de 1, 3'te 1 ve 5'te 1 oranında da seri olarak seyreltilmiştir. Nihayetinde, ölçüm sonucuna göre her hedef için ayrı bir seyreltme planı ortaya çıkarılmıştır: Her örnek, total protein konsantrasyonuna göre ACTN4 için farklı bir seyreltme oranı gerektirir. Eğer örneğin total protein konsantrasyonu $1000 \mu\text{g/mL}$ 'nin altındaysa gerekli seyreltme oranı 100'de 1; örneğin total protein konsantrasyonu $1000 - 3000 \mu\text{g/mL}$ arasındaysa gerekli seyreltme oranı 500'de 1; örneğin total protein konsantrasyonu $3000 \mu\text{g/mL}$ 'nin üzerindeyse gerekli seyreltme oranı 1000'de 1'dir. Diğer üç hedef proteinin ölçümünde, herhangi bir total protein konsantrasyonu düzeyi için, örneğin 1:3 oranında seyreltilmesi yeterlidir.

Özet:

- [1] ACTN4 için: Total protein konsantrasyonuna göre;
 - < $1000 \mu\text{g/mL}$ ise 1:100 seyreltme oranı;
 - $1000 - 3000 \mu\text{g/mL}$ ise 1:500 seyreltme oranı;
 - $3000 \mu\text{g/mL}$ ise 1:1000 seyreltme oranı uygulanır.
- [2] ANXA2 için: Örnekler 1:3 oranında seyreltilerek çalışılacaktır.
- [3] SCCA1 için: Örnekler 1:3 oranında seyreltilerek çalışılacaktır.
- [4] SCCA2 için: Örnekler 1:3 oranında seyreltilerek çalışılacaktır.

4.1.2 ELISA testi ölçüm sonuçları

Çalışmada kullanılan her bir örnekte dört hedef proteinin de miktarı (ng/mL) ölçülmüştür. Örneklerin hepsi de her bir hedef protein için ayrı ayrı belirlenmiş oranlarda seyreltilerek çalışılmıştır.



Şekil 11. Elisa test sonuçlarının gruplar üzerindeki dağılımını gösteren kutu grafikleri. Grafikler sırasıyla ACTN4, ANXA2, SCCA1 ve SCCA2 için değerlerin gruplardaki dağılımını göstermektedir. (GraphPad Prism ile oluşturulmuştur.)

Şekil 11’de görülen kutu grafiklerine göre, hedef proteinlerin klinik gruplar üzerindeki dağılımları (total protein konsantrasyonu düzeltmeli veya düzeltmesiz) hipotezle paralel değildir. ACTN4 hedef proteinin gruplar arası dağılımı Kruskal-Wallis testine göre istatistiksel olarak anlamlı ($p: 0.0001$) bulunmuştur, fakat beklentinin aksine, örneklerdeki miktarı kontrol grubundan CIN seviyelerine doğru artış yerine azalıştır. Diğer üç hedef proteinin dağılımı ise istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0.05$).

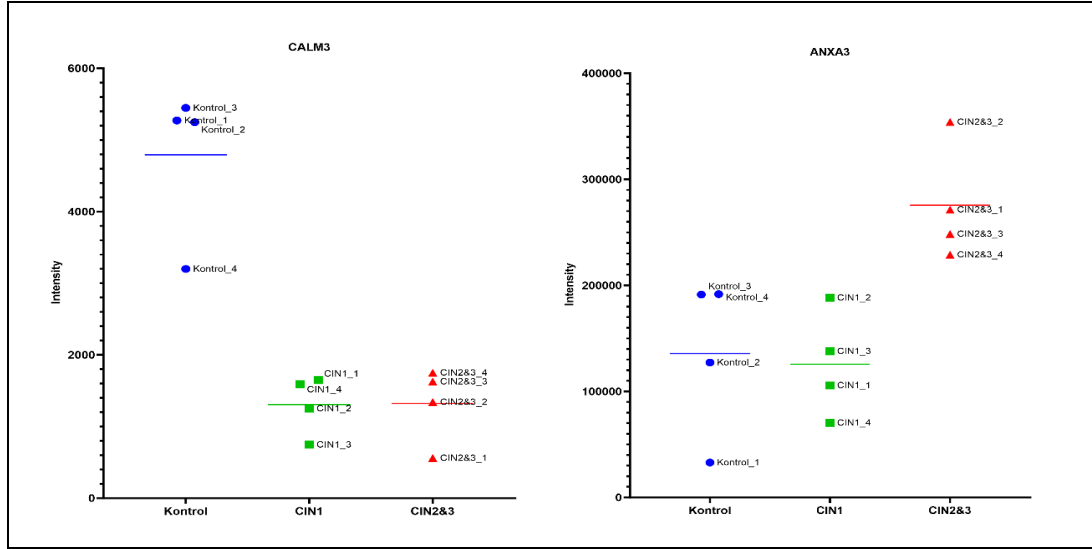
Tablo 4. Literatürde potansiyel biyobelirteç olduğu öne sürülen ACTN4 proteinin bu çalışmadaki ölçüm değerleri için tanımlayıcı istatistiki veriler

	Ctrl	CIN1	CIN2&3
Örneklem	122	85	38
Ortalama	30.36	12.23	4.33
Varyans	2282.74	1034.21	16.35
Standard deviation	47.78	32.16	4.04
Minimum değer	2.78	0.43	0.45
Medyan	11.30	3.61	3.58
Maksimum değer	70.95	24.88	10.63
Çeyrekler açıklığı	22.69	8.87	4.77

SPSS verileri, Microsoft Excel ile oluşturuldu.

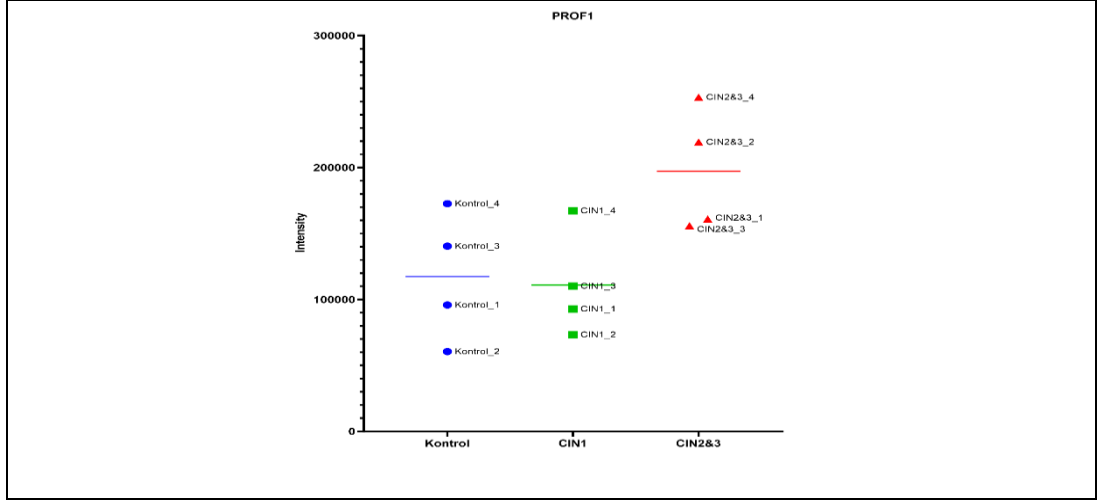
4.2 Servikovajinal Sıvıdaki Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Örneklerdeki Proteom Farklılıklarının Proteomik Yöntemler ile Araştırılması

Protein ekspresyon farklılıklarını ortaya çıkarmak için intensiti (Progenesis'te normalize edilmiş) değerleri analiz edildi. Toplamda 244 protein tanımlanmış ve bunlardan üçünün; “Calmodulin-like protein-3” (P27482, CALM3, $p<0.001$), “Profilin-1” (P07737, PROF1, $p: 0.024$) ve “Annexin A3” (P12429, ANXA3, $p: 0.05$); klinik gruplar arasında istatistiksel olarak farklı eksprese edildiği ortaya çıkmıştır.



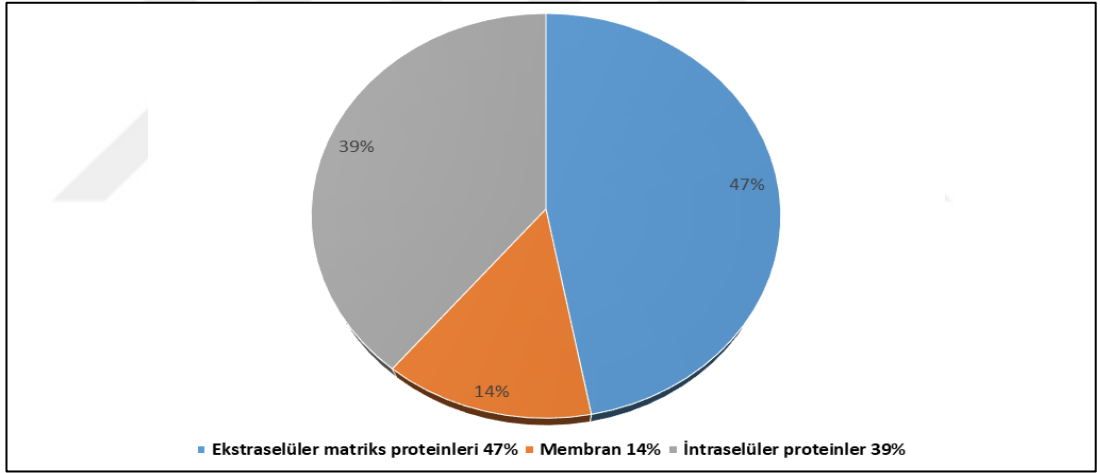
Şekil 12. İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunan CALM3, ANXA3, PROF1 proteinlerinin boxplot grafikleri

Proteomik analizde gruplar arası fark bulunan proteinlerin gruplardaki dağılımını gösteren kutu grafikleri oluşturulmuştur. (GraphPad yazılımı ile oluşturulmuştur.)



Şekil 12. İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bulunan CALM3, ANXA3, PROF1 proteinlerinin boxplot grafikleri (devam)

Proteomik analizde gruplar arası fark bulunan proteinlerin gruptaki dağılımını gösteren kutu grafikleri oluşturulmuştur. (GraphPad yazılımı ile oluşturulmuştur.)



Şekil 13. SVS proteomunun bileşimi: bu çalışmada tanımlanmış tüm proteomun hücresel lokasyona göre dağılımı

Tanımlanan proteinlerin çoğunluğu ekstraselüler proteinler olup en az membran proteinleri tanımlanmıştır. (Microsoft Excel ile oluşturulmuştur.)

Sonuçlara göre, bu çalışmada SVS proteomunun %47'si yakını hücre dışı matris proteinlerinden oluşmaktadır, ki bu beklentiyle paraleldir. Fakat %39 ile hücre içi proteinleri de önemli bir çoğunluktadır, ki bu da SVS proteomunun hem servikal squamöz epitel hücreler hem de bölgedeki sekresyonlar hakkında yeterli bilgi verdiğine işaret etmektedir.

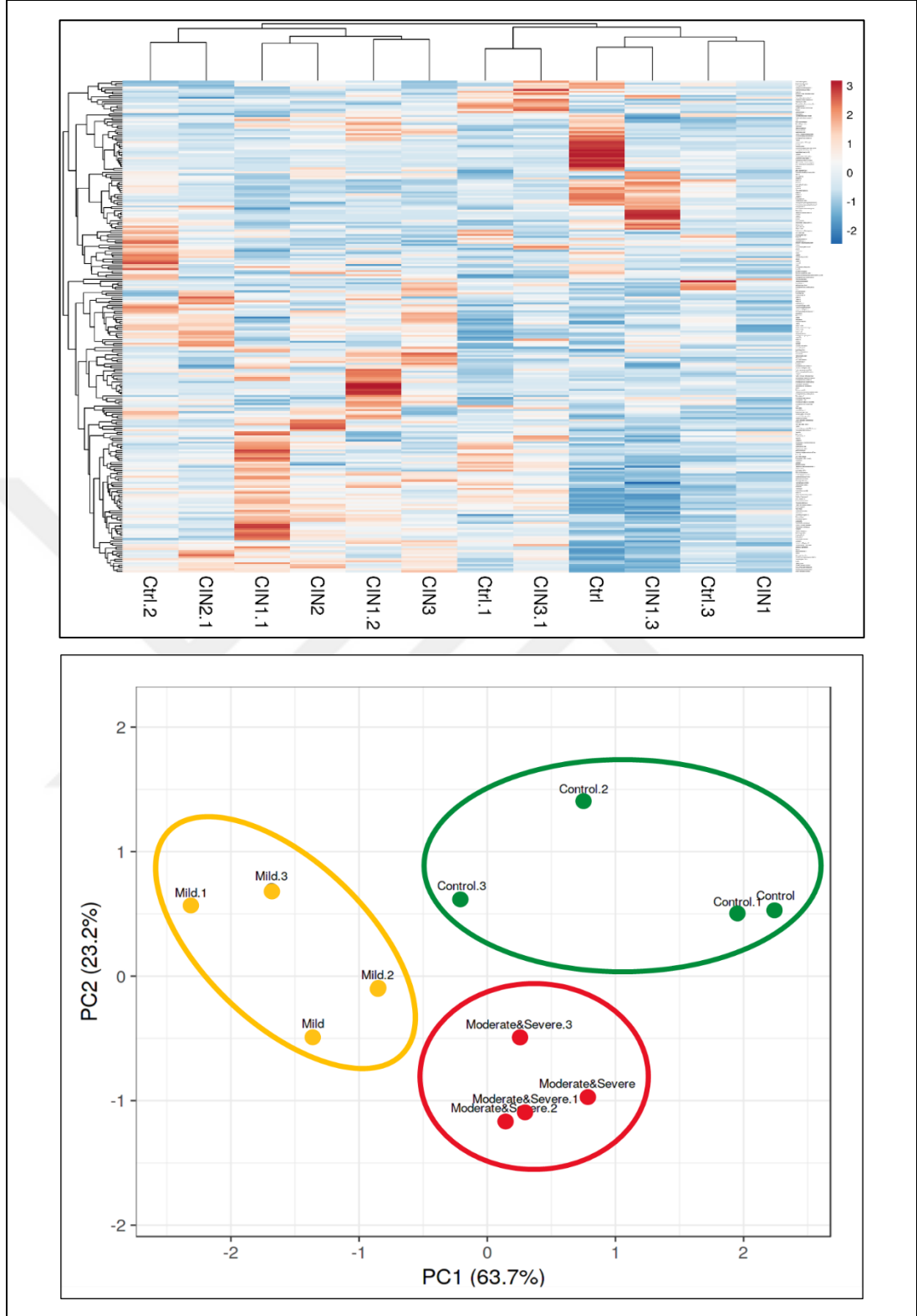
Kontrol ve CIN2&3 gruplarındaki en yüksek intensiti değerleriyle tanımlanmış yani bu örneklerde genel olarak en bol bulunmuş ilk 10 protein Tablo 4'te verilmiştir. Bu liste istatistiksel anlamlılıktan bağımsız olarak, grup-içi ekspresyon profilini değerlendirmek amacıyla incelenmektedir.

Tablo 5. Örnek gruplarında en fazla bulunan proteinler

Kontrol Grubu
1. Protein S100-A8
2. Small proline-rich protein 3
3. Polymeric immunoglobulin receptor
4. Protein S100-A9
5. Serpin B3
6. Serotransferrin
7. Lactotransferrin
8. Fatty acid-binding protein 5
9. Alpha-1-antitrypsin
10. Immunoglobulin heavy constant gamma 1
CIN2&3 Grubu
1. Protein S100-A8
2. Serotransferrin
3. Protein S100-A9
4. Polymeric immunoglobulin receptor
5. Alpha-1-antitrypsin
6. Lactotransferrin
7. IgGFc-binding protein
8. Mucin-5B
9. Immunoglobulin heavy constant alpha 1
10. Immunoglobulin heavy constant gamma 1

Sağ: Kontrol grubunda en yüksek ilk 10 intensiti değeri olan protein – Sol: CIN2&3 grubunda en yüksek ilk 10 intensiti değeri olan protein

Çalışmada anlamlı ($p<0.05$) bulunan proteinlerden temel bileşenler analizi (PCA) yapılırken, tanımlanmış tüm proteinlerden ısı dendrogramı çizilmiştir.

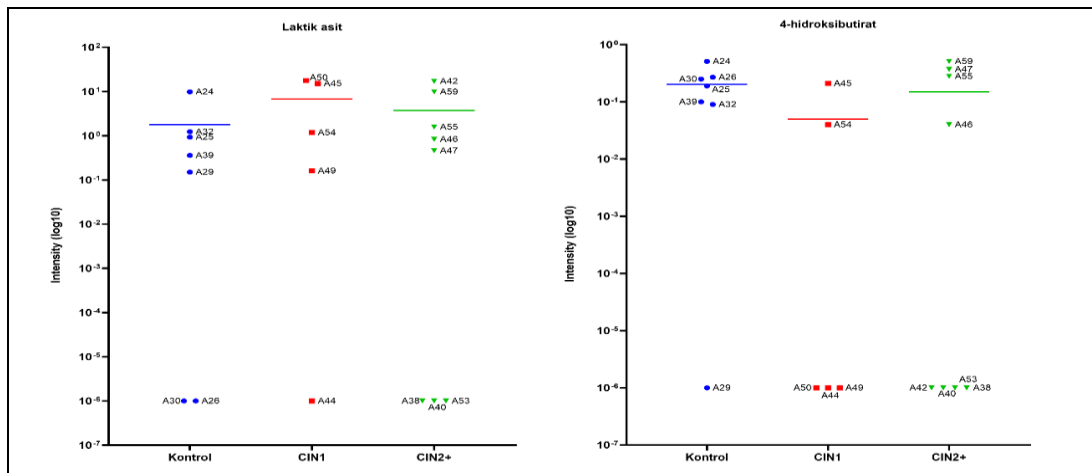


Şekil 14. Proteomik verilerinin analizi

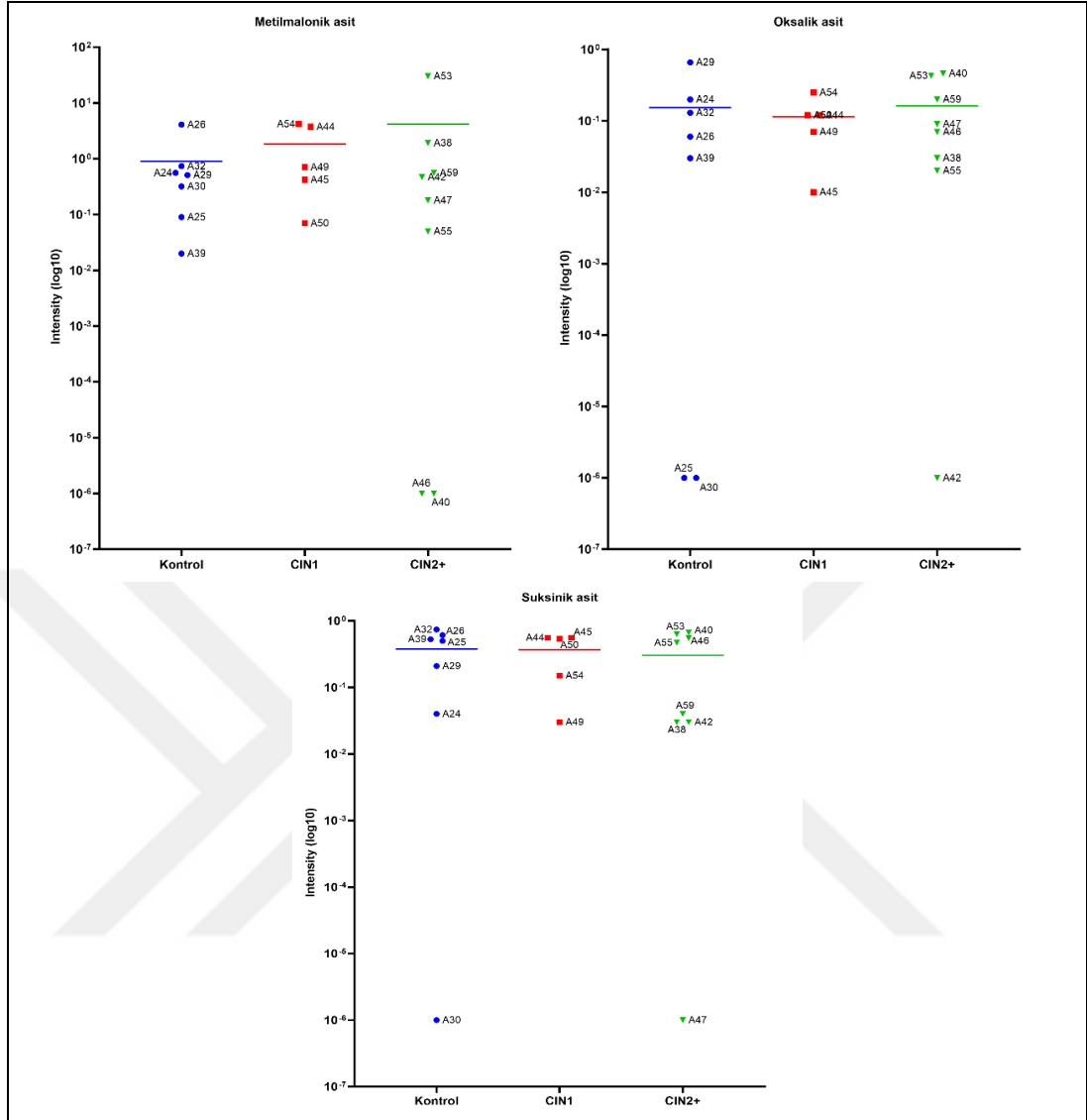
Üst: İstatistiksek olarak anlamlı bulunnan proteinlerin ısı dendrogramı; Örneklerin tanımlanan tüm proteoma göre dağılımı. Alt: temel bileşenler analizi (PCA) yeşil halka içerisinde Kontrol grubu örnekleri; sarı halka içerisinde CIN1 grubu örnekleri; kırmızı halka içerisinde CIN2&3 grubu örnekleri kümelendi. (Her ikisi de ClustVis ile oluşturulmuştur.)

4.3 Servikovajinal Sıvıdaki Organik Asitlerin Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Örneklerdeki Miktar Farklılıklarının Araştırılması

Organik asit ekstraksiyonu ve türevlendirme uygulamasının sonucunda bu deneyde örneklerdeki tüm organik asitlerin "-trimethylsilyl ester"leri tanımlanmıştır. Hedefli (Selected Ion Monitoring: SIM) olmayan, tüm spektrumun taranmasına (full-scan mode) yönelik kalitatif bir analiz gerçekleştirilmiştir. Dahili standardın spektrum listesinde görülmediği örnekler analizden ekarte edilmiştir. Negatif kontrolde de tanımlanan bileşenler analizden ekarte edilmiştir. Dahili standart olan 4-fenilbütiratın pik alanı değerleri açısından gruplar arasında istatistiki olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0.999$). Örneklerin spektrumunda listelenen bileşenlerin pik alanları (peak area) OpenChrom yazılımında tespit edilmiş ve her bir tanımlanan bileşenin pik alanı değeri iç (internal) standart olan fenilbütiratın pik alanına bölünerek normalize edilmiştir. Her örnekte ortak olarak tanımlanan bileşenlerin bağıl bollukları (relative abundance) arasındaki farklar ortaya çıkarılmıştır. Laktik, metilmalonik, oksalik, süksinik ve 4-hidroksibutirik asitlerin de negatif kontrol örneği hariç tüm örneklerde ortak olarak tanımlanan organik asitler olduğu bulunmuştur. Normalize edilmiş pik alanı değerlerinin analizi sonucunda, hiçbir bileşenin ortalama değeri gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Fakat incelemeye değer farklılıklar mevcuttur. Bu çalışmada biyobelirteç bulmak değil, daha ziyade örnekler arasında servikovajinal organik asitlerindeki farklılıkları incelenmek hedeflenmiştir.



Şekil 15. Tüm örneklerde ortak olarak tanımlanan organik asitlerin boxplot grafikleri



Şekil 15. Tüm örneklerde ortak olarak tanımlanan organik asitlerin boxplot grafikleri (devam)

Örnekleri kıyaslayabilmek için, örneklerin tamamında dahili standart ile beraber tanımlanmış ve pik alanı ölçülebilmüş olan moleküllerin gruplar arası dağılımını gösteren kutu grafikleri oluşturulmuştur. (GraphPad yazılımı ile oluşturulmuştur.)

Tablo 6. Bileşenlerin rol oynadığı biyokimyasal yollar

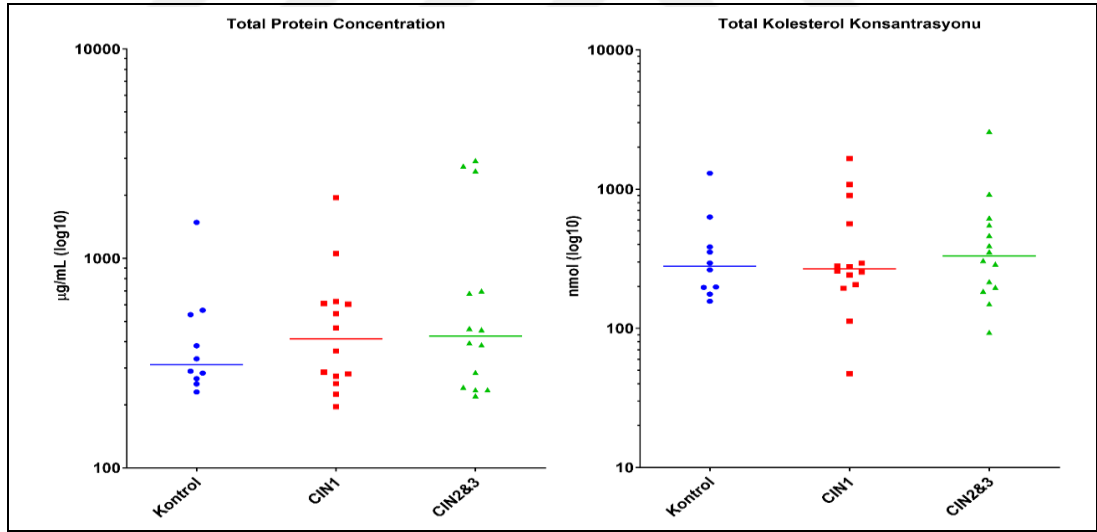
Süksinat	Yağ açıl (dikarboksilik)	Sitrat (Krebs) siklusu
		Oksidatif fosforilasyon
4-hidroksi bütanoik asit	Yağ açıl (hidroksilik)	Alanin-aspartat-glutamat metabolizması
		Lipid Metabolizması: 4-hydroxybutanoylCoA
		Prokaryotlarda karbon fiksasyon yolları
		Farklı ortamlarda mikrobiyal metabolizma

Tablo 6. Bileşenlerin rol oynadığı biyokimyasal yollar (devam)

Oksalat	Dikarboksilik anyon	Pürin metabolizması
		Kloroalkan ve kloroalken bozunması
		Glioksilat ve dikarboksilat metabolizması
Metilmalonat	Yağ açıl (dikarboksilik)	Pirimidin metabolizması
		Valin, lösin ve izolösin yıkımı
		Propanoat metabolizması

4.4 Servikovajinal Sıvıdaki Belirli Oksisterollerin Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Örneklerdeki Miktar Farklılıklarının Araştırılması

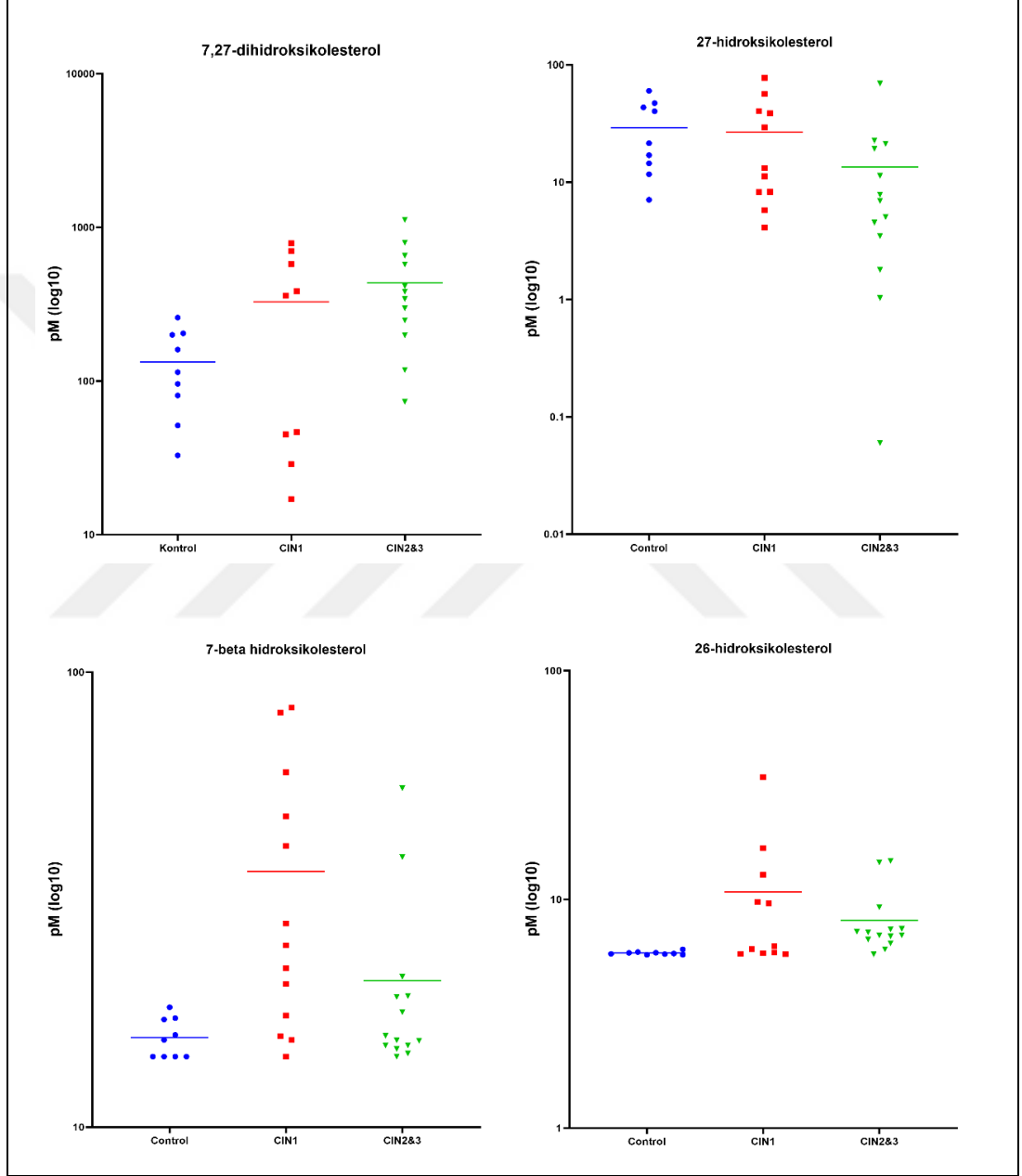
Farklı parametrelerin gruplar arasında istenmeyen bir bias oluşturup oluşturmayacağını görmek için total protein ve kolesterol değerleri incelenmiştir. Ayrıca, bunlar arasındaki korelasyonu araştırılmış ve zayıf bir pozitif korelasyon ($r: 0.17$) tespit edilmiştir ki bu da rastlantısal olarak örneklerdeki hücresel içerik bolluğunu temsil ediyor olabilir.



Şekil 16. Total protein ve total kolesterol konsantrasyonu değerlerinin dağılımı

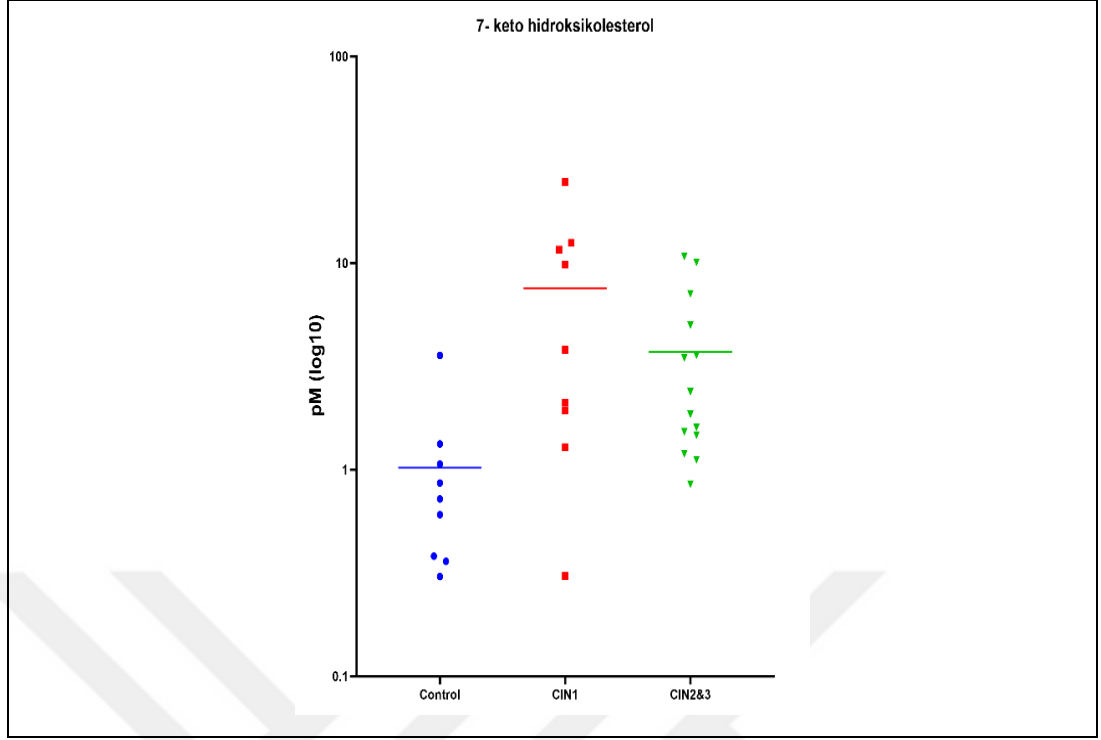
Örneklerin içerdiği toplam protein ve toplam kolesterol bakımından gruplar arası değerlerde istatistiksel olarak güçlü bir anlamlılık bulunmamıştır, değerler arası varyasyon 8-20 kat civarındadır. Hedeflenen oksisterollerin ölçüm sonucu grafikleri Şekil 17’de gösterilmiştir: $7\alpha,27$ -diOHC'nin CIN2&3 grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p: 0.02$) arttığı bulunmuştur. Şekil panelindeki diğer hedef

oksisteroller, bu kohorttaki gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde dağılmadıklarını gösterirken, çalışma gruplarının ortalaması yalnızca 27-OHC için CIN2&3 grubuna doğru azaldığı görülmüştür fakat bu, literatür bilgisi göz önüne alındığında, beklentinin aksine bir sonuçtur (198–200).



Şekil 17. Oksisterol miktarlarının gruplara göre dağılımı

Oksisterollerin LC-MS/MS yöntemiyle yapılan ölçümlerinin çalışmadaki klinik gruplara göre kantitatif dağılımı verilmiştir. Ölçüm değerlerinin y-ekseni ölçeklemesinde 10 tabanında logaritması alınmıştır. (GraphPad yazılımı ile oluşturulmuştur.)

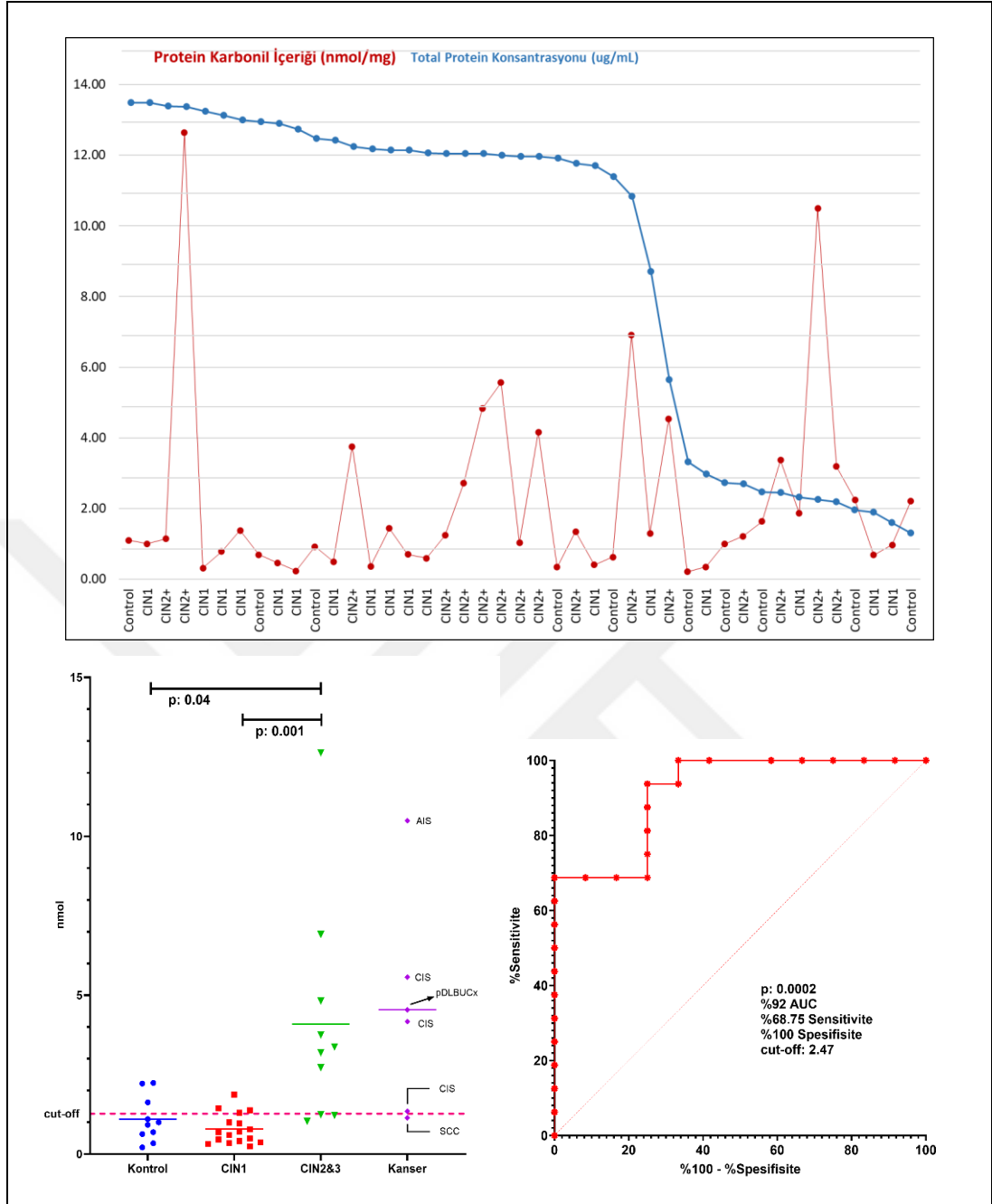


Şekil 17. Oksisterol miktarlarının gruplara göre dağılımı (devam)

Oksisterollerin LC-MS/MS yöntemiyle yapılan ölçümlerinin çalışmadaki klinik gruplara göre kantitatif dağılımı verilmiştir. Ölçüm değerlerinin y-ekseni ölçeklemesinde 10 tabanında logaritması alınmıştır. (GraphPad yazılımı ile oluşturulmuştur.)

4.5 Servikovajinal Sıvıdaki Protein Oksidasyonunun Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Örneklerdeki Farklılıklarının Araştırılması

Protein karbonil ölçümü ELISA testi ile 43 örnekte yapılmıştır. Şekil 19’da da görüldüğü üzere, Kontrol ve CIN1 gruplarına kıyasla CIN2&3 grubundaki SVS örneklerindeki total protein karbonilasyonunun oldukça yüksek olduğuna dair literatürdeki ilk örnek sağlanmıştır.



Şekil 18. Protein karbonil ölçüm sonuçları

Üstteki: Ölçüm yapılan örneklerin total protein konsantrasyonu değerleri (mavi) büyükten küçüğe doğru sıralanmış vaziyette, karşılık gelen protein karbonil değerleriyle (kırmızı) beraber. Örneklerin total protein konsantrasyonu ile karbonil içeriği arasında bir korelasyon bulunmadığı ($r: -0.065$) görülmektedir. (Microsoft Excel ile oluşturulmuştur.)

Alt-sağ: Örneklerdeki protein karbonil miktarları için kutu grafiği; kanser grubunda örneklerin histopatolojik tanılarıyla beraber.

Alt-sol: Kontrol ve CIN2+ grubundaki örneklerle protein karbonil miktarları için çizilen ROC eğrisi grafiği. (Her ikisi de GraphPad yazılımı ile oluşturulmuştur.)

Kutu grafiklerinde CIN2&3 örneklerinin CIN1 ve Kontrol örneklerine kıyasla büyük ölçüde daha yüksek protein karbonil miktarına sahip olduğu, bununla beraber

SCC örneklerinde SCC ile CIN3 arasında kalan histopatolojik evre olan CIS örneklerinin altında kalan değerlere sahip olduğu görülmektedir. Genel ve total protein karbonilasyon ELISA ölçümü yalnızca karbonil miktarını ölçmektedir, karbonillenme miktarı çok yüksek olan yalnızca bir grup protein veya hatta örneğe kontamine olmuş serum proteini bile olabilir, bu sebeple redoks proteomiği yaklaşımına başvurulmuş ve karbonil modifikasyonları ile beraber örneklerdeki proteinler tanımlanmıştır. Sonuçlar Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 7. Normalize edilmiş total spektra verisine göre: Karbonil modifikasyonlarına göre, belirlenmiş aminoasit rezidülerinden karbonillenmiş olan proteinlerin listesi

Karbonillenen Aminoasit	Kanser ve Kontrol Gruplarında Peptid Sayısı Bakımından İstatistiksel Olarak Farklı Tanımlanmış Proteinler	Kantitatif Profil
Proline	Histone H1.5	Kanserde azalmış
	Histone-lysine N-methyltransferase SETD5	Kanserde azalmış
	Protein CDV3 homolog	Kanserde azalmış
	Splicing factor 3A subunit 1	Kanserde azalmış
	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	Kanserde artmış
	Lysine-specific demethylase 6B	Kanserde azalmış
	Collagen alpha-1(II) chain	Kanserde azalmış
	Ankyrin repeat domain-containing protein 36C	Kanserde azalmış
	Transcription elongation regulator 1	Kanserde azalmış
	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C	Kanserde artmış
	Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor	Kanserde artmış
	Collagen alpha-3(V) chain	Kanserde azalmış
	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3	Kanserde artmış
	Forkhead box protein O4	Kanserde artmış
	Pleckstrin homology domain-containing family G member 2	Kanserde artmış
	Synapsin-1	Kanserde artmış
	Reticulon-4	Kanserde artmış
	UBX domain-containing protein 11	Kanserde artmış
	Putative uncharacterized protein FLJ45275, mitochondrial	Kanserde artmış
	Düşük-density lipoprotein receptor-related protein 3	Kanserde artmış
	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9	Kanserde artmış
	Fibronectin type III domain-containing protein 4	Kanserde artmış
	Collagen alpha-1(XV) chain	Kanserde artmış
	Collagen alpha-2(IV) chain	Kanserde artmış
	Rho guanine nucleotide exchange factor 17	Kanserde azalmış
	Collagen alpha-1(IX) chain	Kanserde azalmış
	Complement C1q and tumor necrosis factor-related protein 9A	Kanserde azalmış
	Atherin	Kanserde azalmış
	Glutamate receptor ionotropic, kainate 4	Kanserde artmış
	Myocardin-related transcription factor A	Kanserde azalmış
Lysine	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	Kanserde artmış
	Complement C1q and tumor necrosis factor-related protein 9A	Kanserde artmış

Tablo 7. Normalize edilmiş total spektra verisine göre: Karbonil modifikasyonlarına göre, belirlenmiş aminoasit rezidülerinden karbonillenmiş olan proteinlerin listesi (devam)

Karbonillenen Aminoasit	Kanser ve Kontrol Gruplarında Peptid Sayısı Bakımından İstatistiksel Olarak Farklı Tanımlanmış Proteinler	Kantitatif Profil
Threonine	Collagen alpha-1(IV) chain	Kanserde azalmış
	Mucin-6	Kanserde azalmış
	Albumin	Kanserde artmış
	Transcription elongation regulator 1	Kanserde azalmış
	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	Kanserde artmış
	Nuclear receptor-binding factor 2	Kanserde azalmış
	Ankyrin repeat domain-containing protein 36C	Kanserde azalmış
	Pleckstrin homology domain-containing family G member 2	Kanserde artmış
	Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor	Kanserde artmış
	Growth factor receptor-bound protein 7	Kanserde artmış
	Zinc finger protein 624	Kanserde artmış
	Düşük-density lipoprotein receptor-related protein 3	Kanserde artmış
	YTH domain-containing family protein 3	Kanserde artmış
	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 3	Kanserde azalmış
Arginine	Cluster of E1A-binding protein p400	Kanserde azalmış
	E1A-binding protein p400	Kanserde azalmış
	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C	Kanserde artmış
	Fibronectin type III domain-containing protein 4	Kanserde artmış
	Histone-lysine N-methyltransferase SETD5	Kanserde azalmış

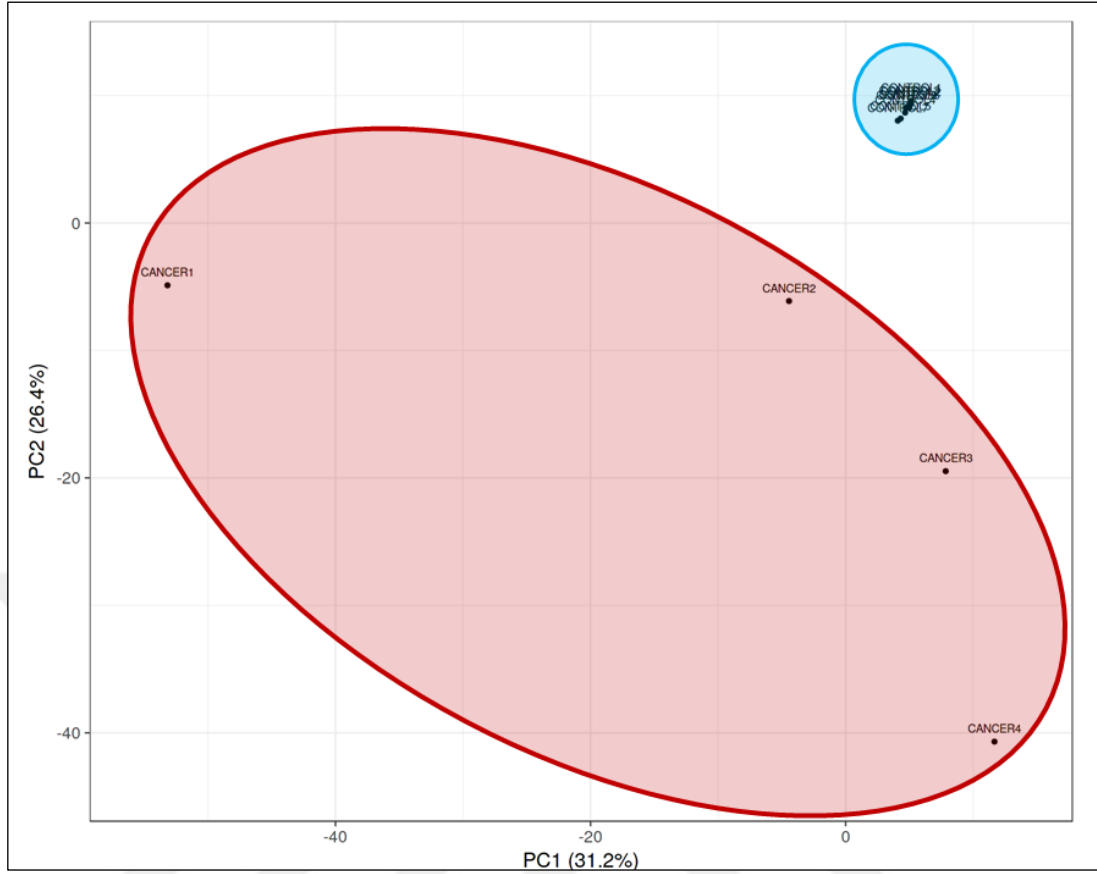
Sırasıyla prolin, lizin, treonin ve arjinin. (Scaffold yazılımından elde edilmiştir.) Artış/azalış durumu, karbonillenmiş aminoasit içeren peptid sayıları arasındaki farka göre belirlenmiştir.

Karbonil modifikasyonunun yanı sıra, modifikasyonlardan bağımsız olarak, kontrol ve kanser grubunda genel toplamda en yüksek bağıl bollukla bulunan ilk on protein de Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 8. Gruplara göre örneklerde en yüksek bağıl bollukla tanımlanmış ilk on protein

kontrol örneklerinde en fazla bulunan 10 protein	kanser örneklerinde en fazla bulunan 10 protein
Cornulin	Albumin
Serine protease inhibitor Kazal-type 5	Serotransferrin
Albumin	Lactotransferrin
Annexin A1	Complement C3
Immunoglobulin heavy constant gamma 1	Fibrinogen alpha chain
Immunoglobulin heavy constant gamma 3	Immunoglobulin heavy constant gamma 1
Cluster of Immunoglobulin kappa constant	Fibronectin
Immunoglobulin kappa constant	Cluster of Actin, cytoplasmic 1
Filaggrin	Immunoglobulin heavy constant gamma 3
Suprabasin	Fibrinogen beta chain

Scaffold verileri, Microsoft Excel ile oluşturuldu.



Şekil 19. PCA grafiği

Proteomik analizle 12 enjeksiyonda (6 örnek, duplike) tanımlanan ve iki grup arasında farklı ekspresyon seviyesiyle istatistiksel olarak anlamlı tüm proteinlerin verilerinden oluşturulan PCA görseli. (ClustVis ile oluşturulmuştur.)

Tablo 9. Total unique peptit sayısı verilerine göre: Modifikasyonlardan ve kantitatif karşılaştırmadan bağımsız olarak, normalize total spektraya göre kontrol grubunda ve kanser grubunda en yüksek miktarda tanımlanmış ilk 10 proteinin listesi

Kontrol grubunda en çok skor ile tanımlanmış ilk 10 protein			
Treonin	Arjinin	Lizin	Prolin
Cornulin	Titin	Protein capicua homolog	Alpha-taxilin
Nuclear receptor coactivator 6	NHS-like protein 1	Microtubule-associated protein 4	Atherin
Ly6/PLAUR domain-containing protein 3	Solute carrier family 12 member 2	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L	Putative Polycomb group protein ASXL2
Putative Polycomb group protein ASXL2	Protein bassoon	Putative Polycomb group protein ASXL2	Scavenger receptor class F member 1
NHS-like protein 1	Mucin-5B	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	PDZ domain-containing protein 2
Helicase SRCAP	Cluster of E1A-binding protein p400	NHS-like protein 1	Nucleoporin NUP35

Tablo 9. Total unique peptit sayısı verilerine göre: Modifikasyonlardan ve kantitatif karşılaştırmadan bağımsız olarak, normalize total spektraya göre kontrol grubunda ve kanser grubunda en yüksek miktarda tanımlanmış ilk 10 proteinin listesi (devam)

Kontrol grubunda en çok skor ile tanımlanmış ilk 10 protein			
Treonin	Arjinin	Lizin	Prolin
Transducin-like enhancer protein 1	E1A-binding protein p400	Tight junction protein ZO-1	Fibroblast growth factor 21
Misshapen-like kinase 1	Mucin-19	Misshapen-like kinase 1	Agrin
Transcription elongation regulator 1	Protein SAAL1	Proteoglycan 4	Myelin regulatory factor
Ankyrin repeat domain-containing protein 36C	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L	Protein bassoon	Immunoglobulin superfamily DCC subclass member 3
Immunoglobulin heavy constant gamma 3	Ataxin-2	Complement C1q and tumor necrosis factor-related protein 9A	Nucleoporin NUP35
Syndecan-3	Kazal-type serine protease inhibitor domain-containing protein 1	Ataxin-2	Alpha-taxilin
REST corepressor 3	Nck-associated protein 5-like	Target of Nesh-SH3	Probable ribonuclease ZC3H12D
Cluster of Immunoglobulin heavy constant alpha 1	Titin	Synapsin-3	Ras guanyl-releasing protein 3
Immunoglobulin heavy constant alpha 1	Zinc finger protein 366	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	Cyclin-K
Immunoglobulin heavy constant gamma 4	pre-mRNA 3' end processing protein WDR33	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX10	Glutamate receptor ionotropic, kainate 4
UPF0606 protein KIAA1549L	Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 3	Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 3	PDZ domain-containing protein 2
Zinc finger CCCH domain-containing protein 4	Proline-rich protein 36	DENN domain-containing protein 2B	Fibroblast growth factor 21
Protein SPT2 homolog	Neurofilament light polypeptide	Protein PRRC2C	Armadillo-like helical domain-containing protein 4
Striatin-4	Leucine zipper putative tumor suppressor 2	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13-like	Microtubule-associated protein 1B

Scaffold verisidir, Microsoft excel ile oluşturulmuştur.

5 TARTIŞMA

5.1 Servikovajinal Sıvıdaki Potansiyel Protein Biyobelirteçlerin ELISA Testi ile Miktar Tayini

Bu çalışmada ölçüm hedefi olan proteinler ACTN4, ANXA2, SCCA1 ve SCCA2, dişi ürogenital dokuları da dahil olmak üzere pek çok dokuda doğal olarak protein düzeyinde anlatımı mevcuttur (201), özellikle hücre iskelet proteini olan ACTN4 proteini dokularda doğal olarak bol bulunan bir hücre iskelet proteindir. Literatürde pekçok yayında bu proteinlerin çeşitli kanser türleriyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir (202–205), bu proteinlerin karsinogenezde hücre sel sinyalleşme, invazyon ve migrasyon mekanizmalarında rol oynadıklarına dair *in vitro* bulgular mevcuttur. Özellikle ACTN4 ile ilgili olarak, bu proteinin β -katenin aracılı hücre proliferasyonunda kanser kök hücrelerinin yeniden düzenlenmesi ve hücrelerde kemoterapi direncinde payı olabileceği gösterilmiştir (206–208). ACTN4'ün aşırı anlatımı, birçok kanser türü için çok tanıdık bir bulgudur; literatürde (202,209) meme, beyin, baş ve boyun, akciğer, mesane, prostat, pankreas ve yumurtalık kanseri dahil olmak üzere çok sayıda araştırmada ACTN4 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını bildirmiştir.

Daha önce servikal kanser için yapılan iki çalışmada ACTN4'ün ölçümlerinde matematiksel olarak sağlıklı bireylerden servikal prekanserli bireylere doğru anlamlı bir artışta (106,107) olduğu belirtilmişse de, bu çalışmada bu şekilde bulgular elde edilmemiştir. Aynı zamanda, ACTN4 hücre dışında bulunan veya hücre dışına salgılanan bir protein değildir, bu nedenle servikovajinal sekresyon materyali, ACTN4 proteininin gerçek ekspresyon seviyesinin güvenilir bir göstergesi olmayabilir. Bu temelde, SVS örnek materyalinden yapılacak bir uygulama için, bir proteinin servikal kanser gelişiminin biyobelirteci olabilmesi için, hasta gruplarında prognozla beraber son derece tutarlı bir biçimde artış motifine sahip olması ve şiddetli neoplazide kontrol grubuna kıyasla objektif ve istikrarlı bir şekilde yükselmiş olması; yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuç riskinin düşük olması yani hassas ve özgül bir belirteç olması gerekmektedir (139,210,211).

Bireylerden örnek toplama yöntemindeki farklılıklar, örneklerin klinik kategorizasyonu ve dahil etme / dışlama kriterleri, örneklerin deneysel hazırlanma yöntemi ve analiz yöntemleri, kullanılan cihazların çalışma prensibi gibi çalışmanın tasarımına dair farklılıklar, aynı amaca sahip çalışmalar arasında farklı sonuçlar elde edilmesine sebep olabilir. Örneğin, bir çalışma idrar yolu enfeksiyonuna sahip bireyleri dışlarken diğerinin dahil etmesi yahut bir çalışmada SVS örnekleri yüksek devirde santrifüj edilip yalnızca süpernatant kullanılırken diğerinde elde edilen sıvının tamamının kullanılması veya bir çalışmada MALDI-TOF/TOF kullanılırken diğerinde Orbitrap MS/MS kullanılması hedefsiz/keşif çalışmalarının sonuçları arasında farklılık yaratabilir ve varyasyona neden olabilen bu örnekler onlarcasıyla çoğaltılabilir. Omiks çalışmalar için bu durum bir handikaptır zira bu ölçüm yöntemleri çok hassas olup küçük farklılıkların sebep olduğu varyasyonları algılayabilir ve bu da sonuçların farklı olmasına yol açar. Cihazlar arasında evrensel bir standardizasyon olmadığı gibi, bazı sistemlerde aynı cihazın farklı kullanımları arasında da standardizasyon bulunmamaktadır. Bu handikapların üstesinden gelebilmek için literatürde önerilmiş birtakım uygulamalar mevcuttur, fakat bunlar ya yetersizdir yahut çok zahmetlidir (212,213). Bu açıdan, tez kapsamında yapılan bu çalışma ile literatürde daha önceden yapılmış iki çalışma arasında farklı sonuçlar bulunmuş olmasının pek çok sebebi olabilir. Örneğin, biyolojik materyal tipi temelde aynı olmakla beraber hastalardan alım şekli farklıdır; hasta örneklerinin dahil edilme/dışlanma kriterleri farklılıklar içerebilir; örneklerin ELISA testinde kullanılması için dilüsyon oranları muhtemelen farklıdır zira makalelerde bunlara dair açıklama bulunmamaktadır; total protein konsantrasyonu ile normalizasyon konusunda ise yine önceki çalışmalarda herhangi bir uygulama yapılıp yapılmadığına dair yayınlarında bir ibare bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu farklılıklar da sonuçları etkilemiş olabilmektedir. Ölçülen proteinlerin gerçekten de birer klinik biyobelirteç olup olamayacağını söylemek kolay değildir, fakat en azından bu tez çalışması kapsamında yapılan çalışma dahilinde bu proteinlerin klinik tanıda kullanılamayacak olduğu yorumlanabilmektedir.

Bu çalışmanın en güçlü yönleri 1-) literatürde benzer olarak yapılmış diğer çalışmalara kıyasla (10-15 kat fazla olmak üzere), örneklem büyüklüğü; 2-)

kolposkopik biyopsi hastalarından alınmış örnekler olduğu için, grupların sitolojik değil de histopatolojik tanılara göre kategorize edilmiş olması. Zira, bir tarama testi olan ve sitoloji sonucu veren Pap-smear test sonuçlarına göre dizayn edilmiş bir çalışmada, testin hem yanlış-negatif hem de yanlış-pozitif sonuç verme riski çok yüksek olduğu için katerogizasyonun hatalı olma olasılığı çok yüksektir. Hatta, ne yazık ki, bir tanı yöntemi olan kolposkopik biyopsi sonuçları dahi yeterli doğruluğa sahip değildir; ~%40 oranında yanlış sonuç verme olasılığı mevcuttur, ki bu da araştırmacının çalışma gruplarını yanlış sınıflandırılmış olmasına sebebiyet verecektir. Altın standart olarak kabul edilen LEEP ile konfirme edilmiş tanılara göre inşa edilen çalışmalarda hastaların tanıları dolayısıyla da çalışmadaki klinik grupların kategorizasyonu doğru yapılmış olacağı için böyle bir problem olmayacaktır, ancak bu cerrahi tedavi prosedürünün toplumda uygulanma sıklığı doğal olarak bir tarama/tanı yönteminin uygulanma sıklığında değildir. Birincil tarama testleri olan HPV genotiplemeye göre Hr-HPV-pozitif olup Pap-smear sonucunda da $\geq$ ASC-US olan hastalar kolposkopik biyopsiye alımları ve bunların ortalama %75'ine CIN teşhisi konmaktadır. Histopatoloji raporu $\geq$ CIN2 olan bireylere malignite mevcut olan dokunun çıkarılması için LEEP prosedürü uygulanmaktadır. Türkiye'de Pap-semar katılımcılarına kolposkopik biyopsi uygulanma sıklığı en güncel verilere göre %3.8'dir ve bunun yarısından daha az bir kısmına LEEP uygulanmaktadır. Dolayısıyla, LEEP ile konfirme edilmiş örneklerle çalışmak için çok uzun bir süre boyunca örnek toplanması gerekecektir. Bu bağlamda, tanıda kabul edilir düzeyde hassasiyet ve özgüllük skorlarına sahip olan altın standartla elde edilmiş tanılara erişim sorunu klinik servikal prekanser çalışmalarının ortak bir handikapıdır ve örneklem klasifikasyonunu olumsuz yönde etkilediği için geliştirilebilecek potansiyel testler için yapılan çalışmaların sonuçlarını baltalamaktadır.

Mevcut çalışma, hedef proteinlerin istatistiksel anlamlılığının gerçek doğruluğunu ortaya çıkarmayı amaçlamıştır. Sonuçlarda da görüldüğü üzere, bu proteinler rutin kliniğe bir test geliştirmek için kullanılamayacaktır. Bu şekilde, potansiyel biyobelirteçlerin klinik gücünü değerlendirmek için randomize ve geniş bir örneklemde, gerekli normalizasyonları uygulayarak kantitatif pre-validasyon yapmanın önemi vurgulanmaktadır. Bir biyobelirteç, kansere giden yolda, tedaviye

yanıt alma olasılığı çok yüksek olan kanser öncesi aşamayı yakalamalı, aşırı-test (overtesting) ve aşırı-tedaviyi (overtreatment) azaltmaya, gerçek hastaları (number needed-to-treat) bulmaya yardımcı olmalıdır (214).

5.2 Servikovajinal Sıvıdaki Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Örneklerdeki Proteom Farklılıklarının Proteomik Yöntemler ile Araştırılması

Bu çalışma, literatürde özellikle 2007 yılından bu yana servikovajinal proteomu indekslemek için farklı merkezlerde farklı cihazlarla yapılan çalışmalara bir katkı sağlamak amacıyla ve displastik olmayan ile farklı displazi evrelerinde olan bireylerin SVS proteom farklılıklarını incelemek amacıyla yapılmıştır.

Tablo 4’te görüldüğü üzere, Lactotransferrin proteini her iki grupta da major proteinlerdendir, bu da çalışmanın doğruluğunu destekleyici bir bulgudur, zira bu protein her SVS örneğinde diğer proteinlere kıyasla bolca bulunmalıdır. Bunun haricinde serum transferrin proteini her iki grupta da hemen hemen aynı düzeyde kan kontaminasyonuna işaret ederken, Mucin-5B proteini mukus yapısına katılan proteinlerdendir ve SVS materyali iç genital dokuyu oluşturan tüm salgılama yapan hücrelerin salgılarının bir bileşimi olduğu için, musin proteinleri yüksek düzeylerde bulunabilir (90). Fakat bununla beraber, kanserleşme veya diğer birtakım patolojik durumlarda SVS kompozisyonunun değiştiği bilinmektedir ve buradaki MUC5B proteinin anlatımının artışı buna işaret ediyor olabilir (215,216). IgGfC-binding protein, Protein S100-A8 ve Protein S100-A9 gibi proteinler enflamatuvar süreçler ve immün yanıtı işaret eder ve bu proteinlerin de SVS’nin proteomunda fazlaca yer alıyor olması da beklenen bir sonuç olmakla birlikte, bu proteinlerin miktarca aşırı artışı da kanserleşme, bakteri veya fungal enfeksiyon, fiziksel zorlama/hasar veya çoklu/zor doğum gibi süreçlerin sebep olduğu yükselmiş enflamasyon yanıtı işaret ediyor olabilir (39). Yapılan çalışmada istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuş olup gruplar üzerindeki kantitatif dağılımı da tutarlı (sağlıklı → düşük şiddetli neoplazi → yüksek şiddetli neoplazi) olan CALM3, PROF1 ve ANXA3 proteinlerinin grupları ayırt edici olduğu belirlenmiştir. Bu proteinler daha önceki SVS proteomik çalışmalarında da tanımlanmıştır (86,87). Şekil 12’de ANXA3 ve

PROF1 proteinleri displaziyle beraber artıştıkça, CALM3 (veya CALL3) proteininin ise displaziyle beraber azalışta olduğu gözlenmektedir. CALM3 proteinini kalsiyum iyon bağlayıcı ve katalitik aktivite düzenleyici rolleri bulunur, hücre dışı eksozomda bulunur ve çeşitli kanser örneklerinde ekspresyonunun düştüğü bulunmuştur (217,218). Grafiklerde ANXA3 ve PROF1 proteinlerinin anlatımı hastalık seyrinin şiddetiyle artmakta; CALM3 proteinin anlatımı ise azalmaktadır, bir diğer deyişle, neoplastik hücreler arttıkça ANXA3 ve PROF1 proteinlerini daha çok ekprese ederken CALM3 proteinin ekspresyonunu azaltmaktadır. Dolayısıyla ANXA3 ve PROF1 progresyon belirteçleri olarak, CALM3 ise regresyon belirteci olarak kabul edilebilir. Şekil 14'teki PCA grafiğinde bu üç proteinin grupları birbirinden ayırdığı görülmektedir. Dendrogramda ise, tanımlanan tüm proteinler ile, proteom ekspresyon profilleri arasındaki benzerliği ile bir araya gelen örnekler arasında kontrol – CIN2&3 ayrımı yeterince net olmayıp, bu iki zıt grup arasında birtakım benzerlikler ve ortaklıklar mevcuttur. Bu noktada, eğer bu proteinleri olası biyobelirteçler olarak değerlendirirsek, hasta grubundaki örneklerde iyileşmeye işaret eden, CIN1 grubunda ise progresyona işaret eden sinyaller olarak değerlendirebiliriz. Dolayısıyla da Kontrol grubu örneklerinden progresyona uğrayabilecek veya CIN2&3 örneklerinden regresyona gidecek örnekler olabileceği yorumu yapılması mümkündür. Sonuç olarak, bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı bulunan proteinlerin ayırım gücü yüksek olmadığından dolayı bu proteinlerle ileri testlere gidilerek örneklerde bir immünolojik yöntem ile proteinler kantite edilmemiştir. Daha güvenilir bilgi elde etmek ve potansiyel protein biyobelirteçleri saptayabilmek için daha yüksek örneklem sayısı ile daha yüksek rezolüsyonlu bir proteomik sisteminde hedefli ölçüm yaklaşımlarıyla ve klinik kategorizasyonun daha güvenilir olması için hastalara ait LEEP bilgisi bulunan (LEEP uygulamasına başlanmadan hemen önce alınmış olan) örnekler ile analiz yapılması gerekmektedir.

5.3 Servikovajinal Sıvıdaki Organik Asitlerin Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Örneklerdeki Miktar Farklılıklarının Araştırılması

Literatürde yalnızca erken doğum markırları üzerine yapılan SVS metabolomik çalışmaları mevcut olmakla beraber; servikovajinal alandaki organik asit içeriği

yalnızca laktat, asetat, sialik asit, glutamat gibi birkaç belli başlı spesifik organik asitlerin miktarını tekil olarak ölçmek haricinde detaylı olarak araştırılmamıştır. Yalnızca bir çalışmada (219), erken doğum riskinin araştırılması amacıyla Agilent 1260 HPLC & MS sistemi kullanılarak 46 gebe bireyden alınan amniyotik sıvı ve SVS örneklerinde organik asit analizi yapılmıştır. Nihai sonuçlarda, N-Asetil-Aspartat konsantrasyonunun spontan erken doğum geçiren hasta grubunda daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Literatür, bu tip bir çalışma konusu için oldukça fakirdir. Dolayısıyla bu küçük çaplı pilot çalışma, SVS organik asitleri araştırması için literatürdeki ilk emsaller arasındadır.

GC-MS kullanılarak yapılan bu çalışmada tanımlanan organik asit bileşenleri ve bu bileşenlerin rol oynadığı hücresel yollar Tablo 5'te verilmiştir. Bu bileşenler servikovajinal alandaki hücrelere ait veya alandaki mikrobiyomu oluşturan tek hücreli ökaryotik ve prokaryotik organizmalara da ait olabilir.

Servikovajinal alandaki floral bozulmaya işaret eden düşük Laktat seviyesi gözlenen örnekler (A26, A30, A44, A38, A40 ve A53) inceleyecek olursak, A30 numaralı örneğin alındığı bireyde ise o tarihte herhangi bir patolojik bulgu görünmemekte olup birey çizelgede sağlıklı olarak kaydedilmiştir. A26 numaralı örneğin alındığı bireyin Pap-smear raporunda "reaktif hücresel değişiklikler" notu bulunmakta ve birey oral kontraseptif kullanmaktadır. A44 ve A53 kodlu bireylerin ASC-H Pap-smear raporu mevcuttur. CIS tanısı olan A38 kodlu bireyde aynı zamanda enfeksiyon şüphesi uyandıran vajinal akıntı mevcudiyeti, A40 kodlu bireyde ise yoğun vajinit ve lökore (koyu beyaz vajinal akıntı) varlığının not edildiği görülmektedir. A40 kodlu bireye ait örnekte oksalat ve süksinat hariç diğer dört bileşenin de düşük olması, servikovajinal alanda mikrobiyom kompozisyonunun değişmiş, aerobik-anaerobik organizma dengesinin değişmiş, ve enerji metabolizmasının hızlanmış olduğuna işaret etmektedir ki nitekim, lökore varlığı da bunu desteklemektedir. Ek bir bilgi olarak, A26, A50, A53 ve A55 kodlu bireylere daha önce LEEP prosedürü uygulandığı (LEEP uygulaması üzerinden belli bir süre geçtikten sonra nüks sebebiyle tekrar kolposkopiye alınmış) bilinmektedir. Bu cerrahi operasyon sonrasında, LEEP prosedürü geçiren bireyler geçirmemiş

bireylerden farklı bir servikal dokuya sahip olduğu için, bölgedeki moleküler biyolojik yapının da daha farklı olması beklenir (220).

5.4 Servikovajinal Sıvıdaki Belirli Oksisterollerin Sağlıklı ve Hasta Bireylere Ait Örneklerdeki Miktar Farklılıklarının Araştırılması

Litaretürde oksisterollerin farklı kanser türleri için serum, plazma veya tümörlü doku gibi hasta numunelerinde sağlıklı duruma kıyasla artmış bulunabileceği gösterilmiştir (221–223). Bilhassa, literatürde meme kanserine yönelik serum örneklerinden oksisterol ölçüm çalışmaları mevcuttur (198,199,221,224). Fakat literatürde erken doğum üzerine yapılan SVS örnekleri ile lipidom analizi çalışmaları bulunmakla beraber, preinvazif servikal kanser aşamalarında olan hastalardan alınan örneklerde oksisterollerin araştırıldığı bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

İlk örneği temsil eden bu küçük pilot çalışmada, enzimatik olarak üretilen 7 α ,27-diOHC, 27-OHC ve 26-OHC ve otooksidasyon ile üretilen 7 β -OHC ve enzimatik veya otoksidasyon yoluyla üretilen 7-KC olmak üzere SVS örneklerinde toplamda 5 oksisterolün miktarı incelenmiştir. Sonuçlara göre, 7 α ,27-diOHC oksisterolü ilerleyen CIN aşamalarında belli bir düzeyde arttığını, diğer diğer 4 oksisterolün ise beklentinin aksine uyumlu bir şekilde dağılmadığını gösterdi.

Bu sonuçlarla ilgili olarak, SVS materyalinin, hücre içinde doğal olarak düşük miktarlarda bulunan bu tür biyomolekülleri araştırmak için fazlaca seyreltilmiş bir vücut sıvısı olabilir. Bu bağlamda, servikovajinal alandaki oksisterollerin iyi anlaşılması için SVS materyalinin daha yüksek hacimlerde (5-10 mL) kullanılarak lipid ekstraksiyonu yapılması veya bu moleküller hücre dışına salgılanmadığı için, lavaj aspirasyonu yerine hücresel kazıma materyali kullanılması faydalı olabilir. Zira oksisterollerin bolluğunun büyük olasılıkla neoplastik dönüşüm sırasında artıyor olması beklenmektedir (177,178,225), çünkü HPV enfeksiyonu ve malign transformasyonun neden olduğu yüksek oksidatif stres koşullarında kolesterolün hidroksilasyonu neredeyse kaçınılmazdır (175). Oksidatif stres, servikal malignitelerin prognozu ve invazif kanserin tedaviye yanıtı arasında henüz iyi

anlaşılmamış bir ilişki olduğu göz önüne alındığında, oksidatif stresin klinik öneminin, progresyondaki kanserojenik katkılarının ve antioksidan terapötiklerin klinik kullanımının fizibilitesini değerlendirmek için daha fazla araştırma yapılması gereklidir.

5.5 Servikovajinal Sıvıdaki Protein Oksidasyonunun Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Örneklerdeki Farklılıklarının Araştırılması

Protein karbonilasyonu, DNP molekülünün protein karbonil gruplarıyla çok özgül bir bağ kurması sayesinde bugün kolay ve göreceli olarak ekonomik bir immünolojik yöntemle ölçülebilmektedir. Fakat bu ölçüm genel bir ölçümdür ve yalnızca bir grup proteinin karbonilasyonu fazla olduğu için bir miktar yanıltıcı olabilmektedir. Örneğin, tez kapsamında yapılan çalışmada kanserli grupta bulunan çok yüksek karbonil miktarının albuminden kaynaklı olduğu görülmüştür. Zira kanserli hastaların serum protein karbonil değerlerinin yüksek olduğu literatürde daha önce gösterilmiştir. Kılcal damarlanma yapısı fazlalaşmış ve sağlıklı dokuya kıyasla ekstraselüler matriksi tahrip olmaya daha meyilli olan kanserli dokudan alınan SVS örneğinde kan kontaminasyonu dolayısıyla albumin varlığı beklenen bir sonuçtur. Bu sebeple, redoks proteomiği son derece önem taşımaktadır. Karbonillenen proteinlerin karbonillendikleri aminoasitler ve bunları içeren peptid sayılarıyla beraber tanımlamak, yani hangi proteinlerin ne düzeyde oksidatif strese maruz kaldığını ortaya çıkarmak literatürü zenginleştirecektir.

Yapılan çalışmadaki sonuçlar ayrı ayrı iki yönlü değerlendirilmelidir: 1.) Tanımlanan karbonillenmiş proteinlerin ekspresyon seviyesi 2.) Karbonillenmiş proteinlerin karbonile halde aminoasit içeren peptid sayıları. Dolayısıyla, bu çalışmada elde edilen veriler, "Normalize Edilmiş Total Spektra" faktörü ile gruplar arası protein ekspresyon farklılıkları ayrı, "Total Unique Peptit Sayısı" faktörü ile gruplar arasında proteinlerin karbonillenmiş aminoasit içeren peptid miktarları ayrı olmak üzere incelenmiştir. Tablo 6'da normalize edilmiş total spektra verileriyle, farklı aminoasitlerde tespit edilen karbonilasyon modifikasyonuna göre hangi proteinler kanserde kontrole göre nasıl değiştiği gösterilmiştir. Bir diğer deyişle, en

az bir peptidinde en az bir adet prolin aminoasit rezidüsünden karbonillendiği tespit edilen bir proteinin ekspresyon seviyesi, kanser örneklerinde artmış hale mi yoksa azalmış halde midir, bunlar listelenmiştir. Modifikasyonlar olmaksızın, örneklerin en az birinde en az bir peptit ile tanımlanmış tüm proteinler Tablo 7’de; kontrol-kanser grupları arasında istatistiksel olarak anlamı ($p<0.05$) olanlar ile oluşturulan PCA görseli ise Şekil 20’de verilmiştir.

PCA grafiğinde kontrol örneklerinin üst üste gelerek sıkı bir şekilde kümelenirken, kanser örnekleri kontrol örneklerinden uzak olmakla beraber birbirlerine de uzak şekilde dağıldığı görülmektedir. Bu durum, biyolojiyle örtüşen bir sonuçtur zira kanserli örneklerin proteomu birbirleri arasında da farklılığa sahipken, bir diğer deyişle, kanser kendi içinde de varyasyon gösterirken (226); sağlıklı servikovajinal alandan toplanan örneklerin proteomunun daha konservatif bir proteom olması beklenmektedir.

Karbonillenen aminoasit rezidüsüne göre, her bir grupta en fazla karbonillenen proteinlerin sırası total unique peptit sayısı verilerine göre Tablo 8’de verilmiştir. Kontrol grubunda genellikle ekstraselüler matriks yapısına katılan proteinlerin; kanser grubunda ise daha ziyade immün sistemle ilişkili proteinlerin, hücrelerarası traslokasyon proteinlerinin karbonile aminoasit içeren proteinler olduğu görülmektedir.

Bu sonuçlara bakılarak, kanserleşme esnasında bir nevi hücredeki işleyişi bozabilmek ve kaotik bir ortam yaratabilmek için hücreler protein karbonilasyonunu büyük oranda artırırken, kanserleşme gerçekleşikten sonra karbonilasyon azalmakta ve özellikle de kanserli hücrelerin ihtiyaç duyacağı proteinlerin karbonilasyonunu azaltmakta olduğuna dair çıkarım yapılabilir.

5.6 Limitasyonlar

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların ortak limitasyonuna SVS örnek materyali gösterilebilir. Daha önceki başlıklarda da yer yer bahsedildiği gibi, SVS

materyali iyi tanımlanmış, stabil, içerik kompozisyonu tamamen belirlenmiş bir vücut sıvısı değildir ve bu özellikleri, kalitatif değil de daha ziyade kantitatif yaklaşımlar için çoğu zaman sorun teşkil etmektedir. Yapılan çalışmalarda bu sorunların üstesinden gelmek için total proteini ölçüp bununla normalize etmek gibi çeşitli uygulamalara başvurulmuştur.

Örnek materyalinin muhteviyatından sonra, örnek toplama konusunda da birtakım sınırlamalar mevcuttur. Örnek alınacak bireyler jinekoloji polikliğine gelen genç kadınlar oldukları için zaman zaman endişelenerek çalışmaya katılımı reddetmişlerdir ve dolayısıyla örnek toplama süreci uzamıştır. Üstelik, örneklerin raf ömrünün çok uzun olmamasından dolayı her bir proje için yeni örnekler toplanmıştır ve bu da uzun süreler tanınmadığı için projelerin göreceli olarak düşük sayıda örnek ile gerçekleştirilmesini mecbur kılmıştır.

Yine önceki başlıklarda da değinilen, servikal kanser tarama ve tanısında klinik ayırım gücünün düşük olan testlerin kullanılması, başlı başına bir handikap ve limitasyondur. Zira bu testlerin sonuçları ciddi oranlarda yanıltıcıdır ve çalışmanın dizaynını dolayısıyla sonuçları da etkilemektedir. Çalışma boyunca kolposkopiye takiben LEEP operasyonuna alınan pek çok örnekte görülmüştür ki, altın standart olarak görülen LEEP sonuçları kolposkopi sonuçlarından çok farklı olabilmektedir ve çoğunlukla LEEP operasyonu uygulanmamaktadır. Dolayısıyla bu durum, çalışmalardan elde edilen sonuçların istatistiksel analizinde zorunlu olarak hata yaptırmaktadır.

Tüm bunlara rağmen, servikovajinal alandaki moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasının, HPV ile enfekte olan bireylerin büyük bir çoğunluğu kansere yakalanmazken, çok daha küçük orana sahip bir kısmının invazif kansere kadar ilerlediğinin daha derin bir düzeyde anlaşılmasına her koşulda faydalı olacaktır.

6 SONUÇ

Bu tez kapsamında, displastik olmayan, hafif displazili olan ve şiddetli displazili olan ve bir kısmında da kanser geliştirmiş olan gönüllü bireylerden alınmış SVS lavaj aspirasyon örneklerinde, bu gruplar arasında hem matematiksel olarak anlamlı, hem de biyolojik olarak tutarlı bir seyre sahip olan biyomoleküller araştırılmıştır. Bu yaklaşımla literatüre katkıda bulunmak, yeni bir biyobelirteç ile güncel tarama yöntemlerine tamamlayıcı bir test geliştirmek ve aynı zamanda da "neden HPV-pozitif vakaların çok büyük bir kısmı kansere ilerlemezken küçük bir kısmının kanserleştiği"ni araştırmak amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, literatürde shotgun proteomik analizle tespit edilip aday biyobelirteç olarak gösterilmiş bulunan bazı proteinlerin kantitatif pre-validasyonu, oksidatif strese işaret eden protein karbonilasyonu ve literatürde kanserde miktarının yükseldiği belirtilen bazı oksisterollerin son teknoloji cihazlarla hedeflenmiş kantitatif tayini, protein ve organik asitler için tüm-içerik analizine yönelik keşif araştırmalarına yönelik beş farklı çalışma yapılmıştır.

Yapılan tüm bu çalışmalar bir bütün olarak ele alındığında, SVS materyalinin bir vücut sıvısı olarak sabit bir sıvı olmaması ve hatta örnek alımı dahil olmak üzere varyasyon parametrelerinin çok fazla olması, SVS materyalinin bazı molekül gruplarının ölçümü için fazlaca seyreltik bir örnek materyali olması ile birlikte ele alındığında, yine de bu tip araştırmalarda kullanıma değer bir yaklaşım olduğu çıkarımı yapılmıştır. Zira içerik zenginliği olan ve direkt virüs ile enfekte olup kanserleşen bölgeden salgılanan ve miktar sıkıntısı yaşanmaksızın sürekli salgılanan, kolay erişilebilir ve kolay elde edilebilir bir materyaldir.

Bu tez çalışmasında, çeşitli yöntemler kullanılarak SVS materyalinin klinik kullanımda değerlendirilmesine, kadınların servikal kanser taramasına katılımını arttırmayı amaçlayan kendi kendine uygulamayı mümkün kılacak yahut mevcut eksiklerin giderilmesini amaçlayan patolojik evrelerin belki de yeniden ölçeklendirilmesini önerecek yeni bir yaklaşım bulunabileceğine dikkat çekilmiştir. Dünya genelinde sayısı giderek artmakta olan “kendi kendine örnekleme”

uygulamaları göz önüne alınacak olursa, yakın gelecekte kadınlar servikal kanser riskini hastaneye gitmeye gerek kalmaksızın kendi kendilerine değerlendirebilecekleri kitlelere ulaşabilecekleri öngörülebilmektedir.



7 KAYNAKLAR

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6).
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, ve ark.. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3).
3. Castillo M, Astudillo A, Clavero O, Velasco J, Ibáñez R, Desanjosé S. Poor cervical cancer screening attendance and false negatives. A call for organized screening. *PLoS One.* 2016;11(8).
4. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Cervical cancer is preventable. *Cdc.* 2014;(Kasım).
5. Chabra S. Cervical Cancer Preventable, Treatable, but Continues to Kill Women. *Gynecology & Obstetrics.* 2017;s4.
6. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanseri Daire Başkanlığı. Kanseri Raporları.
7. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(1).
8. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J, ve ark.. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Health.* 2020;8(2):e191–203.
9. Cutts FT, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, De Sanjose S, Garnett G, ve ark.. Human papillomavirus and HPV vaccines: A review. *Bulletin of the World Health Organization.* 2007.
10. de Martel C. Abstract SY34-01: Infection causing cancer: An update on the global burden. *Cancer Res.* 2015;75(15_Supplement).
11. Miller KD, Ortiz AP, Pinheiro PS, Bandi P, Minihan A, Fuchs HE, ve ark.. Cancer statistics for the US Hispanic/Latino population, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(6).
12. Song T, Seong SJ, Lee SK, Kim BR, Ju W, Kim KH, ve ark.. Searching for an ideal cervical cancer screening model to reduce false-negative errors in a country with high prevalence of cervical cancer. *J Obstet Gynaecol (Lahore).* 2020;40(2).
13. Yalcinkaya C. Prevalence of cervical high-risk human papillomavirus and cytological abnormalities in elderly Turkish women. *Marmara Medical Journal.* 2022;35(3).
14. Łaniewski P, Cui H, Roe DJ, Barnes D, Goulder A, Monk BJ, ve ark.. Features of the cervicovaginal microenvironment drive cancer biomarker signatures in patients across cervical carcinogenesis. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–14.
15. Kindinger LM, MacIntyre DA, Lee YS, Marchesi JR, Smith A, McDonald JAK, ve ark.. Relationship between vaginal microbial dysbiosis, inflammation, and pregnancy outcomes in cervical cerclage. *Sci Transl Med.* 2016;8(350):350ra102.

16. Ziklo N, Vidgen ME, Taing K, Huston WM, Timms P. Dysbiosis of the vaginal microbiota and higher vaginal kynurenine/tryptophan ratio reveals an association with *Chlamydia trachomatis* genital infections. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8(JAN):1–11.
17. Curty G, de Carvalho PS, Soares MA. The role of the cervicovaginal microbiome on the genesis and as a biomarker of premalignant cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. 2020.
18. WHO - Eliminating cervical cancer.
19. FDA - Human Papillomavirus Vaccine.
20. Castle PE, Maza M. Prophylactic HPV vaccination: Past, present, and future. Vol. 144, *Epidemiology and Infection*. 2016.
21. Mix JM, van Dyne EA, Saraiya M, Hallowell BD, Thomas CC. Assessing impact of HPV vaccination on cervical cancer incidence among women aged 15–29 years in the United States, 1999–2017: An ecologic study. Vol. 30, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2021.
22. Lei J, Ploner A, Elfström KM, Wang J, Roth A, Fang F, ve ark.. HPV Vaccination and the Risk of Invasive Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(14).
23. Falcaro M, Castañon A, Ndlela B, Checchi M, Soldan K, Lopez-Bernal J, ve ark.. The effects of the national HPV vaccination programme in England, UK, on cervical cancer and grade 3 cervical intraepithelial neoplasia incidence: a register-based observational study. *The Lancet*. 2021;398(10316).
24. Anuforo B, McGee-Avila JK, Toler L, Xu B, Kohler RE, Manne S, ve ark.. Disparities in HPV vaccine knowledge and adolescent HPV vaccine uptake by parental nativity among diverse multiethnic parents in New Jersey. *BMC Public Health*. 2022;22(1).
25. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K V., ve ark.. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(6).
26. Bhatla N, Singhal S. Primary HPV screening for cervical cancer. Vol. 65, *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2020.
27. Mavi Aydoğdu SG, Özsoy Ü. Serviks kanseri ve HPV. *Androloji Bülteni*. 2018;25–9.
28. White EA. Manipulation of epithelial differentiation by hpv oncoproteins. *Viruses*. 2019;11(4).
29. Wang Q, Song R, Zhao C, Liu H, Yang Y, Gu S, ve ark.. HPV16 E6 promotes cervical cancer cell migration and invasion by downregulation of NHERF1. *Int J Cancer*. 2019;144(7).
30. Basu P, Taghavi K, Hu SY, Mogri S, Joshi S. Management of cervical premalignant lesions. Vol. 42, *Current Problems in Cancer*. 2018.
31. World Health Organization (WHO). Guideline For Screening and Treatment of Cervical Pre-cancer Lesions for Cervical Cancer Prevention. Who. 2021.
32. Hu S, Zhao X, Zhang Y, Qiao Y, Zhao F. Interpretation of “WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention, second edition.” *National Medical Journal of China*. 2021;101(34).

33. Vu M, Yu J, Awolude OA, Chuang L. Cervical cancer worldwide. *Current Problems in Cancer*. 2018.
34. Xing B, Guo J, Sheng Y, Wu G, Zhao Y. Human Papillomavirus-Negative Cervical Cancer: A Comprehensive Review. Vol. 10, *Frontiers in Oncology*. 2021.
35. Aktaş BA, Toptaş T, Üreyen I, Doğan S, Uysal A. Obstetrician-gynecologists' practice patterns regarding hpv testing in cervical cancer screening in turkey. *Turk J Obstet Gynecol*. 2021;18(1).
36. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*. 2013.
37. Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH, Liaw KL, Barr E. Progression and regression of incident cervical HPV 6, 11, 16 and 18 infections in young women. *Infect Agent Cancer*. 2007;
38. İlhan ZE, Łaniewski P, Thomas N, Roe DJ, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Deciphering the complex interplay between microbiota, HPV, inflammation and cancer through cervicovaginal metabolic profiling. *EBioMedicine*. 2019;44.
39. IARC Screening Group. Chapter 1: An introduction to the anatomy of the uterine cervix. *Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginner's Manual*. 2015;
40. Doorbar J, Griffin H. Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. Vol. 7, *Papillomavirus Research*. 2019.
41. Arends MJ, Buckley CH, Wells M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. Vol. 51, *Journal of Clinical Pathology*. 1998.
42. Campo L, Zhang C, Breuer EK. EMT-inducing molecular factors in gynecological cancers. Vol. 2015, *BioMed Research International*. 2015.
43. Workowski KA, Bachmann LH, Chan PA, Johnston CM, Muzny CA, Park I, ve ark.. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. *MMWR Recommendations and Reports*. 2021;70(4).
44. Ortiz-de la Tabla V, Gutiérrez F. Cervicitis: Etiology, diagnosis and treatment. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37(10).
45. Jatlaoui TC, Simmons KB, Curtis KM. The safety of intrauterine contraception initiation among women with current asymptomatic cervical infections or at increased risk of sexually transmitted infections. Vol. 94, *Contraception*. 2016.
46. Sehnal B, Dusek L, Cibula D, Zima T, Halaska M, Driak D, ve ark.. The relationship between the cervical and anal HPV infection in women with cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of Clinical Virology*. 2014;59(1).
47. Tantengco OAG, Menon R. Breaking Down the Barrier: The Role of Cervical Infection and Inflammation in Preterm Birth. *Front Glob Womens Health*. 2022;2.
48. Walker H, Burrell M, Flatley J, Powers H. A metabolite profiling method for diagnosis of precancerous cervical lesions and HPV persistence. *Bioanalysis*. 2017;9(8):601–8.
49. Nasiell K, Roger V, Nasiell M. Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstetrics and Gynecology*. 1986;67(5).

50. Pitman MB, Centeno BA, Ali SZ, Genevay M, Stelow E, Mino-Kenudson M, ve ark.. Standardized terminology and nomenclature for pancreatobiliary cytology: The Papanicolaou Society of Cytopathology guidelines. *Diagn Cytopathol.* 2014;42(4).
51. Crum CP, McLachlin CM. Cervical intraepithelial neoplasia. *J Cell Biochem.* 1995;
52. Loopik DL, Bentley HA, Eijgenraam MN, Inthout J, Bekkers RLM, Bentley JR. The Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grades 1, 2, and 3: A Systematic Review and Meta-analysis. Vol. 25, *Journal of Lower Genital Tract Disease.* 2021.
53. DeSimone CP, Day ME, Tovar MM, Dietrich CS, Eastham ML, Modesitt SC. Rate of pathology from atypical glandular cell Pap tests classified by the Bethesda 2001 nomenclature. *Obstetrics and Gynecology.* 2006;107(6).
54. Alrajjal A, Pansare V, Choudhury MSR, Khan MYA, Shidham VB. Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of Uterine Cervix and Bethesda System. Vol. 18, *CytoJournal.* 2021.
55. Bakitas MA, Beijers AJM, Mols F, Driessen CML, Dercksen M, Vreugdenhil G, ve ark.. SEER Stat Fact Sheets : Cervix Uteri Cancer. *Gynecol Oncol.* 2014;23(3).
56. Herbert A, Bergeron C, Wiener H, Schenck U, Klinkhamer P, Bulten J, ve ark.. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: Recommendations for cervical cytology terminology. *Cytopathology.* 2007;18(4).
57. Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, Heller DS, Henry MR, Luff RD, ve ark.. 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.* 2013;32(1).
58. Marcus JZ, Cason P, Downs LS, Einstein MH, Flowers L. The ASCCP Cervical Cancer Screening Task Force Endorsement and Opinion on the American Cancer Society Updated Cervical Cancer Screening Guidelines. Vol. 25, *Journal of Lower Genital Tract Disease.* 2021.
59. Bruni L, Serrano B, Roura E, Alemany L, Cowan M, Herrero R, ve ark.. Cervical cancer screening programmes and age-specific coverage estimates for 202 countries and territories worldwide: a review and synthetic analysis. *Lancet Glob Health.* 2022 Aug;10(8):e1115–27.
60. Gossa W, Feters MD. How Should Cervical Cancer Prevention Be Improved in LMICs? *AMA J Ethics.* 2020;22(2).
61. De Bekker-Grob EW, De Kok IMCM, Bulten J, Van Rosmalen J, Vedder JEM, Arbyn M, ve ark.. Liquid-based cervical cytology using ThinPrep technology: Weighing the pros and cons in a cost-effectiveness analysis. *Cancer Causes and Control.* 2012;23(8).
62. Mahajan A, Kucher E, Hoefle W, Engelhardt S, Accola M, Barasch S, ve ark.. Maximizing the adequacy of Hologic® Cervista® HPV HR results on ThinPrep® Pap samples treated with glacial acetic acid. In: *Diagnostic Cytopathology.* 2016.

63. Saraiya M, Berkowitz Z, Yabroff KR, Wideroff L, Kobrin S, Benard V. Cervical cancer screening with both human papillomavirus and papanicolaou testing vs papanicolaou testing alone: What screening intervals are physicians recommending? *Arch Intern Med.* 2010;170(11).
64. Najib F sadat, Hashemi M, Shiravani Z, Poordast T, Sharifi S, Askary E. Diagnostic Accuracy of Cervical Pap Smear and Colposcopy in Detecting Premalignant and Malignant Lesions of Cervix. *Indian J Surg Oncol.* 2020;11(3).
65. Shafi MI, Earl HM, Tan LT. Gynaecological oncology. *Gynaecological Oncology.* 2009.
66. Manjee KG, Watkin WG. Do Deeper Levels of Cervical Biopsies Preceded by a Pap Smear Diagnosis of LSIL, ASCUS, or NILM/HPV+ Increase the Yield of Identifying Clinically Significant Lesions? *Am J Clin Pathol.* 2020;154(Supplement_1).
67. Sherman ME, Kelly D. High-grade squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma following the report of three negative Papanicolaou smears: screening failures or rapid progression? *Mod Pathol.* 1992;5(3).
68. Disaia J.Philip CTW. *Klinik Jinekolojik Onkoloji.* 6th ed. 2003. 3–61 p.
69. Toplum Tabanlı Serviks Kanseri Taramasında HPV DNA Kullanımı.
70. Burness JV, Schroeder JM, Warren JB. Cervical Colposcopy: Indications and Risk Assessment. *Am Fam Physician.* 2020;102(1).
71. Günver MK, Dane C, Doğu SY. The importance of colposcopic biopsy in cervical smear pathologies colposcopic biopys in cervical screening. *Haseki Tip Bulteni.* 2019;57(4).
72. Wang Y, Wang J, Mei H. Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Cervical Carcinoma by Cervical Biopsy under Colposcopy and Analysis of Factors Influencing. *Emerg Med Int.* 2022;2022.
73. Stoler MH, Vichnin MD, Ferenczy A, Ferris DG, Perez G, Paavonen J, ve ark.. The accuracy of colposcopic biopsy: Analyses from the placebo arm of the Gardasil clinical trials. *Int J Cancer.* 2011;128(6).
74. Poomtavorn Y, Tanprasertkul C, Sammor A, Suwannarurk K, Thaweekul Y. Predictors of absent high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in loop electrosurgical excision procedure specimens of patients with colposcopic directed biopsy-confirmed high-grade CIN. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2019;20(3).
75. Ozaki S, Zen Y, Inoue M. Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: Potential progression predictive factors for low-grade lesions. *Hum Pathol.* 2011;42(7).
76. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S, ve ark.. P16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Archiv.* 2004;445(6).
77. Usyk M, Zolnik CP, Castle PE, Porras C, Herrero R, Gradissimo A, ve ark.. Cervicovaginal microbiome and natural history of HPV in a longitudinal study. *PLoS Pathog.* 2020;16(3).
78. Vink MA, Bogaards JA, Van Kemenade FJ, De Melker HE, Meijer CJLM, Berkhof J. Clinical progression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: Estimating the time to preclinical cervical cancer from doubly censored national registry data. *Am J Epidemiol.* 2013;178(7).

79. O'Leary JJ, White C, Spillane C, Naik P, O'Brien R, Reynolds S, ve ark.. Cervical screening: A new way forward (tests of risk and tests of disease). *HRB Open Res.* 2018 Feb 28;1:3.
80. Duesing N, Schwarz J, Choschzick M, Jaenicke F, Giesecking F, Issa R, ve ark.. Assessment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) with colposcopic biopsy and efficacy of loop electrosurgical excision procedure (LEEP). *Arch Gynecol Obstet.* 2012;286(6).
81. Jung Y, Lee AR, Lee SJ, Lee YS, Park DC, Park EK. Clinical factors that affect diagnostic discrepancy between colposcopically directed biopsies and loop electrosurgical excision procedure conization of the uterine cervix. *Obstet Gynecol Sci.* 2018;61(4).
82. Crane JMG. Pregnancy outcome after loop electrosurgical excision procedure: A systematic review. Vol. 102, *Obstetrics and Gynecology.* 2003.
83. Frega A, Sesti F, De Sanctis L, Pacchiarotti A, Votano S, Biamonti A, ve ark.. Pregnancy outcome after loop electrosurgical excision procedure for cervical intraepithelial neoplasia. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 2013;122(2).
84. Gezer S. The concordance between colposcopic biopsy and loop electrosurgical excision procedures (LEEP) in patients with known smear cytology and human papilloma virus results. *North Clin Istanbul [Internet].* 2021; Available from: <https://kuzeyklinikleri.com/jvi.aspx?un=NCI-80090&volume=>
85. Kim SI, Kim SJ, Suh DH, Kim K, No JH, Kim YB. Pathologic discrepancies between colposcopy-directed biopsy and loop electrosurgical excision procedure of the uterine cervix in women with cytologic high-grade squamous intraepithelial lesions. *J Gynecol Oncol.* 2020;31(2).
86. Zegels G, Van Raemdonck GAA, Tjalma WAA, Van Ostade XWM. Use of cervicovaginal fluid for the identification of biomarkers for pathologies of the female genital tract. *Proteome Sci [Internet].* 2010;8(1):63. Available from: <http://www.proteomesci.com/content/8/1/63>
87. Van Ostade X, Dom M, Tjalma W, Van Raemdonck G. Candidate biomarkers in the cervical vaginal fluid for the (self-)diagnosis of cervical precancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2018;297(2):295–311.
88. Ndayisaba G, Verwijs MC, Van Eeckhoudt S, Gasarabwe A, Hardy L, Borgdorff H, ve ark.. Feasibility and acceptability of a novel cervicovaginal lavage self-sampling device among women in kigali, Rwanda. *Sex Transm Dis.* 2013;40(7).
89. Othman NH, Zaki FHM. Self-collection tools for routine cervical cancer screening: A review. Vol. 15, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2014.
90. Adnane M, Meade KG, O'Farrelly C. Cervico-vaginal mucus (CVM) – an accessible source of immunologically informative biomolecules. Vol. 42, *Veterinary Research Communications.* 2018.
91. Ferreira CST, Da Silva MG, De Pontes LG, Dos Santos LD, Marconi C. Protein Content of Cervicovaginal Fluid Is Altered during Bacterial Vaginosis. *J Low Genit Tract Dis.* 2018;22(2):147–51.

92. Martínez-Rodríguez F, Limones-González JE, Mendoza-Almanza B, Esparza-Ibarra EL, Gallegos-Flores PI, Ayala-Luján JL, ve ark.. Understanding cervical cancer through proteomics. Vol. 10, *Cells*. 2021.
93. Park S, You YA, Yun H, Choi SJ, Hwang HS, Choi SK, ve ark.. Cervicovaginal fluid cytokines as predictive markers of preterm birth in symptomatic women. *Obstet Gynecol Sci*. 2020;63(4).
94. Csősz É, Kalló G, Márkus B, Deák E, Csutak A, Tőzsér J. Quantitative body fluid proteomics in medicine — A focus on minimal invasiveness. Vol. 153, *Journal of Proteomics*. 2017.
95. Gerner C, Costigliola V, Golubnitschaja O. Multiomic patterns in body fluids: technological challenge with a great potential to implement the advanced paradigm OF 3P medicine. Vol. 39, *Mass Spectrometry Reviews*. 2020.
96. Lee H, Kim S Il. Review of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Proteomic Analyses of Body Fluids to Diagnose Infectious Diseases. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. 2022.
97. Chappell CA, Rohan LC, Moncla BJ, Wang L, Meyn LA, Bunge K, ve ark.. The effects of reproductive hormones on the physical properties of cervicovaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;211(3).
98. Riganelli L, Iebba V, Piccioni M, Illuminati I, Bonfiglio G, Neroni B, ve ark.. Structural Variations of Vaginal and Endometrial Microbiota: Hints on Female Infertility. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10.
99. Fernando M, Ellery SJ, Marquina C, Lim S, Naderpoor N, Mousa A. Vitamin D-binding protein in pregnancy and reproductive health. *Nutrients*. 2020;12(5).
100. Gravett MG, Thomas A, Schneider KA, Reddy AP, Dasari S, Jacob T, ve ark.. Proteomic analysis of cervical-vaginal fluid: Identification of novel biomarkers for detection of intra-amniotic infection. *J Proteome Res*. 2007;6(1):89–96.
101. Heng YJ, Liong S, Permezel M, Rice GE, Di Quinzio MKW, Georgiou HM. Human cervicovaginal fluid biomarkers to predict term and preterm labor. Vol. 6, *Frontiers in Physiology*. 2015.
102. Bastek JA, Elovitz MA. The role and challenges of biomarkers in spontaneous preterm birth and preeclampsia. In: *Fertility and Sterility*. 2013.
103. Rocconi RP, Wilhite AM, Schambeau L, Scalici J, Pannell L, Finan MA. A novel proteomic-based screening method for ovarian cancer using cervicovaginal fluids: A window into the abdomen. *Gynecol Oncol*. 2022;164(1).
104. Takashina T, Ono M, Kanda Y, Sagae S, Hayakawa O, Ito E. Cervicovaginal and endometrial cytology in ovarian cancer. *Acta Cytol*. 1988;32(2).
105. Van Raemdonck G, Zegels G, Coen E, Vuylsteke B, Jennes W, Van Ostade X. Increased Serpin A5 levels in the cervicovaginal fluid of HIV-1 exposed seronegatives suggest that a subtle balance between serine proteases and their inhibitors may determine susceptibility to HIV-1 infection. *Virology* [Internet]. 2014;458–459(1):11–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.04.015>

106. Van Raemdonck GAA, Tjalma WAA, Coen EP, Depuydt CE, Van Ostade XWM. Identification of protein biomarkers for cervical cancer using human cervicovaginal fluid. *PLoS One*. 2014;9(9).
107. Starodubtseva NL, Brzhozovskiy AG, Bugrova AE, Kononikhin AS, Indeykina MI, Gusakov KI, ve ark.. Label-free cervicovaginal fluid proteome profiling reflects the cervix neoplastic transformation. *Journal of Mass Spectrometry*. 2019;54(8):693–703.
108. Panicker G, Lee DR, Unger ER. Optimization of SELDI-TOF protein profiling for analysis of cervical mucous. *J Proteomics*. 2009;71(6).
109. Dezzutti CS, Hendrix CW, Marrazzo JM, Pan Z, Wang L, Louissaint N, ve ark.. Performance of swabs, lavage, and diluents to quantify biomarkers of female genital tract soluble mucosal mediators. *PLoS One*. 2011;6(8).
110. Castle PE, Rodriguez AC, Bowman FP, Herrero R, Schiffman M, Bratti MC, ve ark.. Comparison of Ophthalmic Sponges for Measurements of Immune Markers from Cervical Secretions. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(2):399–405.
111. Roman LC, Edwards RP, Kelly LA, Colenello KA, Bowman FP, Crowley-Nowick PA. Optimization of the Weck-Cel collection method for quantitation of cytokines in mucosal secretions. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7(1).
112. Marks MA, Eby Y, Howard R, Gravitt PE. Comparison of normalization methods for measuring immune markers in cervical secretion specimens. *J Immunol Methods*. 2012;382(1–2).
113. Churchman SA, Moss JA, Baum MM. Accurate measurement of female genital tract fluid dilution in cervicovaginal lavage samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016;1017–1018(626):75–81.
114. Short CS, Quinlan R, Bennett P, Shattock RJ, Taylor GP. Optimising the collection of female genital tract fluid for cytokine analysis in pregnant women. *J Immunol Methods* [Internet]. 2018;458(April):15–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.03.014>
115. Borgdorff H, Gautam R, Armstrong SD, Xia D, Ndayisaba GF, Van Teijlingen NH, ve ark.. Cervicovaginal microbiome dysbiosis is associated with proteome changes related to alterations of the cervicovaginal mucosal barrier. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2016;9(3):621–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2015.86>
116. Jordan J, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Schenck U, Baldauf JJ, Da Silva D, ve ark.. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: Recommendations for clinical management of abnormal cervical cytology, part 1. Vol. 19, *Cytopathology*. 2008.
117. Juno JA, Boily-Larouche G, Lajoie J, Fowke KR. Collection, isolation, and flow cytometric analysis of human endocervical samples. *Journal of Visualized Experiments*. 2014;(89).
118. Zhang J, Liu SC, Luo XH, Tao GX, Guan M, Yuan H, ve ark.. Exosomal Long Noncoding RNAs are Differentially Expressed in the Cervicovaginal Lavage Samples of Cervical Cancer Patients. *J Clin Lab Anal*. 2016;30(6).
119. Archer J, Patwary FK, Sturt AS, Webb EL, Phiri CR, Mweene T, ve ark.. Validation of the isothermal *Schistosoma haematobium* Recombinase Polymerase Amplification (RPA) assay,

- coupled with simplified sample preparation, for diagnosing female genital schistosomiasis using cervicovaginal lavage and vaginal self-swab samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022;16(3).
120. Landy R, Hollingworth T, Waller J, Marlow LAV, Rigney J, Round T, ve ark.. Non-speculum clinician-taken samples for human papillomavirus testing: a cross-sectional study in older women. *British Journal of General Practice*. 2022;72(721).
 121. Hawkes D, Keung MHT, Huang Y, McDermott TL, Romano J, Saville M, ve ark.. Self-collection for cervical screening programs: From research to reality. Vol. 12, *Cancers*. 2020.
 122. Delany-Moretlwe S, Rosas R, Mlaba N, Clayton T, Akpomiemie G, LeGoff J, ve ark.. Comparison of cervicovaginal lavage, cervicovaginal lavage enriched with cervical swab, and vaginal tampon for the detection of HIV-1 RNA and HSV-2 DNA in genital secretions. *J Acquir Immune Defic Syndr* (1988). 2008;49(4):406–9.
 123. Karjalainen L, Anttila A, Nieminen P, Luostarinen T, Virtanen A. Self-sampling in cervical cancer screening: Comparison of a brush-based and a lavage-based cervicovaginal self-sampling device. *BMC Cancer* [Internet]. 2016;16(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2246-9>
 124. Cho HW, Ouh YT, Hong JH, Min KJ, So KA, Kim TJ, ve ark.. Comparison of urine, self-collected vaginal swab, and cervical swab samples for detecting human papillomavirus (HPV) with Roche Cobas HPV, Anyplex II HPV, and RealTime HR-S HPV assay. *J Virol Methods*. 2019;269.
 125. De Strooper LMA, Verhoef VMJ, Berkhof J, Hesselink AT, De Bruin HME, Van Kemenade FJ, ve ark.. Validation of the FAM19A4/mir124-2 DNA methylation test for both lavage- and brush-based self-samples to detect cervical (pre)cancer in HPV-positive women. *Gynecol Oncol*. 2016;141(2).
 126. Gök M, Heideman DAM, Van Kemenade FJ, Berkhof J, Rozendaal L, Spruyt JWM, ve ark.. HPV testing on self collected cervicovaginal lavage specimens as screening method for women who do not attend cervical screening: Cohort study. *BMJ (Online)*. 2010;340(7752).
 127. Kuriakose S, Sabeena S, Binesh D, Abdulmajeed J, Ravishankar N, Ramachandran A, ve ark.. Diagnostic accuracy of self-collected vaginal samples for HPV DNA detection in women from South India. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2020;149(2).
 128. Enerly E, Bonde J, Schee K, Pedersen H, Lönnberg S, Nygård M. Self-sampling for human papillomavirus testing among non-attenders increases attendance to the norwegian cervical cancer screening programme. *PLoS One*. 2016;11(4).
 129. Nutthachote P, Oranratanaphan S, Termrungruanglert W, Triratanachai S, Chaiwongkot A, Baedyananda F, ve ark.. Comparison of detection rate of high risk HPV infection between self-collected HPV testing and clinician-collected HPV testing in cervical cancer screening. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2019;58(4).
 130. Saville M, Hawkes D, Keung MHT, Ip ELO, Silvers J, Sultana F, ve ark.. Analytical performance of HPV assays on vaginal self-collected vs practitioner-collected cervical samples: the SCoPE study. *Journal of Clinical Virology*. 2020;127.

131. Kohler RE, Elliott T, Monare B, Moshashane N, Ramontshonyana K, Chatterjee P, ve ark.. HPV self-sampling acceptability and preferences among women living with HIV in Botswana. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2019;147(3).
132. Ertik FC, Kampers J, Hülse F, Stolte C, Böhmer G, Hillemanns P, ve ark.. Cocoss-trial: Concurrent comparison of self-sampling devices for HPV-detection. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(19).
133. Campos NG, Alfaro K, Maza M, Sy S, Melendez M, Masch R, ve ark.. The cost-effectiveness of human papillomavirus self-collection among cervical cancer screening non-attenders in El Salvador. *Prev Med (Baltim)*. 2020;131.
134. Gottschlich A, Rivera-Andrade A, Bevilacqua K, Murchland AR, Isak E, Alvarez CS, ve ark.. Using self-collection HPV testing to increase engagement in cervical cancer screening programs in rural Guatemala: a longitudinal analysis. *BMC Public Health*. 2020;20(1).
135. Camara H, Zhang Y, Lafferty L, Vallely AJ, Guy R, Kelly-Hanku A. Self-collection for HPV-based cervical screening: a qualitative evidence meta-synthesis. *BMC Public Health*. 2021;21(1).
136. Krings A, Effah K, Amuah JE, Dunyo P, Hansen B, Adalety R, ve ark.. Comparison of delphi screener and evalyn brush self-samplers for HPV screening in low resource settings (accessing*). *Oncol Res Treat*. 2016;1).
137. Brewer N, Bartholomew K, Maxwell A, Grant J, Wihongi H, Bromhead C, ve ark.. Comparison of two invitation-based methods for human papillomavirus (HPV) self-sampling with usual care among un- And under-screened Māori, Pacific and Asian women: Study protocol for a randomised controlled community trial to examine the effect of self-sampling on participation in cervical-cancer screening. *BMC Cancer*. 2019;19(1).
138. Boylan KLM, Afiuni-Zadeh S, Geller MA, Hickey K, Griffin TJ, Pambuccian SE, ve ark.. A feasibility study to identify proteins in the residual Pap test fluid of women with normal cytology by mass spectrometry-based proteomics. *Clin Proteomics*. 2014;11(1):1–15.
139. Qoronfleh MW. Protein Biomarker Validation: A Mass Spectrometry Approach. *J Proteomics Bioinform*. 2017;10(10).
140. Van Ostade X, Dom M, Van Raemdonck G. IPA analysis of cervicovaginal fluid from precancerous women points to the presence of biomarkers for the precancerous state of cervical carcinoma. *Proteomes*. 2014;2(3):426–50.
141. Shaw JLV, Smith CR, Diamandis EP. Proteomic analysis of human cervico-vaginal fluid. *J Proteome Res*. 2007;6(7):2859–65.
142. Zegels G, Van Raemdonck GAA, Coen EP, Tjalma WAA, Van Ostade XWM. Comprehensive proteomic analysis of human cervical-vaginal fluid using colposcopy samples. *Proteome Sci*. 2009;7:1–16.
143. Parry S, Leite R, Esplin MS, Bukowski R, Zhang H, Varner M, ve ark.. Cervicovaginal fluid proteomic analysis to identify potential biomarkers for preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;222(5).

144. Ma Z, Chen J, Luan T, Chu C, Wu W, Zhu Y, ve ark.. Proteomic analysis of human cervical adenocarcinoma mucus to identify potential protein biomarkers. *PeerJ*. 2020;8.
145. Lara Gutiérrez A, Lindberg JH, Shevchenko G, Gustavsson I, Bergquist J, Gyllensten U, ve ark.. Identification of candidate protein biomarkers for cin2+ lesions from self-sampled, dried cervico–vaginal fluid using lc-ms/ms. *Cancers (Basel)*. 2021;13(11).
146. Köse B, Takmaz Ö, Güngör M, Baykal AT. Point-of-care diagnosis of cervical cancer: potential protein biomarkers in cervicovaginal fluid. *Turkish Journal of Biology*. 2022;46(3).
147. Lykke MR, Becher N, Haahr T, Boedtkjer E, Jensen JS, Uldbjerg N. Vaginal, cervical and uterine pH in women with normal and abnormal vaginal microbiota. *Pathogens*. 2021;10(2).
148. Miller EA, Beasley DAE, Dunn RR, Archie EA. Lactobacilli dominance and vaginal pH: Why is the human vaginal microbiome unique? *Front Microbiol*. 2016;7(DEC).
149. Lin YP, Chen WC, Cheng CM, Shen CJ. Vaginal ph value for clinical diagnosis and treatment of common vaginitis. Vol. 11, *Diagnostics*. 2021.
150. Wang L, Koppolu S, Chappell C, Moncla BJ, Hillier SL, Mahal LK. Studying the effects of reproductive hormones and bacterial vaginosis on the glycome of lavage samples from the cervicovaginal cavity. *PLoS One*. 2015;10(5).
151. Balle C, Konstantinus IN, Jaumdally SZ, Havyarimana E, Lennard K, Esra R, ve ark.. Hormonal contraception alters vaginal microbiota and cytokines in South African adolescents in a randomized trial. *Nat Commun*. 2020;11(1).
152. Hughes SM, Levy CN, Katz R, Lokken EM, Anahtar MN, Hall MB, ve ark.. Changes in concentrations of cervicovaginal immune mediators across the menstrual cycle: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *BMC Med*. 2022;20(1).
153. Kumari S, Bhor VM. Association of cervicovaginal dysbiosis mediated HPV infection with cervical intraepithelial neoplasia. Vol. 152, *Microbial Pathogenesis*. 2021.
154. Rodríguez-Esquivel M, Rosales J, Castro R, Apresa-García T, Garay Ó, Romero-Morelos P, ve ark.. Volatolome of the Female Genitourinary Area: Toward the Metabolome of Cervical Cancer. *Arch Med Res*. 2018;49(1):27–35.
155. Guerrero-Flores H, Apresa-García T, Garay-Villar Ó, Sánchez-Pérez A, Flores-Villegas D, Bandera-Calderón A, ve ark.. A non-invasive tool for detecting cervical cancer odor by trained scent dogs. *BMC Cancer*. 2017;17(1).
156. Oliver A, Lamere B, Weihe C, Wandro S, Lindsay KL, Wadhwa PD, ve ark.. Cervicovaginal microbiome composition is associated with metabolic profiles in healthy pregnancy. *mBio*. 2020;11(4).
157. Croatti V, Parolin C, Giordani B, Foschi C, Fedi S, Vitali B. Lactobacilli extracellular vesicles: potential postbiotics to support the vaginal microbiota homeostasis. *Microb Cell Fact*. 2022;21(1).
158. Chorna N, Romaguera J, Godoy-Vitorino F. Cervicovaginal microbiome and urine metabolome paired analysis reveals niche partitioning of the microbiota in patients with human papilloma virus infections. *Metabolites*. 2020;10(1):1–14.

159. Ceccarani C, Foschi C, Parolin C, D'Antuono A, Gaspari V, Consolandi C, ve ark.. Diversity of vaginal microbiome and metabolome during genital infections. *Sci Rep.* 2019;9(1).
160. Sanches JM, Giraldo PC, Amaral R, Eberlin MN, Marques LA, Migliorini I, ve ark.. Vaginal lipidomics of women with vulvovaginal candidiasis and cytolytic vaginosis: A non-targeted LC-MS pilot study. *PLoS One.* 2018;13(8).
161. Vicente-Muñoz S, Cobo T, Puchades-Carrasco L, Sánchez-García AB, Agustí N, Palacio M, ve ark.. Vaginal metabolome: towards a minimally invasive diagnosis of microbial invasion of the amniotic cavity in women with preterm labor. *Sci Rep.* 2020;10(1).
162. Hong SH, Lee JY, Seo S, Shin B, Jeong CH, Bae E, ve ark.. Lipidomic Analysis of Cervicovaginal Fluid for Elucidating Prognostic Biomarkers and Relevant Phospholipid and Sphingolipid Pathways in Preterm Birth. *Metabolites.* 2023;13(2).
163. Amabebe E. Analysis of cervicovaginal fluid metabolome and microbiome in relation to preterm birth. 2016.
164. Amabebe E, Reynolds S, Stern V, Stafford G, Paley M, Anumba DOC. Cervicovaginal fluid acetate: A metabolite marker of preterm birth in symptomatic pregnant women. *Front Med (Lausanne).* 2016;3(OCT):1–10.
165. Pruski P, Correia GDS, Lewis H V., Capuccini K, Inglese P, Chan D, ve ark.. Direct on-swab metabolic profiling of vaginal microbiome host interactions during pregnancy and preterm birth. *Nat Commun.* 2021;12(1).
166. Amabebe E, Anumba DOC. A Combination of Cervicovaginal Fluid Glutamate, Acetate and D-Lactate Identified Asymptomatic Low-Risk Women Destined to Deliver Preterm: a Prospective Cohort Study. *Reproductive Sciences.* 2022;29(3).
167. Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. Vol. 7, *Nutrition and Metabolism.* 2010.
168. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UCS. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. Vol. 148, *Life Sciences.* 2016.
169. Arfin S, Jha NK, Jha SK, Kesari KK, Ruokolainen J, Roychoudhury S, ve ark.. Oxidative stress in cancer cell metabolism. Vol. 10, *Antioxidants.* 2021.
170. Shah S, Kalal BS. Oxidative stress in cervical cancer and its response to chemoradiation. *Turk J Obstet Gynecol.* 2019;16(2).
171. Ebrahimi S, Soltani A, Hashemy SI. Oxidative stress in cervical cancer pathogenesis and resistance to therapy. Vol. 120, *Journal of Cellular Biochemistry.* 2019.
172. Cruz-Gregorio A, Aranda-Rivera AK, Ortega-Lozano AJ, Pedraza-Chaverri J, Mendoza-Hoffmann F. Lipid metabolism and oxidative stress in HPV-related cancers. Vol. 172, *Free Radical Biology and Medicine.* 2021.
173. Lin CL, Lee CH, Chen CM, Cheng CW, Chen PN, Ying TH, ve ark.. Protodioscin Induces Apoptosis Through ROS-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress via the JNK/p38 Activation Pathways in Human Cervical Cancer Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2018;46(1).

174. Georgakopoulos-Soares I, Chartoumpekis D V., Kyriazopoulou V, Zaravinos A. EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer. Vol. 10, *Frontiers in Oncology*. 2020.
175. Mutemberezi V, Guillemot-Legrís O, Muccioli GG. Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators. Vol. 64, *Progress in Lipid Research*. 2016.
176. Ding X, Zhang W, Li S, Yang H. The role of cholesterol metabolism in cancer. *Am J Cancer Res*. 2019;9(2).
177. Kloudova A, Guengerich FP, Soucek P. The Role of Oxysterols in Human Cancer. Vol. 28, *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2017.
178. De Weille J, Fabre C, Bakalara N. Oxysterols in cancer cell proliferation and death. Vol. 86, *Biochemical Pharmacology*. 2013.
179. Rodríguez-García A, García-Vicente R, Morales ML, Ortiz-Ruiz A, Martínez-López J, Linares M. Protein carbonylation and lipid peroxidation in hematological malignancies. Vol. 9, *Antioxidants*. 2020.
180. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. Vol. 9, *Trends in Molecular Medicine*. 2003.
181. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. Vol. 10, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2006.
182. Madian AG, Regnier FE. Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *J Proteome Res*. 2010;9(8).
183. Shen Y, Guo X, Li X, Wang W, Wang S, Pan J, ve ark.. Effect of cooking temperatures on meat quality, protein carbonylation and protein cross-linking of beef packed in high oxygen atmosphere. *LWT*. 2022;154.
184. Weber D, Davies MJ, Grune T. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. Vol. 5, *Redox Biology*. 2015.
185. Al Mamun NA, Quyyum SA, Bashir K, Kabir Y, Rahman M, Islam MT. Comparison of different blood biomarkers of cervical cancer patients with control subjects. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*. 2022;46(1).
186. Shrivastava A, Mishra SP, Pradhan S, Choudhary S, Singla S, Zahra K, ve ark.. An assessment of serum oxidative stress and antioxidant parameters in patients undergoing treatment for cervical cancer. *Free Radic Biol Med*. 2021;167.
187. Gautam S, BMLB, MS, MAA, SR, PKS, & AB. Implication of Therapeutic Intervention on Putative Oxidative stress markers in Cervical Cancer. *Journal of Dental and Medical Sciences*. 2017;16(2):86–9.
188. de Marco F, Bucaj E, Foppoli C, Fiorini A, Blarzino C, Filipi K, ve ark.. Oxidative stress in HPV-driven viral carcinogenesis: Redox proteomics analysis of HPV-16 dysplastic and neoplastic tissues. *PLoS One*. 2012;7(3).

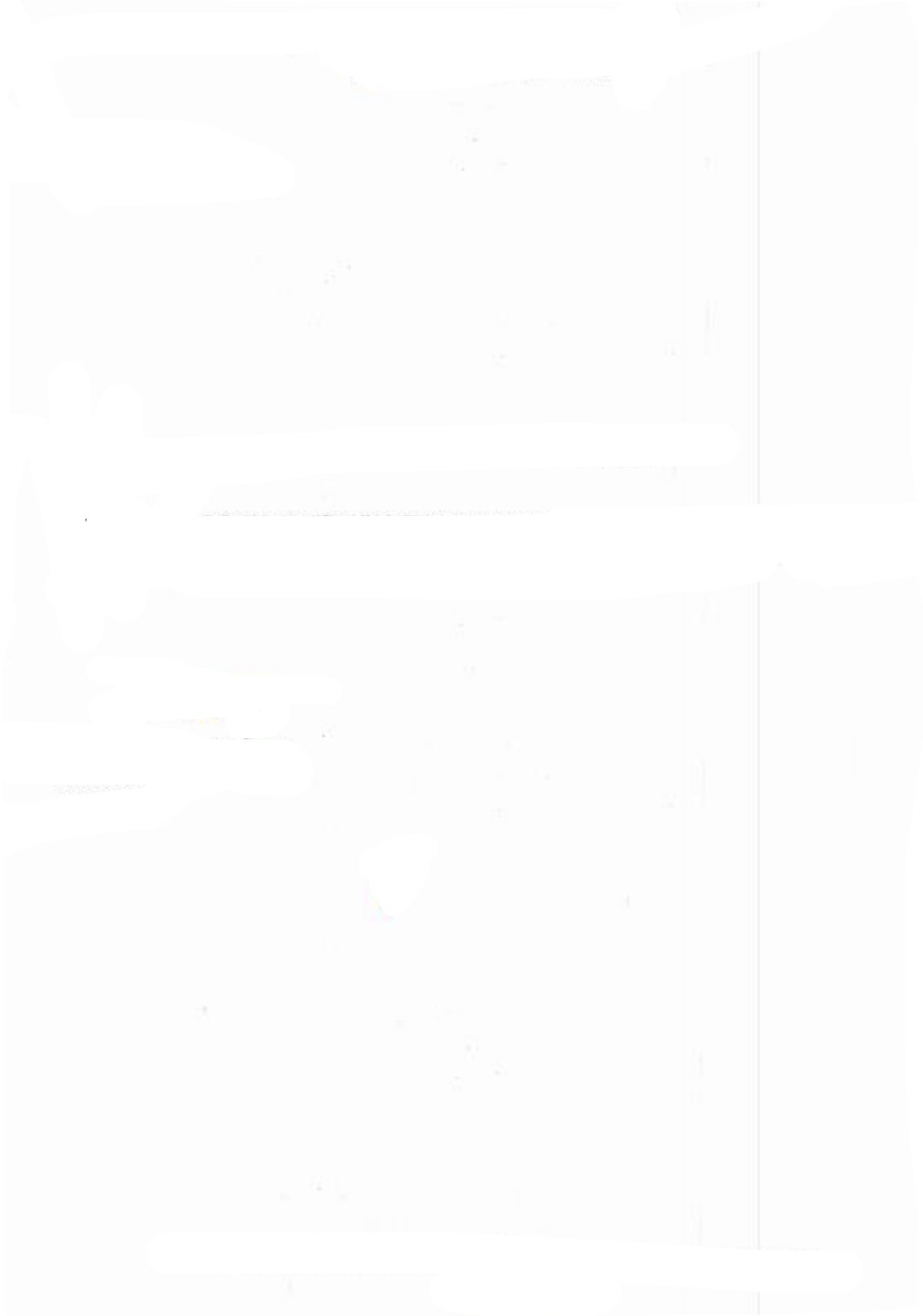
189. Senapati R, Senapati NN, Dwibedi B. Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. Vol. 11, Infectious Agents and Cancer. 2016.
190. Hildesheim A, McShane LM, Schiffman M, Bratti MC, Rodriguez AC, Herrero R, ve ark.. Cytokine and immunoglobulin concentrations in cervical secretions: Reproducibility of the Weck-cel collection instrument and correlates of immune measures. *J Immunol Methods*. 1999;225(1–2).
191. Sandoval-Colin DE, Godines-Enriquez MS, Espejel-Núñez A, Beltrán-Montoya JJ, Picazo-Mendoza DA, de la Cerda-Ángeles JC, ve ark.. Cervicovaginal Cytokines to Predict the Onset of Normal and Preterm Labor: a Pseudo-longitudinal Study. *Reproductive Sciences*. 2023;30(1).
192. Tjiong MY, Van Der Vange N, Ter Schegget JS, Burger MPM, Ten Kate FWJ, Out TA. Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. *Cytokine*. 2001;14(6):357–60.
193. Moncla BJ, Chappell CA, Mahal LK, Debo BM, Meyn LA, Hillier SL. Impact of bacterial vaginosis, as assessed by nugen criteria and hormonal status on glycosidases and lectin binding in cervicovaginal lavage samples. *PLoS One*. 2015;10(5).
194. Akgun E, Tuzuner MB, Sahin B, Kilercik M, Kulah C, Cakiroglu HN, ve ark.. Proteins associated with neutrophil degranulation are upregulated in nasopharyngeal swabs from SARS-CoV-2 patients. *PLoS One*. 2020;15(10 October).
195. Gurel B, Cansev M, Koc C, Ocalan B, Cakir A, Aydin S, ve ark.. Proteomics Analysis of CA1 Region of the Hippocampus in Pre-, Progression and Pathological Stages in a Mouse Model of the Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2019;16(7).
196. Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(3).
197. Carty JL, Bevan R, Waller H, Mistry N, Cooke M, Lunec J, ve ark.. The effects of vitamin C supplementation on protein oxidation in healthy volunteers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273(2).
198. Kloudova-Spalenkova A, Ueng YF, Wei S, Kopeckova K, Peter Guengerich F, Soucek P. Plasma oxysterol levels in luminal subtype breast cancer patients are associated with clinical data. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2020;197.
199. Vedin LL, Lewandowski SA, Parini P, Gustafsson JÅ, Steffensen KR. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2009;30(4).
200. Holy P, Kloudova A, Soucek P. Importance of genetic background of oxysterol signaling in cancer. Vol. 153, *Biochimie*. 2018.
201. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, ve ark.. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. Vol. 28, *Nature Biotechnology*. 2010.
202. Tentler D, Lomert E, Novitskaya K, Barlev NA. Role of ACTN4 in tumorigenesis, metastasis, and EMT. Vol. 8, *Cells*. 2019.

203. Markovina S, Wang S, Henke LE, Luke CJ, Pak SC, Dewees T, ve ark.. Serum squamous cell carcinoma antigen as an early indicator of response during therapy of cervical cancer. *Br J Cancer*. 2018;118(1).
204. Salvatici M, Achilarré MT, Sandri MT, Boveri S, Vanna Z, Landoni F. Squamous cell carcinoma antigen (SCC-Ag) during follow-up of cervical cancer patients: Role in the early diagnosis of recurrence. *Gynecol Oncol*. 2016;142(1).
205. Choi CH, Chung JY, Chung EJ, Sears JD, Lee JW, Bae DS, ve ark.. Prognostic significance of annexin A2 and annexin A4 expression in patients with cervical cancer. *BMC Cancer*. 2016;16(1).
206. Liu X, Shen X, Zhang J. TRIP13 exerts a cancer-promoting role in cervical cancer by enhancing Wnt/ β -catenin signaling via ACTN4. *Environ Toxicol*. 2021;36(9).
207. Li J, Wang H. H3K27ac-activated EGFR-AS1 promotes cell growth in cervical cancer through ACTN4-mediated WNT pathway. *Biol Direct*. 2022;17(1).
208. Zhu B, Dong B, Hong S, Wang M, Dai W, Zheng Q, ve ark.. Combined detection of actn4 and scc-ag is a promising serological biomarker for cervical intraepithelial neoplasia 3 or worse: A case–control study. *Risk Manag Healthc Policy*. 2020;13.
209. Watanabe T, Ueno H, Watabe Y, Hiraoka N, Morizane C, Itami J, ve ark.. ACTN4 copy number increase as a predictive biomarker for chemoradiotherapy of locally advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(4).
210. KÖSE B, TAKMAZ Ö, GÜNGÖR M, BAYKAL AT. Point-of-care diagnosis of cervical cancer: potential protein biomarkers in cervicovaginal fluid. *Turkish Journal of Biology*. 2022 Jan 1;46(3):195–206.
211. Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: The long and uncertain path to clinical utility. Vol. 24, *Nature Biotechnology*. 2006.
212. Schwämmle V, Hagensen CE, Rogowska-Wrzesinska A, Jensen ON. PolySTest: Robust statistical testing of proteomics data with missing values improves detection of biologically relevant features. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2020;19(8).
213. Melby JA, Roberts DS, Larson EJ, Brown KA, Bayne EF, Jin S, ve ark.. Novel Strategies to Address the Challenges in Top-Down Proteomics. Vol. 32, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2021.
214. Zafar S, Saeed A, Zahid S. Clinical Proteomics: Diagnostics and Prognostic Markers of Cancer. In: *Cancer Biomarkers in Diagnosis and Therapeutics*. Singapore: Springer Nature Singapore; 2022. p. 83–99.
215. Cosgrove CA, Lacey CJ, Cope A V., Bartolf A, Morris G, Yan C, ve ark.. Comparative immunogenicity of HIV-1 gp140 vaccine delivered by parenteral, and mucosal routes in female volunteers; MUCOVAC2, a randomized two centre study. *PLoS One*. 2016;11(5):1–18.
216. Panicker G, Ye Y, Wang D, Unger ER. Characterization of the human cervical mucous proteome. *Clin Proteomics*. 2010;6(1–2):18–28.

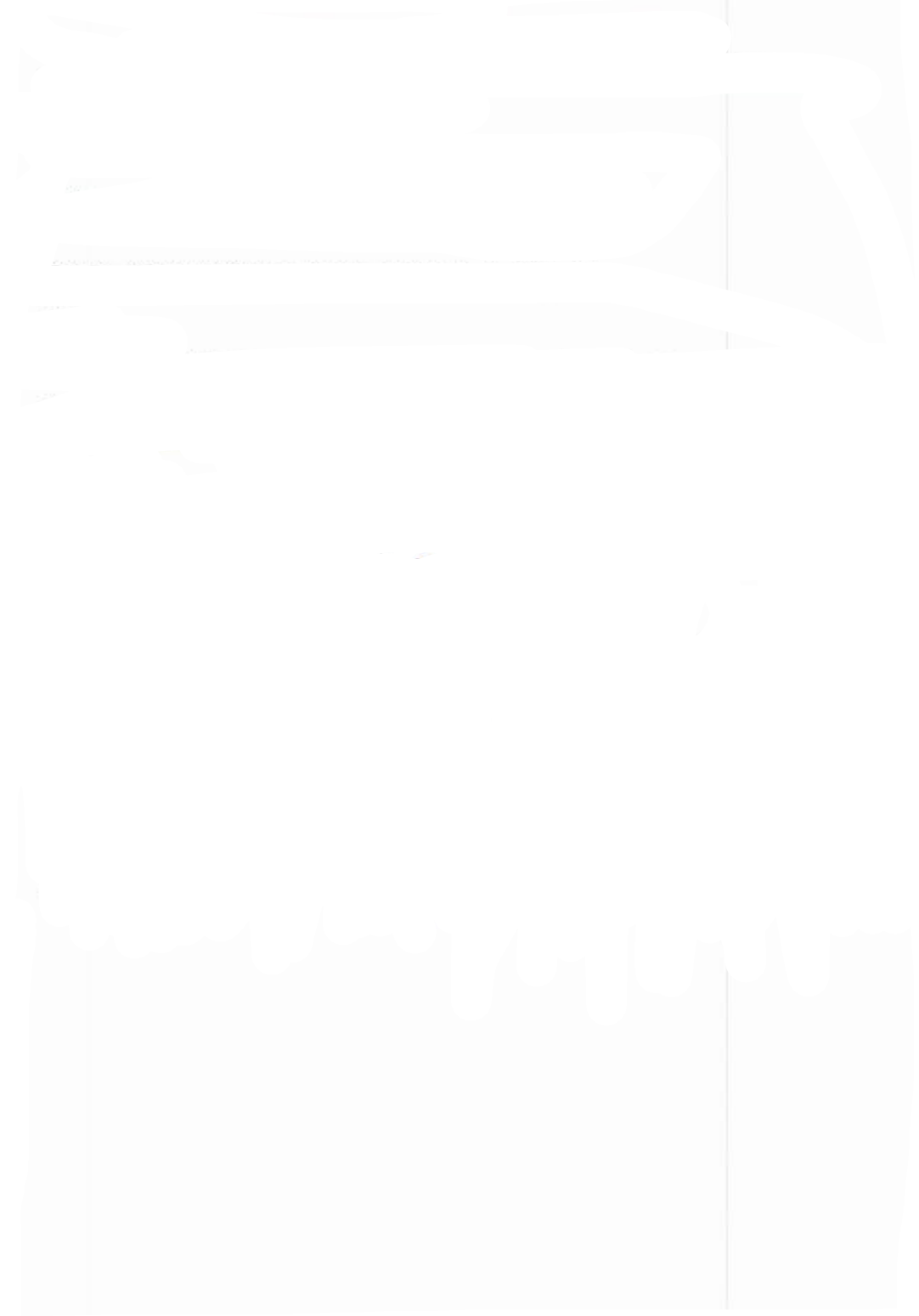
217. Berchtold MW, Villalobo A. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. Vol. 1843, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2014.
218. Chen G, Yu C, Tang Z, Liu S, An F, Zhu J, ve ark.. Metformin suppresses gastric cancer progression through calmodulin-like protein 3 secreted from tumor-associated fibroblasts. *Oncol Rep*. 2019;41(1).
219. Gorina KA, Khodzhaeva ZS, Chagovets V V., Starodubtseva NL, Frankevich VE, Pripitnevich T V. Characteristics of the organic acid profile of amniotic and cervicovaginal fluids in pregnant women at high risk for spontaneous preterm birth. *Akusherstvo i Ginekologiya (Russian Federation)*. 2022;2022(3).
220. Santesso N, Mustafa RA, Wiercioch W, Kehar R, Gandhi S, Chen Y, ve ark.. Systematic reviews and meta-analyses of benefits and harms of cryotherapy, LEEP, and cold knife conization to treat cervical intraepithelial neoplasia. Vol. 132, *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2016.
221. Roberg-Larsen H, Lund K, Seterdal KE, Solheim S, Vehus T, Solberg N, ve ark.. Mass spectrometric detection of 27-hydroxycholesterol in breast cancer exosomes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;169.
222. Jelic M, Mandic A, Kladar N, Sudji J, Bozin B, Srdjenovic B. Lipid peroxidation, antioxidative defense and level of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in cervical cancer patients. *J Med Biochem*. 2018;37(3).
223. Biasi F, Leoni V, Gamba P, Sassi K, Lizard G, Poli G. Role of 27-hydroxycholesterol and its metabolism in cancer progression: Human studies. Vol. 196, *Biochemical Pharmacology*. 2022.
224. Aryal B, Rao VA. Specific protein carbonylation in human breast cancer tissue compared to adjacent healthy epithelial tissue. *PLoS One*. 2018;13(3).
225. Liu H, Huang S. Role of oxysterol-binding protein-related proteins in malignant human tumours. *World J Clin Cases*. 2020;8(1).
226. Dent A, Diamandis P. Integrating computational pathology and proteomics to address tumor heterogeneity. Vol. 257, *Journal of Pathology*. 2022.

8 EKLER

EK 1. ATADEK - 2020/01 Etik Kurul Kararı



EK 1. ATADEK - 2020/01 Etik Kurul Kararı (devam)



EK 2. Bilgilendirilmiş Onam Formu

Bu form size uygulanacak işlemin tanımı, nasıl yapılacağı, risk durumu, işlemin sonuçları ve karşılaşılabileceğiniz olası durumlar hakkında bilgi vermektedir. Belgede yazılanlardan herhangi birini anlamakta güçlük çekerseniz lütfen hekiminize danışınız.

NOT: Çalışmaya katılan bireyler, kanser veya HPV enfeksiyonu şüphesi olanlar veya rutin jinekolojik muayene amaçlı gelen sağlıklı kişilerden oluşacaktır.

Ön Bilgiler:

- Rahim ağzı kanseri, vajina ile rahmin birleştiği halka şeklinde bir kas dokusu olan rahim ağzı (veya serviks) bölgesinde meydana gelen kanserdir. Dünya genelinde kadınlarda en sık görülen dördüncü kanser olup, yılda yaklaşık yarım milyon serviks kanseri tanısı konulmaktadır. Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı Kanser Dairesi verilerine göre, yılda ortalama 1695 kadın serviks kanseri tanısı almaktadır ve kadınlarda görülen en sık 10. kanser çeşididir.
- HPV enfeksiyonunun sebep olabildiği rahim ağzı kanseri, yavaş ilerleyen, ölüm riski düşük ve erken teşhis ile cerrahi müdahalelere dahi gerek kalmaksızın önlenabilir bir kanserdir.
- Fakat rahim ağzı kanserinin belirgin semptomları çok geç safhalarda ortaya çıkar. Bu sebeple, erken tanı son derece önemlidir. Erken tanıyı yakalayabilmek ise rutin olarak test yaptırmak ile mümkündür.
- Ülkemizde uygulanan Ulusal Servikal Kanser Tarama Programı ile kadınlarımızın rahim ağzı kanserinin azaltılması amaçlanmaktadır. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı tarafından, 2007 yılından bu yana Rahim Ağzı Kanser Taraması Programı dahilinde her 5 yılda bir 21-65 yaş arasındaki cinsel aktif kadınları kapsayan rutin smear testi uygulanmaktadır.
- Smear testi basitçe uygulanabilen, ağrısız, fakat ne yazık ki hatalı sonuç vermeye müsait bir yöntemdir. Bu test, rahim ağzından alınan sürüntü örneğindeki hücrelerin boyanıp mikroskop altında sitolojik olarak incelenmesine dayalı bir yöntem olduğundan ötürü sensitivitesi düşük (%50), yanlış negatif sonuç verme hızı ise (%15 ile %70 arasında) yüksektir. Yani gerçekte hasta olanı saptayabilme oranı düşüktür, böylece gerçekten hasta olan bir vakaya negatif sonuç verme oranı yüksektir. Bu da kanser başlangıcı olan bir hastaya sağlıklı tanısı konmasıdır yani kanserin ilerlemesi için ona zaman vermek demektir.
- Üstelik, HPV enfeksiyonlarının tamamı kansere dönüşmemekte, hatta büyük bir oranda enfeksiyonların çoğu bireyin bağışıklık sistemi tarafından bir süre içerisinde yok olmaktadır. Dolayısıyla, HPV enfeksiyonuna gereğinden fazla önem verilip panik yaratılabilmektedir.
- Bu açıdan, kadınların rutin jinekolojik kontrolleri için HPV enfeksiyonundan ziyade kanserle-ilişkili bir biyobelirteç saptanması ve bu biyobelirteç ile geliştirilecek yeni bir test ile kontrolden geçmesi faydalı olacaktır.

EK 2. Bilgilendirilmiş Onam Formu (devam)

- Dünyanın birçok yerinde bu amaç doğrultusunda klinik çalışmalar mevcuttur. Özellikle, kan veya idrardan ziyade, rahim ağzı ile direkt temasta olan ve kadın genital sisteminin organlarından salgılanan sıvıları içeren “servikovajinal sıvı”dan uygulanabilecek bir testin daha faydalı olacağı düşünülmektedir. Bununla alakalı klinik çalışmalar literatürde son 20 yıldır mevcut olup, son 5 yıldır ivme kazanmıştır. Bu sıvı, kadınların vajinal akıntısıdır ve doğal olarak sürekli salgılanmaktadır. Bu sıvının protein, metabolit veya flora içeriği ortaya çıkarılması amaçlanan çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle ABD, Avusturalya, İngiltere, Hollanda, Belçika ve Rusya’da bu çalışmalar çeşitli merkezlerce yürütülmektedir. Bu çalışmalara örnek olarak, ABD’de rahim ağzı kanserinin, eczanelerden satın alınıp evde uygulanabilecek, tıpkı hamilelik testi gibi basitçe uygulanabilir “HPV enfeksiyon testleri” geliştirilmektedir. Bu testlerin geliştirilebilmesi için, öncelikle kullanılacak belirteçlerin çok sayıda hasta ve sağlıklı bireyin örneklerinde test edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada da benzer bir amaç güdülmektedir.
- Bu çalışmada elde edilmesi planlanan örnekler ile literatürdeki klinik çalışmalarda saptanmış ve aday biyobelirteç olarak gösterilmiş moleküller test edilecektir. Alınan tüm örneklerden yapılan test sonuçlarına göre, istatistiksel olarak doğrulanan moleküller ile yeni bir rahim ağzı kanseri tarama testi geliştirilecektir.

Yapılması Planlanan İşlem:

İşlem yalnızca Pap-smear testi yapılacak bireylerde uygulanacaktır. Pap-smear testi için örnek alma işleminin hemen ardından uygulanacaktır.

Yapılması planlanan işlem, sıvı numune almadır. Numune ise servikovajinal alan sıvısı olup, herhangi bir girişimsel uygulamayı içermemektedir.

Jinekolojik muayene için litotomi pozisyonunda iken, Pap-smear testinin hemen ardından, spekulumla halihazırda açılmış olan vajinadan servikovajinal alan sıvısı, medikal amaçlar için üretilmiş olan, ucunda yüksek emici polivinil alkol köpüğü hammaddeli sünger bulunan steril çubuk (aşağıdaki resimde gösterilen) ile alınacaktır. Amaç, endoservikal bölge ve vajinal duvardan servikovajinal ortama dökülen biyolojik materyalleri (ekstraselüler salgıları) elde etmektir.

Daha önce literatürde bu işlem, Dünyanın pek çok yerinde, toplamda binlerce kadına uygulanmıştır. Rahim veya yumurtalık kanseri olan kadınlarda, rahim ağzı kanseri olan kadınlarda, CIN-2 ve CIN-3 evre kanser başlangıcı olan kadınlarda, LSIL ve HSIL evre HPV enfeksiyonlu kadınlarda, tamamen sağlıklı kadınlarda ve hatta hamile kadınlarda klinik araştırma projeleri için servikovajinal örnek alma uygulanmıştır. Riskli/ağrılı/yan etkili bir işlem değildir. Literatürde bu işlem için enjektör benzeri aparatlar ile sıvıyı aspire etme veya gazlı bez, pamuk, sünger gibi maddelerle sıvıyı emdirme yöntemi kullanılmıştır.

EK 2. Bilgilendirilmiş Onam Formu (devam)

Kullanılacak Materyal:

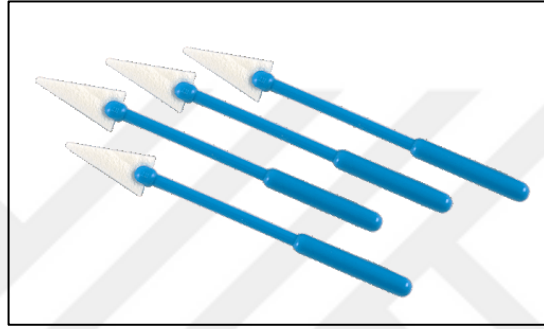
Steril, disposable, PVA köpüklü çubuk (ticari ismi: göz mızrağı / ing.: eye spears)
Ebatlar: 8 x 17 mm

Süngerin sıvı emmeden önceki kalınlığı: 1,5 mm

Süngerin sıvı emdikten sonraki kalınlığı: 3,5 mm

Marka: Cenefom

Materyal, her birey için özel olacaktır ve bir kez kullanılacaktır.



İşlemin Adımları:

İşlem, Pap-smear testi için endoservikal fırça ile sürüntü örneği alındıktan hemen sonra yapılacaktır.

1. Hasta, klasik jinekolojik muayene için, jinekolojik muayene masasına litotomi pozisyonunda yerleşir.
2. Vajinal spekulum vajinaya yerleştirilir.
3. Pap-smear test için örnek alınır.
4. Çubuk plastik kısımdan tutulup PVA süngere servikovajinal alandaki sıvı emdirilir

* Yalnızca 4. adım bu çalışma için ekstra uygulanacaktır.

Olası Yan Etki(ler):

İşlemin herhangi bir komplikasyon veya yan etkisi olmayacaktır ve ağırlı bir işlem değildir. Herhangi keskin veya sivri bir alet kullanılmayacak ve bir doku örneği alınmayacak olup yalnızca sıvının süngere emdirilmesine dayalıdır. İşlem sonrasında ilgili bölgede ağrı, acı, hassasiyet, kanama, vb durumlar beklenmemektedir.

Numune alınacak kişilerin uyması gereken koşullar:

1. Bireylerin menstrüasyon kanaması devam etmekte olmamalıdır.
2. Son 24 saat içerisinde cinsel ilişkiye girmemiş olmalıdır.
3. Son 24 saat içerisinde vajinal duş (vajenin iç bölgesini yıkama) yapılmamış olmalıdır.

EK 2. Bilgilendirilmiş Onam Formu (devam)

Bu koşullar Pap-smear testi için geçerli olan koşullardır. Bu çalışma için uygulanacak ekstra bir koşul bulunmamaktadır.

Numune alınacak kişilerin özellikleri:

1. Pap-smear testi uygulanan tüm kadınlar dahildir.
2. Pap-smear testi uygulanması için gerekli koşulların hepsi geçerlidir.
3. Gebe olmamalıdır. (Gebeliğe zarar verebilecek bir işlem olmasından değil, gebelik sırasında servikovajinal sıvıda farklı biyobelirteçlerin ortaya çıkmasından ötürü çalışmada yanıltıcı faktörlerden kaçınılması için.)

Gönüllünün Hakları

1. Gönüllü kendi hür iradesiyle çalışmaya katılmayı reddedebilir.
2. Gönüllünün çalışmaya katılmayı reddetmesinin onun gelecekteki takip ve tedavisi üzerine herhangi olumsuz bir etkisi olmayacaktır.
3. Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk, araştırmacı ve destekleyici kişi ve kurumlara aittir.
4. Bu işlemler için gönüllüden hiçbir ücret talep edilmeyecektir.
5. Bu çalışma için gönüllüye herhangi bir ücret ödenmeyecektir.
6. Gönüllünün çalışmaya katılım süreci, sadece gönüllüden servikovajinal sıvı örneğinin alınması ile sınırlıdır.
7. İsimlendirilmiş gönüllü popülasyonu esaslarında yapılacak olan çalışmada gönüllülerin kimlik bilgilerine ulaşılmayacaktır. Hasta isimleri yerine hasta numaraları kullanılarak yalnızca hekimin erişebildiği jinekolojik bulgular kaydedilecektir.
8. Gönüllülerden alınacak sıvı örneklerinden elde edilecek bilgiler, çalışmada tamamen araştırma amaçlı ve yapılan çalışmanın bilimsel dergide yayınlanması üzere kullanılacaktır.

Gönüllülüğün Hedeflenen Faydaları

Bu klinik çalışmanın amacı, rahim ağzı kanseri hastalarına tanı konulmasına ve tedavi stratejilerinin belirlenmesine yardımcı yeni bir tarama/test/analiz yöntemi geliştirmektir. Bu çalışma sayesinde nihai olarak hedeflenen, bireylerin mahrem koşullarda kendi testlerini rutin olarak kolaylıkla uygulayabilecekleri bir test geliştirerek rahim ağzı kanserine yakalanan kadın sayısını azaltmaktır.

EK 2. Bilgilendirilmiş Onam Formu (devam)

Onay:

Aşağıdaki imza ile formun içeriğini okuduğumu (veya bana okunduğunu), planlanan uygulama hakkında tarafıma ayrıntılı bilgi verildiğini, yan etki veya risklerinin olup olmadığının eksiksiz olarak anlatıldığını, istediğim takdirde soru sorma ve bilgi alma fırsatının bana sağlandığını onaylarım. Hekimim tarafından alınan numunenin bilimsel bir araştırmada kullanılacağını öğrendim. Yapılacak işlemleri kendi rızamla kabul ediyorum.

Numune alınacak kişi:

Adı - Soyadı:

Tarih:

İmza:

Bilgilendirmeyi yapan hekim:

Adı - Soyadı:

Tarih:

İmza:

EK 3. ATADEK - 2022/07 Etik Kurul Kararı



ACIBADEM
ÜNİVERSİTESİ

SAYI: ATADEK-2022/07

22.04.2022

KONU: Etik Kurul Kararı

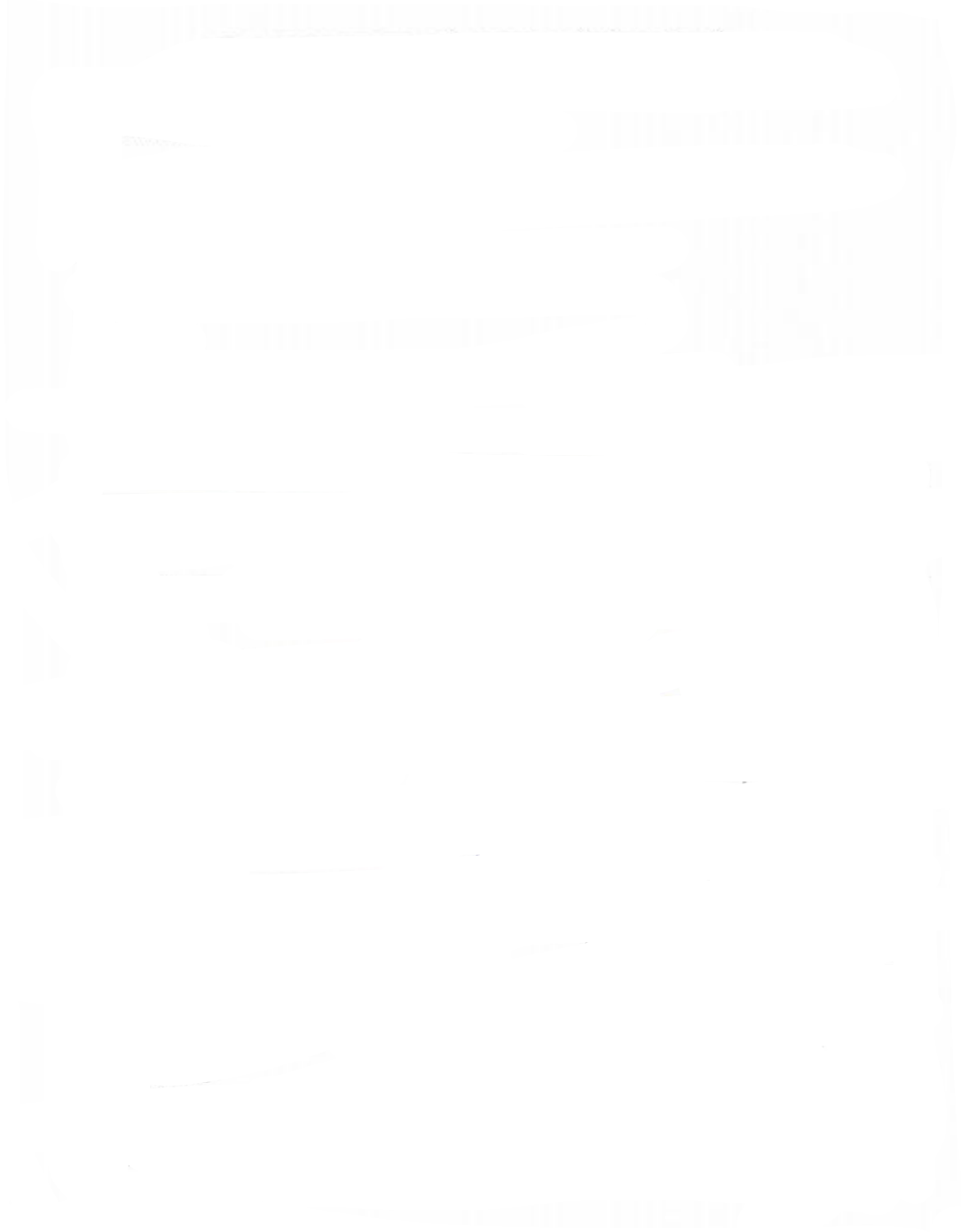
Sayın Doç. Dr. Ahmet Tank Baykal, Prof. Dr. Muhittin Serdar, Büşra Köse,

Sorumluluğunu yürüttüğünüz **“Servikal Kanserde Servikovajinal Sıvıdaki Biyolojik Belirteçler Kullanılarak Yeni Erken Tanı Yöntemlerinin Araştırılması”** başlıklı proje 22 Nisan 2022 tarih 2022/07 sayılı ATADEK toplantısında görüşülmüş olup 2022-07/23 karar numarası ile tıbbi etik yönden uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Murat BAŞ

ATADEK Başkanı

EK 3. ATADEK - 2022/07 Etik Kurul Kararı (devam)



EK 4. Bilgilendirilmiş Onam Formu

Bu form, size uygulanacak işlemin sebebi, tanımı, nasıl yapılacağı, risk durumu, işlemin sonuçları ve karşılaşılabileceğiniz olası durumlar hakkında bilgi vermektedir. Belgede yazılanlardan herhangi birini anlamakta zorluk çekerseniz lütfen hekiminize danışınız.

NOT: Bu çalışmaya katılan bireyler servikal kanser, servikal neoplazi veya lezyonu olan yahut sadece HPV enfeksiyonu şüphesi olanlar veya tedavi sonrası takip amaçlı jinekolojik muayene amaçlı gelen kişilerden oluşacaktır. Bu çalışmada alınacak biyolojik örnek servikovajinal salgı sıvısıdır, ağırlı, kanamalı yahut girişimsel bir yöntem içermemekle beraber, dokulardan halihazırda salgılanmış olan mukozal serbest sıvının çekilmesini kapsamaktadır. Örnek, yalnızca kolposkopi prosedürü uygulanacak bireylerden, olağan kolposkopi prosedürünün ilk adımı olan serviks yüzeyini izotonik solüsyon ile yıkama aşamasında, steril plastik 3 mililitrelik Pastör pipeti ile alınacaktır.

A. Çalışma ile Alakalı Ön Bilgiler:

1. Rahim ağzı kanseri, vajina ile rahmin birleştiği halka şeklinde bir kas dokusu olan rahim ağzı (veya serviks) bölgesinde meydana gelen kanserdir. Dünya genelinde kadınlarda en sık görülen dördüncü kanser olup, yılda yaklaşık yarım milyon serviks kanseri tanısı konulmaktadır. Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı Kanser Dairesi verilerine göre, yılda ortalama 1695 kadın serviks kanseri tanısı almaktadır ve kadınlarda görülen en sık 10. kanser çeşididir. HPV enfeksiyonunun sebep olduğu rahim ağzı kanseri, yavaş ilerleyen, ölüm riski düşük ve erken teşhis ile cerrahi müdahalelere dahi gerek kalmaksızın önlenabilir bir kanserdir. Fakat rahim ağzı kanserinin belirgin semptomları çok geç safhalarda ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple, erken tanı son derece önemlidir. Erken evrede yakalayabilmek ise ancak rutin olarak muayene ve kanser taraması yaptırmak ile mümkündür.
2. Ülkemizde uygulanan Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezi (KETEM) tarafından takip edilen Ulusal Servikal Kanser Tarama Programı ile ülkemizdeki kadınların rahim ağzı kanserinin azaltılması amaçlanmaktadır. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı tarafından, 2007 yılından bu yana Rahim Ağzı Kanser Taraması Programı dahilinde her 5 yılda bir 21-65 yaş arasındaki cinsel-aktif kadınları kapsayan rutin smear testi uygulanmaktadır.
3. Smear testi basitçe uygulanabilen, ağrısız, fakat ne yazık ki hatalı sonuç vermeye müsait bir yöntemdir. Bu test, rahim ağzındaki dokudan bir fırça ile alınan sürüntü örneğindeki hücrelerin boyanıp mikroskop altında sitolojik olarak incelenmesine dayalı bir yöntem olduğundan ötürü sensitivitesi düşük (%50), yanlış negatif sonuç verme hızı ise (%15 ile %70 arasında) yüksektir. Üstelik, HPV enfeksiyonlarının tamamı kansere dönüşmemektedir, hatta enfeksiyonların çoğu bireyin bağışıklık sistemi tarafından bir süre içerisinde yok olmaktadır. Zira, Dünya üzerindeki insanların %80'i 50 yaşına gelene dek en az bir kez HPV enfeksiyonu geçirmektedir. Dolayısıyla, HPV enfeksiyonuna

EK 4. Bilgilendirilmiş Onam Formu (devam)

gereğinden fazla önem verilip panik yaratılabilmektedir. Bu açıdan, kadınların rutin jinekolojik kontrolleri için HPV enfeksiyonundan ziyade, kanser riskini ölçekleyecek bir test ihtiyacı mevcuttur. Henüz neoplazi evrelerinde ortaya çıkan, kanserle-ilişkili bir biyobelirteç saptanması ve bireylerin bu biyobelirteç ile geliştirilecek yeni bir test ile sık sık ve düzenli olarak kontrolden geçmesi faydalı olacaktır.

4. Smear testinin sonucuna göre hekim tarafından gerekli görüldüğü takdirde başvurulmuş kolposkopi ise doktorun rahim ağzını incelemesine olanak veren ve girişimsel olmayan bir yöntemdir. Görüntüyü 40 kata kadar büyütme özelliği olan kolposkop adı verilen dürbün benzeri ışıklı bir aletle serviksi daha net görüntüleyerek değerlendirme işlemidir. Kolposkopi işlemi esnasında şüpheli bir bölgenin görülmesi halinde biyopsi örneği alınarak şüpheli bölgenin histopatolojik olarak incelenmesine imkân sağlanır. Bu çalışmada referans alınacak tanı yöntemi kolposkopik görüntüleme ve kolposkopik biyopsi sonucudur. Örnek grupları bunların sonuçlarına göre klasifiye edilecektir.
5. Dünyanın pek çok yerinde servikal kanserin erken tanısı için yeni bir alternatif örneklemme yöntemi veya tarama yöntemi geliştirmek üzerine klinik çalışmalar mevcuttur. Özellikle, kan veya idrardan ziyade, rahim ağzı ile direkt temasta olan ve kadın genital sisteminin dokularından salgılanan sıvıları içeren servikovajinal sıvıdan uygulanabilecek bir testin daha faydalı olacağı düşünülmektedir. Literatürde bu doğrultudaki çalışmalar özellikle son 5 yıldır ivme kazanmıştır. Bu sıvı, kadınların olağan vajinal akıntısıdır ve doğal olarak sürekli olarak bölgesel dokulardan salgılanmaktadır. Bu sıvının protein, metabolit veya floral içeriği ortaya çıkarılması amaçlanan çalışmalar yürütülmüştür ve halen gelişen kütle spektrometresi yöntemleri ile ileri çalışmalar yapılarak gündemdeki yerini korumaktadır.
6. Smear testi yerine önerilen yeni yöntemlere emsal olarak, ABD’de rahim ağzı kanserinin, eczanelerden satın alınıp evde uygulanabilecek, tıpkı hamilelik testi gibi basitçe uygulanabilir “HPV enfeksiyon testleri” geliştirilmektedir. Üstelik, smear yöntemi kadınlar için rahatsız edici, doku tahribatı oluşturan, üstelik bu yüzden de testin kısa aralıklarla tekrarlanmasını imkansız kılan bir yöntemdir, oysaki servikovajinal sıvının kullanımı bu sorunu da ortadan kaldırmaktadır. Yapılan sistematik derleme ve anket çalışmalarına göre, kadınların büyük oranda bu alternatif çalışmaları smear testine tercih edecekleri saptanmıştır.
7. Bu çalışmada elde edilmesi planlanan örnekler ile servikovajinal sıvının sağlıklı (negatif kontrol) bireyler ve servikal neoplazi aşamalarında olan bireyler arasındaki moleküler içerik farklılıkları analiz edilecektir. Örneklerin bir kısmı okside ve sülfatlanmış lipidler açısından incelenecek iken diğer kısmı protein içeriği açısından incelenecektir. Alınan tüm örneklerden yapılan laboratuvar test sonuçlarına göre, istatistiksel olarak doğrulanan moleküller ile yeni bir rahim ağzı kanseri tarama testi geliştirilmesi mümkün olabilecektir.

EK 4. Bilgilendirilmiş Onam Formu (devam)

B. Yapılması Planlanan İşlem:

1. İşlem, yalnızca halihazırda kolposkopi testi yapılacak bireyler için geçerlidir.
2. Yapılması planlanan işlem, bireyden sıvı numune alma işlemidir. Numune ise servikovajinal alandan salgılanan mukozal sıvı olup, herhangi bir girişimsel uygulamayı içermemektedir.
3. Örnek almada kullanılacak materyal steril, tek kullanımlık, yumuşak plastik 3 mililitre hacimli Pastör pipetidir. Materyal, her birey için özel olacaktır ve bir kez kullanılıp atılacaktır. Alınan örnek (en fazla 3 mililitre), içerisinde örnek koruyucu solüsyon içeren santrifüj tüpüne aktarılıp uygun koşulda saklanmak üzere derin dondurucuda dondurulacaktır.
4. Jinekolojik muayene için litotomi pozisyonunda ve spekulumla halihazırda açılmış olan vajinadan, olağan kolposkopi prosedürünün ilk adımı olan serviks yüzeyini izotonik solüsyon ile yıkama aşamasında, medikal amaçlar için üretilmiş olan Pastör pipeti vasıtasıyla, izotonik salin ile karışmış olan servikovajinal salgı sıvısı lavaj aspirasyonu ile alınacaktır.
5. Amaç, endoservikal bölge ve vajinal duvardan servikovajinal alana dökülen biyolojik materyalleri (ekstraselüler salgıları) elde etmektir.
6. Daha önce literatürde bu işlem, Dünyanın pek çok yerinde binlerce kadına uygulanmıştır. Rahim veya yumurtalık kanseri olan kadınlarda, rahim ağzı kanseri olan kadınlarda, CIN-2 ve CIN-3 evre kanser başlangıcı olan kadınlarda, LSIL ve HSIL evre HPV enfeksiyonlu kadınlarda, tamamen sağlıklı kadınlarda ve hatta gebe kadınlarda klinik araştırma projeleri için servikovajinal örnek alma uygulanmıştır. Riskli/ağrılı/yan etkili/kanamalı bir işlem değildir. Literatürde de bu işlem için Pastör pipeti, plastik enjektör, burun aspiratörü benzeri aparatlar ile sıvıyı aspire etme şeklinde yahut gazlı bez, pamuk, sünger, tampon gibi maddelerle sıvıyı emdirme şeklinde yöntemler kullanılmıştır.

C. İşlemin Adımları:

İşlem, Pap-smear testi için endoservikal fırça ile sürüntü örneği alındıktan hemen sonra yapılacaktır.

1. Hasta, jinekolojik muayene için jinekolojik muayene masasına litotomi pozisyonunda alınır
2. Vajinal spekulum vajinaya yerleştirilir
3. Endoservikal yüzey izotonik salin çözeltisi ile yıkanır
4. Pastör pipeti ile bu yıkama çekilir
5. Çekilen sıvı saklanmak üzere tüpe alınır

EK 4. Bilgilendirilmiş Onam Formu (devam)

D. Olası Yan Etki(ler):

İşlemin herhangi bir komplikasyon veya yan etkisi olmayacaktır ve ağırlı bir işlem değildir. Herhangi keskin veya sivri bir alet kullanılmayacak ve bir doku örneği alınmayacak olup yalnızca sıvının süngere emdirilmesine dayalıdır. İşlem sonrasında ilgili bölgede ağrı, acı, hassasiyet, kanama, vb durumlar beklenmemektedir.

E. Örneklerin Analiz Edilmesi ve Ek Bilgiler

Örnekler, bir takım kimyasal işlemlere tabi tutularak hazırlanacak ve kütle spektrometresi cihazları ile analiz edilecektir. Bu cihazlardan elde edilen moleküler tanımlama verilerine göre örneklerdeki belirteçler saptanacaktır. Örnekler, yurt içi ve yurt dışındaki araştırma laboratuvarlarında çalışılacaktır. Yurt dışına gönderilecek örnekler için Sağlık Bakanlığının mevzuatına uygun biçimde gerekli yönetmelikler izlenecektir.

F. Dışlama Kriterleri / Numune Alınacak Kişilerin Uyması Gereken Koşullar*:

1. Bireylerin olağan menstrüasyon kanaması yahut olağan dışı bir kanaması olmamalıdır.
2. Son 24 saat içerisinde korunmasız cinsel ilişkiye girmemiş olmalıdır.
3. Son 24 saat içerisinde vajinal duş (vajenin içini yıkama) yapılmamış olmalıdır.
4. Son 24 saat içerisinde vajina içine ilaç, krem, vb gibi uygulamalar yapılmamış olmalıdır.
5. Total histerektomi geçirmiş bireylerden örnek alınmaz.
6. Gebelerden örnek alınmaz (gebelikle ilgili salgılanan farklı moleküller içeriği etkileyebileceği için).
7. Post-menopozal, 70 yaşından büyük ve son 10 yıl içerisinde ard arda 3 tane negatif smear testi sonucu olan bireylerden örnek alınmaz.

* *Bu koşullar, mevcut yönergelerde Pap-smear testi ve/veya kolposkopi yapılabilmesi için belirlenmiş geçerli olan koşullardır.*

G. Gönüllünün Hakları

1. Gönüllü kendi hür iradesiyle çalışmaya katılmayı reddedebilir.
2. Gönüllünün çalışmaya katılmayı reddetmesinin onun hekimi ile iletişimine yahut gelecekteki takip ve tedavisi üzerine herhangi olumsuz bir etkisi olmayacaktır.
3. Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk, araştırıcı ve destekleyici kişi ve kurumlara aittir.
4. Bu işlemler için gönüllüden hiçbir ücret talep edilmeyecektir.
5. Bu çalışma için gönüllüye herhangi bir ücret ödenmeyecektir.
6. Gönüllünün çalışmaya katılım süreci, sadece gönüllüden servikovajinal sıvı örneğinin alınması ile sınırlıdır.

EK 4. Bilgilendirilmiş Onam Formu (devam)

7. İsimlendirilmiş gönüllü popülasyonu esaslarında yapılacak olan bu çalışmada, gönüllülerin kimlik bilgilerine ulaşılmayacaktır. Hasta isimleri yerine hasta numaraları kullanılarak bir kodlama yöntemi ile jinekolojik bulgular yalnızca çalışmada yer alan hekim ve araştırmacıların erişebileceği şekilde kaydedilecektir.
8. Gönüllülerden alınacak sıvı örneklerinden elde edilecek bilgiler yalnızca araştırma amaçlı ve yapılan çalışmanın bilimsel dergide yayınlanması üzere kullanılacaktır.

H Gönüllülüğün Hedeflenen Faydaları

Bu klinik çalışmanın amacı, rahim ağzı kanseri hastalarına tanı konulmasına ve tedavi stratejilerinin belirlenmesine yardımcı yeni bir tarama/test/analiz yöntemi geliştirmektir. Bu çalışma sayesinde nihai olarak hedeflenen, servikal kanserin erken tanısı için alternatif bir test geliştirerek rahim ağzı kanserine yakalanan kadın sayısını azaltmaktır.

ONAY:

Aşağıdaki imza ile formun içeriğini okuduğumu (veya bana okunduğunu), planlanan uygulama hakkında tarafıma ayrıntılı ve eksiksiz bilgi verildiğini, istediğim takdirde soru sorma ve bilgi alma fırsatının bana sağlandığını onaylarım. Hekimim tarafından alınan numunenin bilimsel bir araştırmada kullanılacağını öğrendim. Yapılacak işlemi kendi rızamla kabul ediyorum.

NUMUNE ALINACAK GÖNÜLLÜ KİŞİ:

ADI - SOYADI:

TARİH:

İMZA:

BİLGİLENDİRMEYİ YAPAN HEKİM:

ADI - SOYADI:

TARİH:

İMZA: