

# Serviks Dokularında HPV DNA Pozitifliği ve Osteopontin Düzeyi Arasındaki İlişkinin Araştırılması<sup>§</sup>

## Investigation of the Relationship Between HPV DNA Positivity and Osteopontin Levels in Cervical Tissue

Esra Tuba Demir\*, \*\*, Merve Aydın Terzioğlu\*\*, \*\*\*, Mehmet Kulhan\*\*\*\*, Aytekin Çıkman\*\*\*\*, Barış Gülhan\*\*, Nur Gözde Kulhan\*\*\*\*, İlyas Sayar\*\*\*\*, Yusuf Kemal Arslan\*\*\*\*, Cuma Mertoğlu\*\*\*\*

\* Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Anestezi Programı, Erzincan, Türkiye  
\*\* Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye  
\*\*\* KTO Karatay Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye  
\*\*\*\* Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Konya, Türkiye  
\*\*\*\*\* Gözde İzmir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir, Türkiye  
\*\*\*\*\* Konya Şehir Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Konya, Türkiye  
\*\*\*\*\* Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye  
\*\*\*\*\* Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoistatistik Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye  
\*\*\*\*\* Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye

**Atf/Cite as:** Demir ET, Aydın Terzioğlu M, Kulhan M, ve ark. Serviks dokularında HPV DNA pozitifliği ve osteopontin düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2022;52(1):30-38.

### Öz

**Amaç:** Çalışmamızda, HPV pozitif ve HPV negatif serviks dokularında osteopontin düzeyinin araştırılması, prognostik bir biyobelirteç olarak tanıda klinik öneminin değerlendirilmesi amaçlandı.

**Yöntem:** Haziran 2015-Nisan 2017 tarihleri arasında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne başvuran ve serviks kanseri taramasına katılan 82 kişi çalışmaya alındı. Servikovajinal sürüntü örnekleri, standart işlem prosedürüne göre toplandı. Geleneksel Pap sitolojisi için slayt hazırlanarak, standart protokollere göre boyandı ve sonuçlar 2004 Bethesda sınıflandırma sistemine göre derecelendirildi. Digene konik fırça örnekleyicisi ile serviksten örnek alındı. Tüm servikal örnekler, Digene® HC2 High-Risk HPV DNA Kiti ile analiz edildi. HPV DNA pozitifliği saptanan örnekler CLART kit ile genotipleme yapıldı. 41 HPV pozitif hasta ve 41 HPV negatif kontrolün doku örneklerinde osteopontin düzeyleri ELISA kiti ile araştırıldı.

**Bulgular:** Osteopontin düzeyleri hasta grubunda 31.55±7.11 ng/ml, kontrol grubunda ise 28.81±5.44 ng/ml olarak saptandı. Hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0.048). Osteopontin düzeyi ile yaş, doğum şekli, hastalık öyküsü, operasyon yöntemi, HPV tipi, preoperatif ve postoperatif patoloji, gravida ve parite arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05).

**Sonuç:** Çalışmamızda, HPV pozitif 41 hastadan yalnızca 5'inde servikal intraepitelyal neoplazi saptanması çalışmamızın kısıtlayıcı yanını oluşturmaktadır. Osteopontin düzeyi, HPV pozitif hastalarda yüksek bulunmasına rağmen, daha geniş sayıda servikal intraepitelyal neoplazi olguları üzerinde yapılacak olan çalışmalara gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** ELISA, İnsan Papilloma Virüsü (HPV), osteopontin, serviks kanseri

### ABSTRACT

**Objective:** This study aimed to investigate the osteopontin levels in HPV-positive and HPV-negative cervical tissues and evaluate the clinical significance of osteopontin as a prognostic biomarker.

**Methods:** A total of 82 individuals admitted to the outpatient clinic of Obstetrics and Gynecology Department of Erzincan Binali Yıldırım University, Mengücek Gazi Training and Research Hospital in Turkey and underwent cervical cancer screening between June 2015 and April 2017 were included in the study. Cervicovaginal swabs were collected according to the standard procedure. A slide for traditional Pap cytology was prepared and stained according to standard protocols, and the results were categorized according to the 2004 Bethesda classification system. All cervical specimens were analyzed using the Digene® HC2 High-Risk HPV DNA Kit. Genotyping was performed on the samples with HPV DNA positivity with the Clark kit. Osteopontin levels of 41 HPV positive patients and 41 HPV negative control were investigated in tissue samples with an ELISA kit.

**Results:** The osteopontin levels were found to be 31.55 ± 7.11 ng/ml and 28.81 ± 5.44 ng/ml in the study and control groups, respectively, which indicated a statistically significant difference between the groups (p=0.048). There was no statistically significant difference between the osteopontin level and age, delivery method, history of disease, surgical method, HPV type, preoperative and postoperative pathology, gravida and parity (p>0.05).

**Conclusion:** The detection of cervical intraepithelial neoplasia in only five of 41 HPV-positive patients constitutes a limitation for this study. Although the level of osteopontin was high in HPV-positive patients, further studies with more cervical intraepithelial neoplasia cases are required.

**Keywords:** ELISA, Human Papilloma Virus (HPV), osteopontin, cervical cancer

**Alındığı tarih / Received:**  
26.03.2021 / 26.March.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
15.09.2021 / 15.September.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
31.03.2022 / 31.March.2022

### ORCID Kayıtları

E. T. Demir 0000-0003-3491-9798  
M. Aydın Terzioğlu 0000-0002-1522-6083  
M. Kulhan 0000-0002-5478-7510  
A. Çıkman 0000-0001-9259-7091  
B. Gülhan 0000-0002-2605-1282  
N. G. Kulhan 0000-0002-7463-9101  
İ. Sayar 0000-0002-7204-4112  
Y. K. Arslan 0000-0003-1308-8569  
C. Mertoğlu 0000-0003-3497-4092

✉ merve.aydin@karatay.edu.tr

<sup>§</sup> Bu çalışma, Doç. Dr. Merve AYDIN TERZIOĞLU'nun danışmanlığında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi'nde Tıbbi Mikrobiyoloji yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Bu araştırma, 22-24 Mart 2018 tarihleri arasında İzmir'de düzenlenen 2. Ulusal Viroloji Günleri'nde, poster bildirisi olarak sunulmuştur.

## GİRİŞ

İnsan papilloma virusu (HPV), Papillomaviridae ailesine ait, 7900 bp uzunluğunda dairesel çift sarmallı DNA'dan oluşan, ikozahedral kapsidli zarfsız DNA virüsüdür<sup>(1,2)</sup>. Bugüne kadar, 200'den fazla insan papilloma virüs genotipi karakterize edilmiştir<sup>(3)</sup>. Epidemiyolojik ve biyolojik verilere dayanarak, Alfapapillomavirus cinsinde yer alan 12 mukozal HPV tipi "Yüksek Riskli (HR) HPV tipleri" karsinojenik (IARC Grup 1) (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 ve 59) ve diğer sekiz HPV türü (HPV26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 ve 82) ise "Muhtemelen Karsinojenik" (IARC Groups 2A ve 2B) olarak sınıflandırılmıştır<sup>(2-4)</sup>. HR HPV tipleri, başta rahim ağzı kanseri olmak üzere vajina, vulva, anus, penis ve orofaringeal kanser gibi çeşitli kanserlerin etiyolojik ajanlarıdır. HPV16 ve 18, servikal kanserlerin yaklaşık %70'inden sorumludur<sup>(4,5)</sup>. "Düşük riskli HPV tipleri" olarak sınıflandırılan 11 farklı HPV tipi ise (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) esas olarak genital siğiller ve iyi huylu servikal lezyonlarla ilişkilidir<sup>(6)</sup>.

Cinsel olarak aktif bireylerin çoğu, yaşamları boyunca bir noktada HPV ile karşılaşır. Çoğu HPV enfeksiyonu (~%90) asemptomatiktir ve 8 ay içinde aktif bağışıklık yanıtı ile temizlenir. HPV enfeksiyonlarının %10'u persiste kalır, enfeksiyonun onkojenik HPV tipine bağlı olması durumunda %3'ten azı epitelyal displazi veya %1'i invaziv serviks kanseri ile sonuçlanır<sup>(3,7,8)</sup>.

Rahim ağzı kanseri, 2018 yılında tüm kadın kanserlerinin %6.6'sını temsil eden tahmini 570.000 yeni olgu ve 311.000 ölüm ile kadınlarda dördüncü en sık görülen kanserdir<sup>(9,10)</sup>. Yüksek riskli insan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu rahim ağzı kanserinin gelişmesi için gerekli bir faktör olarak kabul edilmiştir<sup>(3)</sup>. Bununla birlikte, yalnızca yüksek riskli HPV ile enfeksiyon, rahim ağzı kanserine progresyon için yeterli değildir. Servikal karsinogenez, konak hücre genlerinde DNA değişikliklerinin birikimi ile bağlantılı çok aşamalı bir prosestir. Bu değişiklikler, hücre döngüsü ilerlemesinin, kromozomal stabilitenin, telomer aktivasyonunun ve apoptozun kritik düzenleyicileri olan onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde hem epigenetik hem

de genetik değişiklikleri içerir. Ancak, tümörjenezis başlangıcı için HPV DNA'nın konak hücre genomuna entegrasyonu, HPV aracılı karsinogenezde anormal proliferasyona ve malign progresyona yol açan kilit bir olaydır<sup>(6,11,12)</sup>.

Osteopontin (OPN), moleküler ağırlığı yaklaşık 44 kDa olan, osteoblastlar, osteositler, T, B, NK ve NKT lenfositleri, miyeloid hücreler, endotel hücreleri, epitel hücreleri ve nöronlar dâhil olmak üzere çeşitli hücreler tarafından üretilen çok fonksiyonlu bir fosfoglikoproteindir<sup>(13,14)</sup>. OPN, ilk kez 1979'da Senger ve ark. tarafından epitel hücrelerinin transformasyonunun bir belirteci (marker) olarak tanımlanmıştır<sup>(15,16)</sup>.

Osteopontin kemik ve kemik matrisinin yeniden modellenmesi, anjiyogenez, karsinogenez, inflamasyon ve otoimmünite gibi birçok fizyolojik ve patolojik olaya katılır<sup>(13,14,17)</sup>. Ek olarak, OPN hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemlerini düzenler. Yardımcı T hücre 1 sitokinlerine benzer şekilde çalışan OPN, hücre aracılı bir bağışık yanıtı uyarır. Ayrıca, sitokin üretimini kontrol eder ve bağışıklık sistemi içindeki gen ekspresyonunu düzenlemek için hücre içi yolları aktive edebilir. Osteopontin, yalnızca integrinler aracılığıyla hücrelerle değil, aynı zamanda hücre içi bir etkileşimi içeren CD44 aracılığıyla da iletişim kurar<sup>(13,18-20)</sup>.

Osteopontin akciğer, prostat, meme, kolorektal ve karaciğer kanseri dahil olmak üzere birçok kanserde aşırı eksprese edildiğinden ve doku yeniden modelleme, hücre göçü ve inflamasyondaki fonksiyonlarından dolayı protumorijenik ve premetastatik bir faktör olarak kabul edilmektedir<sup>(14,21)</sup>. Bununla birlikte, serviks dokusunda ve rahim ağzı kanserinde osteopontin ekspresyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır<sup>(22-25)</sup>. Çalışmamızda, HPV pozitif ve HPV negatif serviks dokularında OPN düzeyinin araştırılmasıyla prognostik bir biyobelirteç olarak tanıda klinik öneminin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Erzincan Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (22.03.2017 tarih ve 2/02 kayıt numarası) onaylanmıştır.

Bu çalışma, Haziran 2015-Nisan 2017 tarihleri arasında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne başvuran ve serviks kanseri taramasına katılma isteğini belirten 82 kadın hasta üzerinde yapıldı. Geçmiş veya mevcut cinsel aktivite öyküsü olan, total uterus veya servikal rezeksiyon öyküsü olmayan, işlem sırasında gebe olmayan, HPV testi yapılmasını kabul eden kadınlar çalışmaya dâhil edildi. Örneklerin toplanması için yazılı bilgilendirilmiş onam doğrudan tüm hastalardan ve kontrol grubundan alındı. Tüm katılımcılardan yaş, evlilik, iş, gravidite, aile öyküsü, obstetrik öykü, önceki operasyonlar gibi sosyodemografik ve üreme özelliklerine yönelik kısa bir anket doldurmaları istendi. Anketi tamamlamak için yüz yüze görüşme yöntemi kullanıldı.

Tüm katılımcılardan servikovajinal sürüntü örnekleri, standart işlem prosedürüne göre jinekolog tarafından toplandı. Geleneksel Pap sitolojisi için bir slayt hazırlandı. Slaytlar, standart protokollere göre boyandı ve bir sitopatolog tarafından gözden geçirildi ve sonuçlar 2004 Bethesda Sınıflandırma Sistemine göre derecelendirildi. Sitolojik sınıflandırma şu şekilde yapıldı: (1) normal sınırlar içinde veya reaktif hücresel değişiklikler (normal), (2) atipik skuamöz hücreler (a) önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücreler (ASC-US), (b) düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LSIL), (c) yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL).

Pap smearin toplanmasından sonra, Digene® konik fırça örnekleyicisi (Qiagen, Gaithersburg, MD, ABD) servikal os içine konarak 360° üç kez döndürüldü, çıkarıldı ve 1 ml Digene Standart Taşıma (STM) ortamı içine yerleştirildi (Qiagen, Gaithersburg, MD, ABD). Örnekler oda ısısında transfer edildi. Tüm servikal örnekler, 13 yüksek riskli HPV tipini (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68)

kalitatif saptayabilen nükleik asit hibridizasyon temelli Digene® HC2 High-Risk HPV DNA Kiti (Qiagen, Gaithersburg, MD, ABD) ile üretici firma önerileri doğrultusunda analiz edildi. RLU/Kesme Noktası Değeri Oranları  $\geq 1$  olan örnekler pozitif kabul edildi. RLU/Kesme Noktası Değeri Oranları  $\geq 1$  ve  $< 2.5$  olan örnekler tekrarlandı. RLU/Kesme Noktası Değeri Oranları  $< 1$  olan örnekler ise negatif olarak kabul edildi. Digene® HC2 High-Risk HPV DNA Kiti ile HPV DNA pozitifliği saptanan örnekler 13'ü yüksek riskli olmak üzere 35 HPV genotipini saptanan CLART kit (Genomica, SAU, İspanya) ile genotipleme yapıldı.

Herhangi bir HPV tipi pozitif olan tüm kadınlara kolposkopi, endoservikal kürtaj ve servikal biyopsi yapıldı. Biyopsi sonucunda HSIL veya daha yüksek bir lezyon saptanırsa LEEP ya da TAH-BSO yapıldı. Benign jinekolojik nedenlerle (over kisti, kronik pelvik ağrı, myom, endometriozis vb.) opere edilen, servikal lezyonu olmayan ve HPV negatif hastalardan bir kontrol grubu oluşturuldu. HPV pozitif ve negatif servikal doku örnekleri histopatolojik inceleme için patoloji laboratuvarına gönderildi. Biyopsi örnekleri, formaldehit ile belirlendi, parafine gömüldü ve patoloji laboratuvarında histopatoloji için hematoksilen-eozin ile boyandı. Patoloji sonuçları, servikal lezyon sınıflandırma kriterlerine göre servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) 1-2-3 ve invaziv servikal kanser olarak sınıflandırıldı. Aynı zamanda HPV pozitif ve negatif servikal doku örnekleri PBS'e alınarak osteopontin düzeylerinin incelenmesi için Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderildi.

Dokular soğuk 1xPBS (pH=7.2-7.4) içinde yıkandı. Homojenizasyondan önce tartılarak küçük parçalara ayrıldı. Soğuk 1xPBS (pH=7.2-7.4) içinde homojenize edildikten sonra dondurma-çözdürme döngülerine tabi tutuldu. Homojenatlar 5000xg'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant alıkotlandı ve ELISA testi yapılabildi kadar -20°C'de saklandı.

Doku osteopontin düzeyleri, insan Osteopontin ELISA kiti (Hangzhou Eastbiopharm Co. Ltd, Çin) ile üretici firma önerileri doğrultusunda araştırıldı. Kit içerisinden çıkan standart sulandırılarak,

3-96 ng/ml aralığında hazırlandı. Standartların ve örneklerin absorbanları Epoch spektrofotometre (BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, ABD) kullanılarak 450 nm dalga boyunda (540 nm veya 570 nm düzeltme) okutuldu. Osteopontin düzeyini belirlemek için standart eğri x ekseninde standart konsantrasyon ve y ekseninde absorban olacak şekilde oluşturuldu. Her örnek çift çalışıldı.

Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS 19 (IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp) kullanıldı. Sürekli değişkenler ortalama±standart sapma ve medyan (maksimum-minimum), kategorik değişkenler ise n (%) olarak belirtildi. Çok düşük n'e sahip bazı durumlarda (n<3) p değeri sunulamadı. İki grup arasındaki farklılıklar değerlendirilmek istendiğinde parametrik test ön şartlarının sağlandığı durumda "Student's t Test", sağlanmadığında ise "Mann Whitney-U testi" kullanıldı. Üç veya daha fazla grup karşılaştırması yapılırken Tek Yönlü Varyans Analizi, parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise Kruskal Wallis testleri kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmaya 41 (%50) HPV pozitif hasta ve 41 (%50) HPV negatif sağlıklı kontrol olmak üzere 82 kişi dâhil edildi. HPV pozitif hastaların yaş ortalaması 43.88±9.2, HPV negatif kontrollerin ise 49.63±10.3 olarak bulundu. Hasta grubunda, 35 yaş üzeri için OPN değeri ortalaması 31.5±7.2 iken, 35 yaş ve altı için 31.8±6.4 idi. Kontrol grubunda 35 yaş ve üzeri için OPN değeri ortalaması 28.8±5.6 iken, 35 yaş ve altı için 28.2±3.8 idi. Hasta ve kontrol gruplarında 35 yaş ve üzeri ve 35 yaş altı OPN değerleri istatistiksel olarak benzer bulundu (sırasıyla p=0.282, p=0.095) (Tablo 2).

Osteopontin düzeyleri HPV pozitif hasta grubunda 31.6±7.1 ng/ml, HPV negatif kontrol grubunda ise 28.8±5.4 ng/ml olarak saptandı. Hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (p=0.048) (Tablo 1).

HPV pozitif 41 hastanın 28'inde (%68.3) yüksek riskli HPV tipi saptanırken, 13'ünde (%31.7) ise diğer HPV tipleri saptandı. Yirmi sekiz hastanın 18'inde (%64.3) HPV-16, ikisinde (%7.1) HPV-18, ikisinde (%7.1) HPV-33, birinde (%3.6) HPV-39, birinde (%3.6) HPV-45, üçünde (%10.7) HPV-51 ve birinde (%3.6) ise HPV-52 saptandı.

Yüksek riskli HPV saptanan hastalarda OPN değeri ortalaması 32.4±7.7 bulunurken, diğer HPV tipi pozitifliği saptananlarda ise 29.5±5.2 olarak bulundu. HPV tipi ile OPN değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.220) (Tablo 1).

Ev hanımı ve çalışanlar arasında OPN değerleri istatistiksel olarak benzer bulundu (p=0.950) (Tablo 1). HPV pozitif hasta ve kontrol gruplarında ev hanımlarının OPN ortalama değeri istatistiksel olarak benzer bulunurken (p=0.274), çalışanların OPN ortalama değeri ise istatistiksel olarak farklı bulundu (p=0.029) (Tablo 2).

Hasta grubunun tamamı doğum yapmışken, kontrol grubunda ise bir kişi doğum yapmamıştır. Doğum yapan 81 kişiden 62'si normal doğum (%76.5), 19'u (%23.5) ise sezaryen doğum yapmıştır. Normal ve sezaryen doğum arasında OPN değerleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur (p=0.371) (Tablo 1). HPV pozitif hasta grubunda normal doğum yapanların OPN değerleri kontrol grubuna göre daha yüksek olup, fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.044). HPV pozitif hasta ve kontrol grubunda sezaryen doğum yapanların OPN değerleri ise benzerdir (Tablo 2).

Operasyon yöntemi olarak 38 kişiye (%46.3) "Total Abdominal Histerektomi Bilateral Salpingo-Ooferektomi" (TAH-BSO), yedi kişiye (%8.5) "Loop Electrosurgical Excision Procedure" (LEEP), 37 kişiye (%45.1) servikal biyopsi uygulanmıştır. Operasyon yöntemleri arasında OPN değerleri istatistiksel olarak benzerdir (p=0.443) (Tablo 1).

TAH-BSO yöntemi ve servikal biyopsi uygulanan hasta ve kontrol gruplarında OPN değerleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur (sırasıyla

p=0.092, p=0.825). LEEP-kontrol grubunda ise bir kişi olduğundan istatistiksel test uygulanamamıştır (Tablo 2).

HPV pozitif hasta ve kontrol grubunda, 67 kişi üç ve üzeri, 14 kişi ise üçün altında gebelik yaşamıştır. Gravida sayısı OPN değerlerini etkilememiştir (p=0.155) (Tablo 1).

Hasta grubunda 34 kişi üç ve üzeri, yedi kişi ise üçün altında gebelik yaşamıştır. Kontrol grubunda ise 33 kişi üç ve üzeri, yedi kişi üçün altında gebelik yaşamıştır. Üç ve üzeri gebelik yaşayan HPV pozitif

hasta grubunda OPN değerleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur, ancak istatistiksel olarak benzerdir (p=0.082). Üçün altında gebelik yaşayan HPV pozitif hasta grubunda ve kontrol grubunda ise OPN değerleri benzer bulunmuştur (p=0.498).

HPV pozitif hasta ve kontrol grubunda, 81 kişiden 57'sinin üç ve üzerinde doğumla sonlanan gebeliği olurken, ikisinin ise üçün altında doğumla sonlanan gebeliği olmuştur. Parite sayısı OPN değerlerini etkilememiştir (p=0.460) (Tablo 1). Üç ve üzeri doğumla sonlanan gebelik yaşayanlarda HPV pozitif hastalarda OPN değerleri kontrol grubuna göre daha

**Tablo 1. Osteopontin ölçümüne ait tanımlayıcı istatistikler**

		n	Ort±Std. Sapma	Medyan (Min.-Maks.)	P
HPV	Pozitif	41	31.6±7.1	31.4 (14.3-49.7)	0.048
	Negatif	41	28.8±5.4	29.4 (16.8-39.6)	
HPV tipi	Yüksek Risk	28	32.4± 7.7	33.3 (14.2-49.7)	0.220
	Diğer	13	29.5±5.2	28.8(22.6-39.7)	
Çalışma durumu	Ev hanımı	74	30.3±6.2	29.8 (14.3-49.7)	0.950
	Çalışan	8	29.4±8.7	30.3 (16.8-41.0)	
Doğum Şekli	Normal	62	30.5±6.4	29.9 (14.3-49.7)	0.371
	Sezaryen	19	29.1±6.6	29.4 (16.8-42.7)	
Operasyon Yöntemi	TAH-BSO	38	29.3±6.4	29.4 (16.8-49.7)	0.443
	LEEP	7	31.7±5.6	32.2 (23.4-40.0)	
	Servikal Biyopsi	37	30.8±6.6	30.5 (14.3-44.1)	
Operasyon Öncesi Patoloji	Normal	36	32.1±7.3	32.5 (14.2-49.7)	*
	Enfeksiyon	1	27.28±0	27.2 (27.2-27.2)	
	ASCUS	2	30.3±3.5	30.3 (27.7-32.8)	
	LGSIL	2	24.9±1.7	24.9 (23.6-26.1)	
Operasyon Sonrası Patoloji	Normal	36	32.0±7.2	32.5 (14.2-49.7)	*
	CIN 1	2	29.2±7.9	29.2 (23.6-34.8)	
	CIN 2	2	29.4±2.3	29.4 (27.7-31.0)	
	CIN 3	1	23.4±0	23.4 (23.4-23.4)	
Gravida	≥3	67	29.8±6.5	29.5 (14.3-49.7)	0.155
	<3	14	32.5±6.0	32.4 (22.6-42.7)	
Parite	≥3	57	29.9±6.5	29.6 (14.3-49.7)	0.460
	<3	24	31.1±6.4	31.5 (18.6-42.7)	

\*Kişi sayısı az olan durumlarda istatistiksel test uygulanamadığı için p değeri sunulamamıştır.

HPV: İnsan Papilloma Virusu, TAH-BSO: Total Abdominal Histerektomi Bilateral Salpingo-ooferektomi, LEEP: Loop Electrosurgical Excision Procedure, CIN: Servikal İntraepitelyal Neoplazi, ASCUS: Önemi Belirlenemeyen Atipik Skuamöz Hücreler, LSIL: Düşük Dereceli Skuamöz İntraepitelyal Lezyon.

**Tablo 2. Demografik ve klinik karakteristiklere göre çalışma gruplarında osteopontin değerleri**

		Grup	n	Ort±Std. Sapma	Medyan (Min.-Maks.)	p
Yaş	≤35	HPV pozitif	9	31.8 ± 6.4	34.3 (23.6-44.1)	0.282
		HPV negatif	3	28.2 ± 3.8	26.3 (25.7-32.6)	
	>35	HPV pozitif	32	31.5 ± 7.2	31.3 (16.1-49.7)	
		HPV negatif	38	28.8 ± 5.6	29.4 (16.8-39.6)	
Çalışma Durumu	Ev hanımı	HPV pozitif	37	31.0 ± 7.2	31.3 (14.2-49.7)	0.274
		HPV negatif	37	29.4 ± 5.0	29.4 (18.4-39.6)	
	Çalışan	HPV pozitif	4	36.1±4.3	36.2 (31.0-40.9)	0.029
		HPV negatif	4	22.7 ± 6.1	22.3 (16.7-29.5)	
Doğum Şekli	Normal doğum	HPV pozitif	33	32.1 ± 7.1	32.2 (14.2-49.7)	0.044
		HPV negatif	29	28.8 ± 5.1	29.3 (18.4-39.6)	
	Sezaryen	HPV pozitif	8	29.2 ± 6.9	26.9(22.5-42.6)	
		HPV negatif	11	29.0 ± 6.6	30.5 (16.8-38.0)	
Operasyon Yöntemi	TAH-BSO	HPV pozitif	4	36.2 ± 9.6	34.0 (27.1-49.7)	0.092
		HPV negatif	34	28.4 ± 5.6	29.1 (16.8-38.4)	
	LEEP	HPV pozitif	6	32.0 ± 6.0	33.4 (23.4-39.9)	*
		HPV negatif	1	30.2 ± 0	30.2 (30.2-30.2)	
	Servikal Biyopsi	HPV pozitif	31	30.8 ± 6.9	31.0 (14.2-44.1)	0.825
		HPV negatif	6	30.7 ± 5.1	29.9 (25.7-39.6)	
Gravida	≥3	HPV pozitif	34	31.1 ± 7.2	31.1 (14.2-49.7)	0.082
		HPV negatif	33	28.3 ± 5.4	29.4 (16.7-38.4)	
	<3	HPV pozitif	7	33.6 ± 6.4	33.4 (22.5-42.6)	
		HPV negatif	7	31.3 ± 5.7	30.7 (25.4-39.6)	
Parite	≥3	HPV pozitif	26	31.9 ± 7.2	31.3 (14.2-49.7)	0.025
		HPV negatif	31	28.1 ± 5.4	29.4 (16.7-38.4)	
	<3	HPV pozitif	15	30.8 ± 7.2	32.2 (18.6-42.6)	0.804
		HPV negatif	9	31.5 ± 5.1	30.7 (25.4-39.6)	

\*Kişi sayısı az olan durumlarda istatistiksel test uygulanmadığı için p değeri sunulamamıştır.

HPV: İnsan Papilloma Virusü, TAH-BSO: Total Abdominal Histerektomi Bilateral Salpingo-ooferektomi, LEEP: Loop Electrosurgical Excision Procedure.

yüksek bulunmuştur ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.025). HPV pozitif hasta ve kontrol gurunda üçün altında doğumla sonlanan gebelik yaşayanlarda ise OPN değerleri benzerdir (p=0.804) (Tablo 2).

HPV pozitif hasta grubunda operasyon öncesi patoloji araştırıldığında, 36 kişide (%87.8) hücresel değişiklik saptanmazken (normal), beş kişi de ise patoloji (%12.2) belirlenmiştir. Beş kişinin ikisinde (%4.9) ASCUS, ikisinde (%4.9) LGSIL ve birinde (%2.4)

ise enfeksiyon görülmüştür. Patoloji sonucu normal olanlarda OPN değeri ortalaması 32.1±7.3, ASCUS görülenlerde 30.3±3.5, LGSIL görülenlerde 24.9±1.7, enfeksiyonda ise 27.28±0 bulunmuştur. Sayı az olduğundan p değeri verilememiştir (Tablo 1).

Operasyon sonrası patoloji araştırıldığında ise 36 kişi (%87.8) normal, beş kişide (%12.2) ise patoloji görülmüştür. Bu beş kişiden iki kişide (%4.9) CIN-1, iki kişide (%4.9) CIN-2, bir kişide ise CIN-3 saptanmıştır. Patoloji sonucu normal olan HPV pozitif hastalarda

OPN değeri ortalaması  $32.0 \pm 7.2$ , CIN-1 görülenlerde  $29.2 \pm 7.9$ , CIN-2 görülenlerde  $29.4 \pm 2.3$ , CIN-3 görülenlerde  $23.4 \pm 0$ 'dır. Sayı az olduğundan p değeri verilememiştir (Tablo 1).

## TARTIŞMA

HPV ile ilişkili olan serviks kanseri kadınlarda en sık görülen kanserler arasında olup, erken tanı yaşamsal önem taşımaktadır<sup>(26)</sup>. Teşhis geciktiğinden dolayı olguların %80'i invazyon ve metastaz nedeniyle yaşamını kaybetmektedir<sup>(25)</sup>. Erken teşhisle ölümler azaltılabilmektedir ve bu amaçla hastalığın erken tanısı ile prognoz için yeni belirteçlere de gereksinim duyulmaktadır<sup>(27,28)</sup>. Çalışmamızda kullandığımız OPN'de bunlardan biri olup, prostat, kolon, mide, karaciğer ve akciğer kanserleri gibi birçok kanserde ekspresyonu gösterilmiştir<sup>(29)</sup>. Serviks kanseri ve OPN ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştıran sınırlı sayıda çalışma vardır<sup>(16,22-25,30)</sup>.

Huang ve ark.<sup>(16)</sup>, çalışmalarında, OPN'in anormal ekspresyonunun servikal kanserli hastalarda radyasyon direncini ve kötü prognozu gösterdiğini bildirmişlerdir. Leung ve ark.<sup>(30)</sup>, OPN fragmanlarının tanısız veya prognostik bir biyobelirteçten daha önemli olabileceğini kanserin biyolojisini çok iyi belirleyebileceğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında, serviks kanseri tanısı almış 33 hastanın preoperatif plazma ve serum örnekleri ile sağlıklı bireylere ait 31 plazma ve 32 serum örneğinde OPN varlığını araştırmışlar ve hastalarda sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksek OPN düzeyleri saptamışlardır. Yine aynı kontrol grubuyla 147 servikal kanser hastasını içeren (40'ı evre I, 55'i Evre II, 52'si evre III-IV) daha büyük bir grubun plazma örneklerindeki OPN düzeylerini karşılaştırmışlar ve benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Hatta evre III-IV hastalarda OPN düzeyinin en yüksek, evre I'de ise en düşük düzeyde bulunduğunu bildirmiş, sonuç olarak OPN seviyelerinin bir biyobelirtecin ötesinde kanserin biyolojisine de ışık tutacak bir marker olduğunu belirtmişlerdir.

Sakaguchi ve ark.<sup>(22)</sup> yaptıkları çalışmada, servikal kanserli hastaların metastatik lenf nodlarında OPN ekspresyonunun primer tümörden daha fazla

olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca OPN seviyeleri ile prognoz arasında bir ilişki saptamışlar, OPN artışı olmayan hastaların sağ kalım oranlarının daha yüksek olduğunu bildirerek OPN düzeyinin prognostik bir gösterge olduğunu vurgulamışlardır.

Cho ve ark.<sup>(23)</sup> çalışmalarında, yaşa, tümör boyutuna ve tümör evresine göre OPN ekspresyonunda önemli bir fark olmadığını, yüksek ekspresyonun genel sağ kalım ( $p=0.002$ ) ve hastalısız sağ kalım ( $p=0.033$ ) ile anlamlı şekilde korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Rahim ağzı kanseri olan kadınlarda plazma OPN seviyelerinin in situ karsinomlu kadınlardan ve sağlıklı kontrollerden önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bulmuşlardır ( $p<0.001$ ). Serviks kanseri hastalarında, OPN seviyelerinin artan tümör boyutu ( $p=0.008$ ) ve tümör evresi ( $p<0.001$ ) ile korelasyon gösterdiğini belirlemişler, OPN'nin rahim ağzı kanserini saptamadaki duyarlılığını ve özgüllüğünü sırasıyla %50.6 ve %95 olarak bulmuşlardır. Diğer çalışmaların aksine yüksek plazma OPN seviyelerinin hastalısız sağkalım ile korelasyon gösterdiğini bulmuşlar, plazma OPN seviyelerinin servikal kanser için tanısız ve prognostik bir biyobelirteç olarak yararlı olduğunu göstermişlerdir.

Song ve ark.<sup>(24)</sup>, normal, karsinoma in situ ve servikal kanser dokularında osteopontin ekspresyonunu sırasıyla %2.9, %78.2 ve %88.4 olarak bulmuşlardır ( $p<0.01$ ). Osteopontinin in situ karsinom ve invaziv servikal kanser dokularında normal servikal dokuya göre daha yüksek oranda ekspresyon edildiğini belirtmişlerdir. Osteopontin ekspresyonunun, karsinogenez ve servikal kanser invazyonu ile yakından ilişkili olduğunu göstermişler, osteopontinin servikal kanserin tanısında yararlı olabileceğini vurgulamışlardır.

Çalışmamıza benzer bir şekilde insan papilloma virüsünün saptanması ve serviks kanseri örneklerinde osteopontin ekspresyonunu araştıran Bao ve ark.<sup>(25)</sup>, OPN'nin HPV-pozitif servikal tümör dokularında HPV-negatif olanlara göre daha yüksek ekspresyon oranına sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. OPN ekspresyonunun HPV enfeksiyonu ile ilişkili olduğunu ve OPN'nin, HPV enfeksiyonunun tümör metastazı üzerindeki arttırıcı etkileri olabileceğini

belirtmişler, ayrıca serviks kanseri hastaları için radikal HPV tedavisinin, tümör hücrelerinin metastazını geciktirebileceğini ve hayatta kalmalarını uzatabileceğini vurgulamışlardır.

HPV pozitif 41 hastanın 28'inde (%68.3) yüksek riskli HPV tipi saptanırken 13'ünde (%31.7) ise diğer HPV tipleri saptandı. Yüksek riskli HPV tipi içerenlerin OPN değeri ortalaması diğer HPV tipi pozitifliği saptananlardan daha yüksek bulunmuş olup, sonuçlarımız, Bao ve ark.'nın<sup>(25)</sup> çalışmasıyla benzerdir. Hasta ve kontrol grupları arasındaki OPN değerleri kıyaslandığında HPV pozitif hasta grubu HPV negatif kontrol grubuna göre daha yüksek OPN değerine sahip bulunmuştur. Hasta ve kontrol grupları arası OPN değerleri istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0.048$ ) bulunmuş olup, daha önceki çalışmalarda belirtilen HPV pozitifliği ve OPN düzeyi arasındaki doğru orantılı ilişkiyi desteklemektedir.

Örneklem büyüklüğünün az olması ve HPV pozitif 41 hastadan yalnızca 5'inde CIN saptanması çalışmamızın kısıtlayıcı yanını oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma yalnızca daha yüksek OPN düzeyi ile HPV enfeksiyonu arasında bir ilişki bulmuştur. Bu ilişkinin nedensel olduğunu hatta olabileceğini söylemek için yeterli değildir. Bu nedenle, OPN'nin tanısıl, prognostik ve tarama programlarını destekleyici bir biyobelirteç olarak gerçek klinik değerini belirlemek için daha büyük örneklem grupları ile evre 1-3 CIN, evre 1-4 serviks kanseri gibi farklı derecede hastalığa sahip gruplarda yapılacak olan daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

**Etik Kurul Onayı:** Bu çalışma, Erzincan Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (22.03.2017 tarih ve 2/02 kayıt numarası) onaylanmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Ethics Committee Approval:** This study was conducted with the approval of Erzincan University, Clinical Research Ethics Committee (03.22.2017; 2/02).

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

## KAYNAKLAR

1. Boda D, Docea AO, Calina D, et al. Human papilloma virus: Apprehending the link with carcinogenesis and unveiling new research avenues (Review). *Int J Oncol.* 2018;52(3):637-55. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4256>
2. Gheit T. Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. *Front Oncol.* 2019;9:355. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00355>
3. Kiwerska K, Jozefiak A, Markowska J, Kedzia W, Jackowska J, Wierzbicka M. Oral-genital human papillomavirus infection in Polish couples: frequent detection of HPV 42. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):122. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3645-0>
4. Kim YT, Serrano B, Lee JK, et al. Burden of Human papillomavirus (HPV)-related disease and potential impact of HPV vaccines in the Republic of Korea. *Papillomavirus Res.* 2019;7:26-42. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2018.12.002>
5. de Sanjosé S, Serrano B, Tous S, et al. Burden of Human Papillomavirus (HPV)-related cancers attributable to HPVs 6/11/16/18/31/33/45/52 and 58. *JNCI Cancer Spectr.* 2019;2(4):pky045. <https://doi.org/10.1093/jncics/pky045>
6. Brianti P, De Flammineis E, Mercuri SR. Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiol.* 2017;40(2):80-5.
7. Harder T, Wichmann O, Klug SJ, van der Sande MAB, Wiese-Posselt M. Efficacy, effectiveness and safety of vaccination against human papillomavirus in males: a systematic review. *BMC Med.* 2018;16(1):110. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1098-3>
8. Jeannot E, Viviano M, Follonier MC, et al. Human Papillomavirus infection and vaccination: Knowledge, attitude and perception among undergraduate men and women healthcare university students in Switzerland. *Vaccines (Basel).* 2019;7(4):130. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040130>
9. 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):394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
10. Hao S, Wang C, Liu S, He J, Jiang Y. HPV genotypic spectrum in Jilin province, China, where non-vaccine-covered HPV53 and 51 are prevalent, exhibits a bimodal age-specific pattern. *PLoS One.* 2020;15(3):e0230640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230640>



11. Wilting SM, Steenbergen RDM. Molecular events leading to HPV-induced high grade neoplasia. *Papillomavirus Res.* 2016;2:85-8. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2016.04.003>
12. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key molecular events in cervical cancer development. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(7):384. <https://doi.org/10.3390/medicina55070384>
13. Zhao H, Chen Q, Alam A, et al. The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):356. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0391-6>
14. Shurin MR. Osteopontin controls immunosuppression in the tumor microenvironment. *J Clin Invest.* 2018;128(12):5209-12. <https://doi.org/10.1172/JCI124918>
15. Han X, Wang W, He J, Jiang L, Li X. Osteopontin as a biomarker for osteosarcoma therapy and prognosis. *Oncol Lett.* 2019;17(3):2592-8. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9905>
16. Huang X, Qian Y, Wu H, et al. Aberrant expression of osteopontin and E-cadherin indicates radiation resistance and poor prognosis for patients with cervical carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 2015;63(2):88-98. <https://doi.org/10.1369/0022155414561329>
17. Moorman HR, Poschel D, Klement JD, Lu C, Redd PS, Liu K. Osteopontin: A key regulator of tumor progression and immunomodulation. *Cancers (Basel).* 2020;12(11):3379. <https://doi.org/10.3390/cancers12113379>
18. Kaleta B. Osteopontin and transplantation: Where are we now?. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2021;69(1):15. <https://doi.org/10.1007/s00005-021-00617-6>
19. Clemente N, Raineri D, Cappellano G, et al. Osteopontin bridging innate and adaptive immunity in autoimmune diseases. *J Immunol Res.* 2016;2016:7675437. <https://doi.org/10.1155/2016/7675437>
20. Wei R, Wong JPC, Kwok HF. Osteopontin -- a promising biomarker for cancer therapy. *J Cancer.* 2017;8(12):2173-83. <https://doi.org/10.7150/jca.20480>
21. Castello LM, Raineri D, Salmi L, et al. Osteopontin at the crossroads of inflammation and tumor progression. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:4049098. <https://doi.org/10.1155/2017/4049098>
22. Sakaguchi H, Fujimoto J, Hong BL, Tamaya T. Clinical implications of osteopontin in metastatic lesions of uterine cervical cancers. *Cancer Lett.* 2007;247(1):98-102. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.03.026>
23. Cho H, Hong SW, Oh YJ, et al. Clinical significance of osteopontin expression in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134(8):909-17. <https://doi.org/10.1007/s00432-007-0351-5>
24. Song JY, Lee JK, Lee NW, Yeom BW, Kim SH, Lee KW. Osteopontin expression correlates with invasiveness in cervical cancer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2009;49(4):434-8. <https://doi.org/10.1111/j.1479-828X.2009.01027.x>
25. Bao L, Si Q, Jia L, Ren X, Ma R, Wang Y. Detection of human papillomavirus and expression of osteopontin in cervical cancer specimens. *Mol Med Rep.* 2011;11(1):447-53. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2647>
26. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol.* 2020;40(5):602-8. <https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1634030>
27. Panda J, Das A, Panigrahi A. Delays in diagnosis of cervical cancer among women attending tertiary care cancer diagnostic hospitals in Bhubaneswar, India. *Indian J Gynecol Oncol.* 2020;18:10. <https://doi.org/10.1007/s40944-019-0358-2>
28. Molina MA, Carosi Diatricch L, Castany Quintana M, Melchers WJ, Andralojc KM. Cervical cancer risk profiling: molecular biomarkers predicting the outcome of hrHPV infection. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020;20(11):1099-120. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1835472>
29. Hao C, Cui Y, Owen S, Li W, Cheng S, Jiang WG. Human osteopontin: Potential clinical applications in cancer (Review). *Int J Mol Med.* 2017;39(6):1327-37. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2964>
30. Leung DT, Lim PL, Cheung TH, et al. Osteopontin fragments with intact thrombin-sensitive site circulate in cervical cancer patients. *PLoS One.* 2016;11(8):e0160412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160412>