

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
PROF. DR. TUNCER KARPUZOĞLU ORGAN NAKLİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

HPV PERSİSTANSINDA ENDOSERVİKAL İMMÜNİTENİN ROLÜ

Selen DOĞAN

DOKTORA TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
PROF. DR. TUNCER KARPUZOĞLU ORGAN NAKLİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

HPV PERSİSTANSINDA ENDOSERVİKAL İMMÜNİTENİN ROLÜ

Selen DOĞAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa Ender TERZİOĞLU

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2020-5452 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tuncer Karpuzoğlu Organ Nakli Enstitüsü İmmünoloji programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 24/12/2021

İmza

Tez Danışmanı : Prof Dr Ender Terzioğlu
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye : Prof.Dr. Sadi Köksoy
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye : Prof Dr. Veli Yazısız
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye : Prof. Dr. Banu Öztürk
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Üye : Doç Dr. Fatih Çelmeli
Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda 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 beyan ederim.

Öğrenci
Selen DOĞAN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mustafa Ender TERZİOĞLU

TEŞEKKÜR

2015 yılında başladığım immünoloji doktora programında, bugünlere gelmeme vesile olan başta sayın tez danışmanım Prof Dr. Ender TERZIOĞLU'na olmak üzere, laboratuvar çalışmalarında desteğini bizden esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. Sadi KÖKSOY'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmanın yürütülmesi sürecinde emekleri olan sevgili Münevver KAHRAMAN, Özlem AKDENİZ, Melike ULUBAŞI, jinekolojik onkoloji kliniği yan dal asistanları, Dr Saliha SAĞNIÇ, Dr Sinan Serdar AY, Dr Özer BİRGE'ye teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında gösterdikleri anlayıştan ötürü başta Kadın hastalıkları ve doğum anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. İnanç MENDİLCİOĞLU olmak üzere, tüm hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bu süreçte zamanlarından çaldığım, sevgili biricik ailem, annem Münire SUNGUR, babam Mehmet ALBEN, eşim Nasuh Utku DOĞAN ve çocuklarım Ela Ece DOĞAN ve Mehmet Sonat DOĞAN'a bana sabır gösterdikleri ve neşeleriyle, varlıklarıyla can yoldaşı oldukları için teşekkür ederim.

Son olarak modern Türkiye'yi kurarak, biz kadınlara, ilim ve bilim yolunda ilerleme şansı veren Mustafa Kemal ATATÜRK'e minnetlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada Human papillomavirüs (HPV) persistansı gösteren ve HPV klerensi gösteren iki grup arasında sistemik inflamatuvar markerlar, periferel kan ve endoservikal doku akım sitometri analizlerinde lenfosit immünofenotiplerinde farklılık olup olmadığı araştırılmak istenmiştir

Yöntem: Akdeniz üniversitesi tıp fakültesi, kadın hastalıkları ve doğum polikliniğine başvuran premenopozal, HPV persistansı gösteren 19 ve HPV klerensi gösteren 22 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastalardan eş zamanlı alınan periferel venöz kan ve endoservikal sitobrush örnekleri akım sitometri cihazında immünofenotiplendirme analizine tabi tutulmuş lenfosit yüzdeleri ve fenotipleri karşılaştırılmıştır. Periferel venöz kandan ayrıca sistemik inflamasyon markerları analiz edilmiştir.

Bulgular: Periferel venöz kan absöüt lenfosit sayısı HPV persistansı grubunda klerens grubuna göre daha düşük saptanmıştır (1.9 vs $2.5 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $p.004$). Nötrofil/lenfosit oranı (NLR) persistans grubunda klerens grubuna göre daha yüksek saptanmıştır (2.4 vs 1.6 , $p.024$). CD3+CD8^+ T lenfosit yüzdesi persistans grubunda klerens grubuna göre daha düşük saptanmıştır (24.5 vs 35.8 %, $p.014$). Gammadelta T lenfosit (GDT) içindeki CD8^+ hücre yüzdesi persistans grubunda klerens grubuna göre daha düşük saptanmıştır (22.6 vs 32.2 %, $p.021$). CD3-GDT yüzdesi klerens grubunda daha yüksek saptanmıştır (3.4 vs 11.5 %, $p.013$). Endoservikal sitobrush analizinde ise total CD3+T lenfosit, CD3+CD8^+ T lenfosit, CD8+GDT , GDT içinde CD4-CD8^- oranı, GDT içinde CD8^+ oranı persistans grubunda daha düşük çıkmıştır sırasıyla (52 vs 73.6 %, $p.004$), (9.8 vs 20.2 %, $p.013$), (7.2 vs 15.1 %, $p.030$), (51.1 vs 69.6 %, $p.041$), (9 vs 15 %, $p.048$). CD3+CD4^+ Tlenfosit ve CD4+GDT yüzdesi ise persistans grubunda klerens grubuna göre daha yüksek saptanmıştır, sırasıyla (37.6 vs 14.1 %, $p.002$), (38.6 vs 15.0 %, $p.004$).

Sonuç: HPV persistansında sistemik ve lokal immünitede farklılık vardır. Endoservikal mukozada bu farklılık belirgin olarak CD8^+ lenfosit aleyhine, CD4^+ lenfositler lehinedir. Endoservikal mukozadaki farklılık esas olarak GDT hücrelerden kaynaklanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Human papillomavirus, Kanser, Lenfosit

ABSTRACT

Objective: We aimed to evaluate systemic inflammatory markers, peripheral blood and endocervical cytobrush derived immune cells with flow cytometry in Human papillomavirus (HPV) persistent and nonpersistent patient populations.

Method: Premenopausal 19 patients with HPV persistence and 22 patients with HPV clearance who applied to Akdeniz University Faculty of Medicine, obstetrics and gynecology outpatient clinic were included in the study. Peripheral venous blood and endocervical cytobrush samples taken simultaneously from these patients were subjected to immunophenotyping analysis with multicolor flow cytometry, and lymphocyte percentages and phenotypes were compared. Systemic inflammation markers were also analyzed from peripheral venous blood.

Results: Peripheral venous blood absolute lymphocyte count was found to be lower in the HPV persistence group than in the clearance group (1.9 vs $2.5 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $p.004$). Neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) was higher in the persistence group than in the clearance group. (2.4 vs 1.6 , $p.024$). The percentage of CD3+CD8+ T lymphocytes was found to be lower in the persistence group than in the clearance group (24.5 vs 35.8 %, $p.014$). The percentage of CD8+ cells in Gammadelta T lymphocyte (GDT) was found to be lower in the persistence group than in the clearance group (22.6 vs 32.2 %, $p.021$). The percentage of CD3-GDT was higher in the clearance group (3.4 vs 11.5 %, $p.013$). In the endocervical cytobrush analysis, total CD3+T lymphocyte, CD3+CD8+ T lymphocyte, CD8+GDT, CD4-CD8- ratio in GDT, CD8+ ratio in GDT were lower in the persistence group. (52 vs 73.6 %, $p.004$), (9.8 vs 20.2 %, $p.013$), (7.2 vs 15.1 %, $p.030$), (51.1 vs 69.6 %, $p.041$), (9 vs 15 %, $p.048$) respectively. The percentage of CD3+CD4+ T lymphocyte and CD4+GDT was found to be higher in the persistence group than in the clearance group. (37.6 vs 14.1 %, $p.002$), (38.6 vs 15.0 %, $p.004$) respectively.

Conclusion: There are significant differences in systemic and local immunity in HPV persistence. This difference is clearly against CD8+ lymphocytes and in favor of CD4+ lymphocytes in endocervical mucosa. The difference in endocervical mucosa is mainly due to GDT cells.

Key words: Human papillomavirus, Cancer, Lymphocyte

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii, iv
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii, ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. Human papilloma virus (HPV)	2
2.2. HPV yaşam döngüsü	5
2.2.1. HPV genom entegrasyonu	7
2.3. HPV enfeksiyonu epidemiyolojisi	8
2.4. HPV enfeksiyonu ve serviks kanseri ilişkisi	9
2.4.1 HPV ve Servikal karsinogenez	10
2.5. HPV enfeksiyonu ve immün sistem	16
2.5.1 Kadın genital sistem immünolojisi	16
2.5.1.1 Bariyer koruma	17
2.5.1.2 Doğal bağışıklık hücreleri	18
2.5.1.3 Antimikrobiyal peptidler	20
2.5.1.4 Sitokin ve kemokinler	21
2.5.1.5 Adaptif immünite	22

2.5.2 HPV enfeksiyonuna immün yanıt	24
2.5.2.1 Doğal immünite	24
2.5.2.2 Adaptif immünite	32
2.5.3 Gamma-Delta T hücreler	34
3. GEREÇ ve YÖNTEM	38
3.1.Yöntem	
3.2.İstatistiksel analiz	53
4. BULGULAR	54
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	78
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	87

TABLÖLAR DİZİNİ

- Tablo 4.1.** Hastaların genel ve sosyodemografik özellikleri
- Tablo 4.2.** HPV persistansı gösteren hastaların özellikleri
- Tablo 4.3.** Periferik venöz kan örneklerinde hematolojik ve immünolojik parametreler
- Tablo 4.4.** Periferik venöz kan akım sitometri analizi sonuçları
- Tablo 4.5.** Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi sonuçları

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1.** Human papillomavirus 16 viral yapısı ve eksprese edilen proteinler
- Şekil 2.2.** Human papillomavirus'ün filogenetik ağacı
- Şekil 2.3.** Human papillomavirus için hayat siklusu
- Şekil 2.4.** Human papillomavirüs'ün neden olduğu klinik tablolar
- Şekil 2.5.** Kanser işaretçileri
- Şekil 2.6.** Human papillomavirüs ilişkili servikal karsinogenez
- Şekil 2.7.** Kadın genital sistem immünitesinde rol alan yapılar
- Şekil 2.8.** Human papillomavirüs enfeksiyonu ve karsinogenez sürecinde rol alan immün hücreler ve birbirleriyle ilişkileri gösterilmiştir.
- Şekil 3.1.** Periferel kan akım sitometri analizi kapılama stratejileri
- Şekil 3.2.** Periferel kan akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı)
- Şekil 3.3.** Periferel kan akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı)
- Şekil 3.4.** Periferel kan akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı)
- Şekil 3.5.** Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri;
- Şekil 3.6.** Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı)
- Şekil 3.7.** Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı)
- Şekil 3.8.** Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı)

RESİMLER DİZİNİ

- Resim 3.1.** Santrifüj sonrası fazlarına ayrılan periferik venöz kan örneği
- Resim 3.2.** Fırçalarla santrifüj edilen endoservikal örnek tüpü
- Resim 3.3.** Endoservikal örnekleri hücre süzgecinden geçirme işlemi
- Resim 3.4.** Santrifüj sonrası endoservikal örnek tüpünde oluşan pellet
- Resim 3.5.** 24 kuyucuklu hücre kültürü plağı dizaynı
- Resim 4.1.** Solda, endoservikal sitobrush, PHA, 7.gün; Sağda periferik venöz kan, PHA, 7.gün
- Resim 4.2.** Solda, endoservikal sitobrush ZA-IL-2 7.gün; sağda periferik venöz kan ZA+IL-2, 7.gün
- Resim 4.3.** Fungal kontaminasyon makroskopik görünüm / mikroskopik görünüm

SİMGELER ve KISALTMALAR

APC	:	Antijen sunan hücre
ASC-H	:	Atipik squamöz hücreler- dışlanamayan yüksek dereceli lezyon
ASC-US	:	Atipik squamöz hücre-önemi belirlenemeyen
CD	:	Cluster of diferansiasyon
CIN	:	Servikal intraepitelyal neoplazi
CRP	:	C-reaktif protein
DC	:	Dendritik hücre
DETC	:	Dendritik epidermal T hücre
FBS	:	Fetal bovin serum
GDT	:	Gammadelta T hücresi
GMCSF	:	Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
GCSF	:	Granülosit koloni uyarıcı faktör
HIV	:	Human immune deficiency virus
HPV	:	Human papillomavirus
HSIL	:	Yüksek gradeli intraepitelyal lezyon
HSV	:	Herpes simplex virus
IEL	:	İntraepitelyal lenfosit
IFN	:	İnterferon
Ig	:	İmmünglobulin
IL	:	İnterlökin
LC	:	Langerhans hücresi
LEEP	:	Loop elektroeksizyonel prosedür

LSIL	:	Düşük gradeli intraepitelyal lezyon
MHC	:	Major histocompatibility complex
NK	:	Natural Killer
NKT	:	Natural Killer T hücre
NLR	:	Nötrofil/Lenfosit oranı
TLR	:	Toll like reseptör
PAMP/DAMP:		Patojen asosiye moleküler patern/ Hasar asosiye moleküler patern
PBS	:	Fosfat buffered salin
PHA	:	Fitohemaglutinin
PLR	:	Platelet/ lenfosit oranı
PRR	:	Patern tanıyıcı reseptör
RNA/DNA	:	Ribonükleik asit/ Deoksiribonükleik asit
SII	:	Sistemik immün inflamasyon indeksi
TCR	:	T hücre reseptörü
TNF	:	Tümör nekrozis faktör
VEGF	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
YR	:	Yüksek riskli
ZA	:	Zoledronik asit

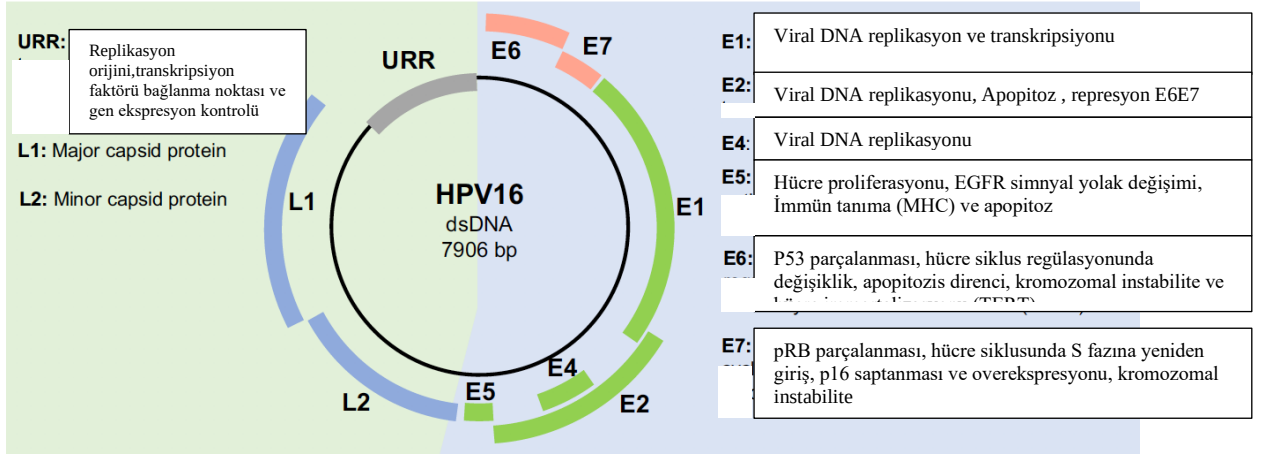
1. GİRİŞ

Serviks kanseri Human papillomavirüs (HPV) ile oldukça yakından ilişkilidir. Bu ilişkiyi sağlayan persiste HPV enfeksiyonunun uzun yıllar sebat etmesidir. Ancak günümüzde çok yaygın olarak saptanan HPV enfeksiyonunun hangi hastalarda persiste edeceği hangi hastalarda klerens izleneceği önceden anlaşılamamaktadır. Ayrıca HPV enfeksiyonunun persiste etmesinin altında yatan immünolojik nedenler halen tamamen aydınlatılamamıştır. Elbette persiste enfeksiyonun sebeplerinden biri de HPV'nin mükemmel bir immün sistemden kaçış stratejisi sürdürmesidir. HPV'ye karşı oluşturulan immün yanıtta keratinositler, langerhans hücreleri (LC), Dendritik hücreler (DC), makrofajlar, intraepitelyal gammadelta hücreleri (GDT) kadın genital sistem mukozasının hücresel komponentini oluşturmaktadır. GDT hücreler unkonvansiyonel T hücrelerinin prototipini oluşturmaktadır ve epitel bariyerinin korunmasında ilk savunma hattında yer alır. Doğal ve adaptif immünite arasında köprü görevi görür. Biz bu çalışmayı dizayn ederken GDT hücrelerinin ve diğer immün hücrelerin, periferel kan ve endoservikal dokudaki değişimlerinin HPV persistansı ile ilişkili olabileceği hipotezini ortaya koyduk.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Human Papilloma Virüs (HPV)

HPV (human papilloma virüs) zarfsız, ikozahedral yapıda, 360 kopya L1 proteininden, merkezinde bir kopya L2 proteini bulunan 72 pentamerik kapsomerden oluşan kapsidin çevrelediği, sirküler, çift zincirli DNA virüsüdür. Yaklaşık boyutu 55mm dir (Graham,2017). Yaklaşık 8bin baz çiftinden oluşan sirküler genomu erken viral proteinleri (E6, E7, E8, E1,E2, E4 ve E5) kodlayan erken bölge ve viral kapsid proteinleri olan L1 ve L2 proteinlerini kodlayan geç bölge olarak iki kısımdan oluşmaktadır (**Şekil 2.1.**)



Şekil 2.1. HPV 16 viral yapısı ve eksprese edilen proteinler (de Sanjose ve ark.,2018)

Üçüncü olarak, LCR (uzun kontrol bölgesi) , protein kodlamayan replikasyon ve viral transkripsiyondan sorumlu bir bölge bulunmaktadır. Bu bölge aynı zamanda LRE (geç regülatör element) olarak da bilinen elementiyle posttranskripsiyonel kontrol de sağlamaktadır (Amador-Molina ve ark.,2013; Graham,2017). Viral proteinlerin ekspresyonu hücre diferansiasyon programı ile ilişkidir böylece servikal epitelin farklı tabakalarında farklı ekspresyon profili gözlenmektedir. İlk olarak viral replikasyon ve transkripsiyondan sorumlu E1 ve E2 eksprese olur. E2; LCR üzerindeki dörtlü E2 bağlanma noktasına bağlandığında E6 ve E7 viral onkogenlerinin transkripsiyonel düzeylerini kontrol eder (Amador-Molina ve ark.,2013). HPV kutanöz ve mukozal epitelinde enfekte etmektedir. Günümüzde 200'den fazla farklı HPV genotipi bulunmaktadır .

Bunlardan yaklaşık 40 kadarı anogenital bölgede cinsel yolla bulaşan genital wartlara neden olmaktadır. Bunların içerisinde de yüksek riskli olarak sınıflanan HPV genotipleri anogenital kanserlere neden olmaktadır. HPV bütün insan kanserlerinin %5 den fazlasını oluşturmaktadır (Graham,2017). HPV'nin klasifikasyonu genotip özelliklerine göre yapılmakta ve her genotip birbirine göre , yüksek derecede korunmuş L1 gen bölgesinde, en az %10 luk sekans farkı göstermektedir (Kocjan ve ark.,2015). Günümüzde gelişimsel olarak 5 HPV genotip grubu bulunmaktadır. Bunlar α , β , γ , μ , ve ν olarak sınıflandırılmaktadır. Bu grupların içinde en büyüğü α grubu olup, temel olarak mukozayı enfekte eden 64 adet HPV' yi içermektedir. Daha öncede bahsettiğimiz gibi bunların içinden 40 tanesi anogenital traktı enfekte etmekte ve 15 tanesi de yüksek riskli (YR), onkojenik (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51,52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) olarak sınıflanmaktadır. β subgrubu daha çok kutanöz epiteli enfekte etmekte iken, UV ışınları ile birlikte; non-melanom squamöz hücreli karsinomlar gibi insan tümörlerine neden olabilmektedir (Bzhalava ve ark.,2014; Kocjan ve ark.,2015). γ , μ , ve ν subgrupları ise sadece benign hastalıklara neden olmaktadır (Graham,2017) (**Şekil 2.2.**).

A1-3 (klasik Avrupa), A4 (Asya), B1-4 (Afrika1), C1-4 (Afrika2), D1 (Kuzey Amerika), D2 ve D3 (Asya-Amerika) ve D4 bu altsoylardır. Bu tanımlanan varyant soylar ve altsoyların, persistans ve kanser progresyonu açısından farklı riskler oluşturduğunu gösteren bir çok çalışma literatürde mevcuttur. Ayrıca HPV 16 alt soyları A4, D2 ve D3, daha sık görülen A1/A2 alt soyları D3 ve D2'ye göre, önemli oranda artmış adenokarsinoma in situ ve adenokarsinom riski oluşturmaktadır (Mirabello ve ark.,2016). Bu göstermektedir ki küçük genetik değişiklikler, adenokarsinom riskinde büyük farklara yol açmaktadır.

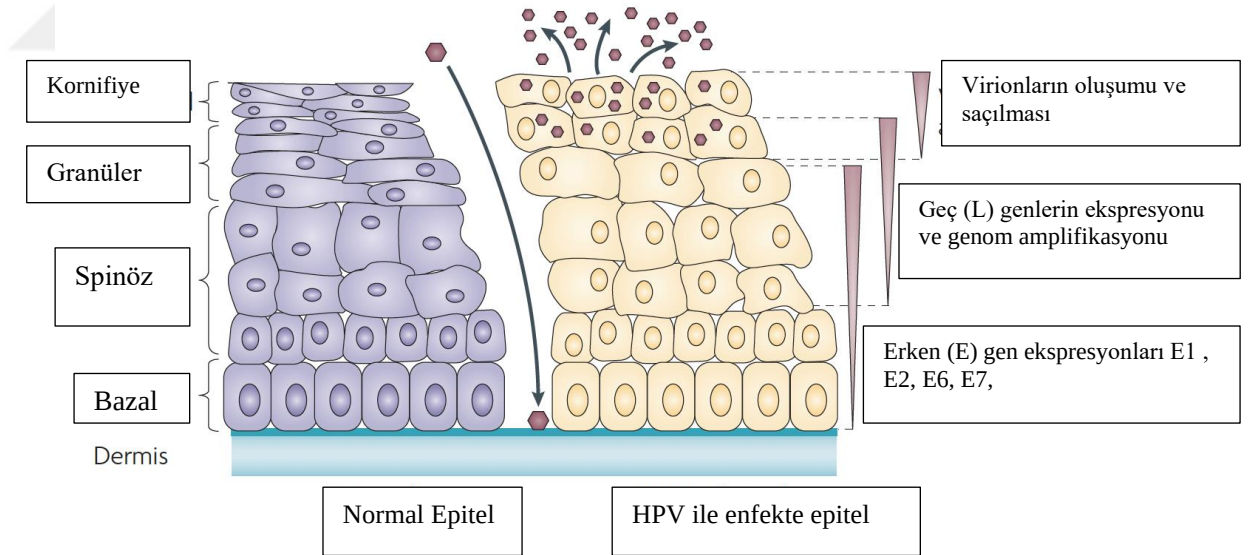
2.2 HPV Yaşam Döngüsü

Çoğu virüs hedef hücreyi enfekte ettikten sonra aynı enfekte hücrede yavru virüsleri üretirken, HPV enfeksiyonunda durum bir miktar farklı gerçekleşmektedir. HPV enfeksiyonunda yeni virionların sentezi sadece enfekte hücre mitozu girdikten sonra ve yeni oluşan hücrelerden biri diferansiasyon sürecine girdiğinde gerçekleşmektedir (Moody ve Laimins,2010).

HPV epitelyal dokuyu bazal tabakadaki mikrotravma alanlarından ya da tek tabakalı squamöz hücrelerin bulunduğu endo-ektoserviks sınırından penetre ederek giriş yapar ve yaşam döngüsü keratinositlerin diferansiasyon süreciyle paralellik göstermektedir. HPV özellikle intra-epitelyal bir patojendir. L1 kapsid proteini bazal membrandaki heparin sülfat proteoglikan reseptörlerine bağlanmaktadır. Ardından viral kapsidde L2 komponentini yüzeye taşıyan konformasyonel bir değişim gerçekleşmektedir. Son çalışmalarda EGFR reseptörleri, laminin, integrinler, syndecan-1 molekülleri de giriş reseptörü olarak kullanılabildiği gösterilmiştir. Giriş daha çok mikropinositoza benzeyen bir endositoz yoluyla gerçekleşmektedir. Ardından da viral genomun nukleusa olan yolculuğu gerçekleşmektedir. HPV genomu nukleusta başlangıçta ekstrakromozomal yani epizomal yerleşim göstermektedir (Graham,2017).

HPV genomu, polimeraz ve diğer replikasyon enzimlerini içermediğinden host enzimlerine bağımlıdır. Virüs yaşamı başlangıçta genom ile enfekte bazal hücrelerde, hücre başına yaklaşık 10 kopya gibi düşük kopya sayısı ile sürdürülmektedir. Epitelyal

hücreler farklılaştıkça virüs replikasyonu yüksek kopya sayılarına ulaşmakta ve en son aşamada stratum spinosum ve granulosum tabakasında hücre başına 1000 kopya gibi bir sayı ile replikasyon sürecini tamamlamaktadır. Keratinositler bölünmeye devam ettiği sürece yüksek riskli (YR) HPV kendi viral proteinleri E6 ve E7'yi sıkı kontrol altında tutmaktadır. Host hücre yani keratinositler bölünmeyi durdurup maturasyonlarını tamamladıklarında bu virüs için aktivasyon ve viral genomun kopya sayısını artırma yönünde bir sinyal oluşturmaktadır. Böylece gen ekspresyonu da epitel tabakalarında farklılık göstermektedir. E genleri en baştan itibaren aktifken kapsidi kodlayan L genleri epitelin üst tabakalarında eksprese olmaktadır. Bu ekspresyon sonucu en son aşamada viral kapsid proteinlerinin sentezlenmesi ile epitelyal yüzeyden salgılanan yeni nesil virionlar olarak hayatlarına devam etmektedirler (de Sanjose ve ark.,2018; Stanley ve Sterling,2014). (Şekil 2.3.)



Şekil 2.3. Human papillomavirus için hayat siklusu (Moody ve Laimins,2010)

HPV ile enfekte hücrelerin proliferasyon kapasitesi çeşitli faktörler tarafından yönetilir. Bunlardan en belirgin olanları Retinoblastom (Rb) gen ailesine ait olan, p105, p107 ve p130 dür. HPV E7 proteini RB 'a bağlanmakta ve onları parçalanmak üzere işaretlemektedir. Bu E2F denen transkripsiyon faktörünün serbestleşmesi ve aktivasyonu ile sonuçlanmakta, bu da S fazı genlerinin ekspresyonunu gerçekleştirmektedir. Bütün

HPV'lerin E7 proteini Rb ailesine bağlanabilmekte ancak YR HPV E7 proteini daha yüksek bir afinite ile bu bağlantıyı gerçekleştirmektedir. E6 proteini ise p53 proteinine parçalanması için bağlanmakta ve hücre büyümesindeki inhibisyon engellenmektedir. E6 ve E7 proteinlerinin kombine etkisi ile hedef hücrede hücre siklus regülatörleri devre dışı kalmakta S fazı sürdürülmektedir. Persiste enfeksiyonda bu artmış hücre bölünmesi sonucu zamanla mutasyonlar birikmekte ve kansere progresyon gerçekleşmektedir (Moody ve Laimins,2010).

En iyi senaryo ile enfeksiyon başlangıcı ile virüs salınımı arasında gereken süre yaklaşık 3 haftadır. Bu sırada virüs replikasyonu ile ilişkili herhangi bir sitoliz ya da sitopatik ölüm görülmemektedir. Yaşam döngüsü diferansiasyon süreci immün aktiviteden uzak bir alanda gerçekleşen ve sonunda kaderi ölüm olarak önceden belli olan bir hücre grubunda gerçekleşmesi buna katkı sağlamaktadır. Virüs ile indüklenmiş bir hücre ölümü olmadığından inflamasyon da başlatılamamaktadır. Proinflamatuvar sitokin salımı yok ya da çok az olduğundan antijen sunan hücre aktivasyonu ya da migrasyonu da gerçekleşmemektedir (Stanley ve Sterling,2014). Şimdiye kadar ki yapılan araştırmalarda HPV'nin yaşam siklusunda viremi fazı saptanmamış ve host savunmasına karşı görünmez olarak uzun süreler varlığı ihmal edilebildiği gözlenmiştir (Stanley,2010).

2.2.1.HPV Genom Entegrasyonu

HPV virüsü servikal materyalde epizomal formda, entegre formda ya da ikisini de içeren miks formda bulunabilmektedir. Entegrasyon sıklıkla erken proteinleri kodlayan genlerden E1 ya da E2 bölgesinde gerçekleşir. Bu bölünme, onkogen ekspresyonunu negatif feedback kontrol altında tutan, viral regülatuar gen olan E2'nin kaybı ile sonuçlanır. Entegrasyon sonucunda oluşan transkriptler episomal DNA'dan oluşanlara göre daha stabil ve HPV 16 entegrasyonu, etkilenen hücrelerin seçici büyüme avantajı ile sonuçlanmaktadır (Woodman ve ark.,2007). Servikal kanserli vakaların büyük kısmında entegrasyon görülürken hepsinde bu durum gerçekleşmemektedir. Servikal kanserde HPV genom entegrasyonu frekansına bakacak olursak; HPV 16 ,18 ve 45'e göre, HPV 31 ve 33 için daha düşük rakamların söz konusu olduğu görülmektedir (Mirabello ve ark.,2018). HPV16 için entegrasyon oranları arttıkça servikal neoplazi şiddetinin de arttığı

bildirilmiştir. Nadiren de olsa invaziv hastalıkta epizomal formlar tespit edilebilir. HPV 16'nın tersine, HPV 18 genomu yüksek dereceli lezyonlarda ve invaziv hastalıkta hemen daima entegre formda bulunmaktadır (Woodman ve ark.,2007).

2.3 HPV Enfeksiyonu Epidemiyolojisi

HPV bütün dünyada en sık cinsel yolla bulaşan enfeksiyon olarak tanımlanmaktadır. 2007 yılında 291 milyon HPV pozitif kadın ile, dünyadaki en sık viral enfeksiyonlardan biridir (de Sanjose ve ark.,2007). Sağlıkla ilgili sorunların yanında bireyin sosyal hayatını da negatif etkileyebilmektedir. HPV ilişkili sorunlar dünya üzerinde önemli düzeyde değişkenlik gösterebilmektedir. Morbidite ve mortalite ile ilişkili faktörler; coğrafi, sosyoekonomik, kültürel, ve viral genom varyabilitesi ile ilişkili genetik faktörler, yaş, cinsiyet anatomik bölge ve sağlık durumu gibi bireysel intrinsik faktörler gibi sıralanabilmektedir. Normal servikal sitolojisi olan kadınlar içinde 2007 ve 2010 yıllarına ait HPV prevalansı %10.4 ve %11.7 iken 2019 yılında bu rakamın %9.9 olduğu saptanmıştır (Kombe Kombe ve ark.,2020). En yüksek prevalansın Okyanusya %30.9 ve Afrika %21.1 ülkelerinde olmakla birlikte , Avrupa'da %14.2, Amerika'da %11.5, Asya'da ise %9.4 olduğu görülmüştür (Bruni ve ark.,2010; de Sanjose ve ark.,2007; Kombe Kombe ve ark.,2020). Yüksek riskli HPV genotiplerine baktığımızda en sık rastlanan tipler sırasıyla HPV 16,18,59,45,31,33,52,58,35,39,51,56 ve 53 genotipleridir. Düşük riskli tiplerden en sık karşımıza çıkanlar ise HPV 6 ve 11 genotipleridir (Kombe Kombe ve ark.,2020).

Papillomavirüsler her yerde bulunabilen, hem erkek hem de kadınları etkileyen bir virüs grubudur. Erkek bireylerde global prevalansı kadınlardakine benzerdir. Düşük riskli HPV suşları ile deri ve mukozayı enfekte edebilen direkt temas ile bulaşan, benign düz ya da kabarık kondilomlar ortaya çıkmaktayken yüksek riskli suşlar invaziv kansere progrese olan süreçlere neden olmaktadır. HPV enfeksiyonlarının büyük kısmı herhangi bir semptoma ya da hastalığa yol açmadan yaklaşık 12- 24 ay içerisinde temizlenmekte iken oldukça küçük bir kısmı preinvaziv ve invaziv lezyonlara progrese olabilmektedir.

HPV'nin tüm dünyadaki bütün kanserlerin yaklaşık %4.5 kadarından (630.000 yeni vaka/yıl) sorumlu olduğu bilinmektedir. Kadın ve erkek oranlarına ayrı ayrı bakacak

olursak bu oranın kadınlarda %8.6 erkeklerde %0.8 olduğunu görmekteyiz. Bu yüzdelere total sayı olarak bakacak olursak kadınlarda yıllık 570.000 vaka , erkeklerde yıllık 60.000 vaka HPV ile ilişkili olarak gelişmektedir. Kansere yol açan enfeksiyöz ajanların halk sağlığındaki önemi, ilişkili fraksiyon kavramı ile değerlendirilmektedir. HPV ilişkili kanserler için, ilişkili fraksiyon; popülasyondan HPV tamamen silinseydi oluşmayacak olan kanser oranıdır. Bölgesel farklılıklara baktığımızda HPV ilişkili fraksiyonlar Avustralya/Yeni Zelanda ve ABD’de <%3 iken Hindistan ve Afrika bölgelerinde bu oran >%20 gibi oranlara yükselmektedir. Serviks kanseri HPV ilişkili kanserlerin %83 kadarını oluşturmaktadır. Bu vakaların 2/3’ü az gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Diğer HPV ilişkili kanserlere bakacak olursak anogenital kanserlerden yıllık 8500 vaka ile vulva kanserleri, 12000 vaka ile vajina kanserleri, 35000 vaka ile anal kanserler (yarısı erkeklerde), 13000 vaka ile de penil kanserler görülmektedir. Baş boyun kanserleri söz konusu olduğunda , HPV ilişkili kanserler yıllık 38000 vaka düzeyinde olduğu, bunların 21000 kadarının gelişmiş ülkelerde görülen orofarengeal kanserlerden oluştuğu görülmektedir. HPV 16/18 ve HPV6/11/16/18/31/33/45/52/58 grubunun rölatif katkılarına baktığımızda sırasıyla %73 ve %90 olduğunu görmekteyiz. Servikal kanserlerle kıyaslandığında nonservikal HPV ilişkili kanserlerin erkeklerde ve ileri yaş grubunda daha sık olduğu da göze çarpmaktadır (de Martel ve ark.,2012; de Martel ve ark.,2017).

2.4 HPV Enfeksiyonu ve Serviks Kanseri İlişkisi

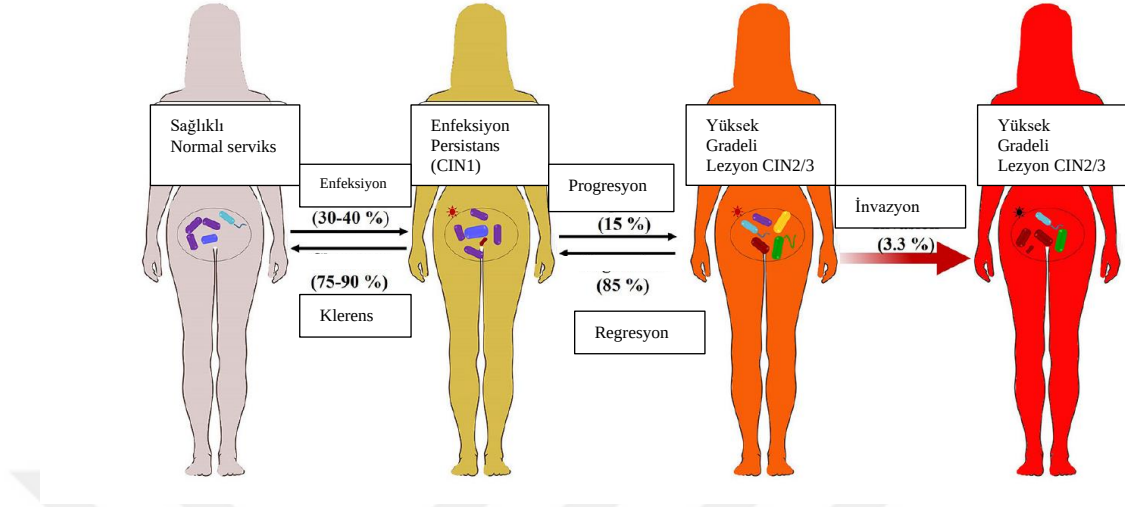
YR HPV ile servikal kanser ilişkisini ilk kez ortaya koyan ve günümüzdeki, serviks kanseri önleme çalışmalarının doğmasına aracılık eden , Harald zur Hausen, 2008 yılında Nobel tıp ödülünü kazanmıştır. O günden bugüne HPV aşılı ve serviks kanseri taramalarında kullanılan HPV DNA testleri günlük kullanıma girmiş ve önemli oranda kanser erken tanı almış ya da henüz preinvaziv hastalık düzeyinde iken tedavi edilebilmiştir. 10 yıl kadar önceki verilerle serviks kanseri, dünyada, kadınlarda görülen en sık 3. kanserdi (de Martel ve ark.,2012). Ancak aynı verilere göre, 42 kaynakları kısıtlı ülkede kadınlardaki en sık kanser olarak karşımıza çıkmakta idi. Bugün HPV 16 ve 18’in invaziv serviks kanserlerinin %71’inden, prekürsör lezyonların da %40-60 kadarından sorumlu olduğunu bilmekteyiz (de Martel ve ark.,2012). Kanser istatistiklerinde önemli

bir yeri olan GLOBOCAN verileri, 2008 yılı için, tüm dünyada , 530.000 serviks kanseri vakası, 275000 ölüm vakası bildirmiş ve vakaların %85'inin az gelişmiş ülkelerde meydana geldiğini bildirmiştir. 10 yıl sonra 2018 yılında güncellenen GLOBOCAN verilerine bakacak olursak, bu verilere göre serviks kanseri major halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir ve dünyadaki kadınlarda en sık 4. kanser ve mortalite sıralamasındadır. Coğrafi bölge olarak baktığımızda, serviks kanseri, doğu, orta, güney ve batı Afrika'da kanser ilişkili ölümlerin ana nedenidir. Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Avustralya ve Yeni Zelanda'daki düşük serviks kanseri oranlarının ise başarılı sitolojik tarama politikaları nedeniyle olduğu düşünülmektedir(Arbyn ve ark.,2020).

Serviks kanserinde, özellikle ortalama tanı yaşı, diğer major kanser tipleri ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğundan oransal olarak daha uzun yaşam yılı kaybına neden olmaktadır. Bu da aslında HPV enfeksiyonunun ve sonuçlarının ne kadar önemli bir halk sağlığı sorunu olduğunu bize tekrar hatırlatmaktadır. HPV ile birlikte, diğer cinsel yolla bulaşan hastalıklar (HIV ve Klamidya trachomatis), sigara, oral hormonal kontraseptifler gibi kofaktörler de global servikal kanser etkisine katkıda bulunmaktadır (Arbyn ve ark.,2020; de Martel ve ark.,2012).

2.4.1. HPV ve Servikal Karsinogenez

Serviks kanseri iyi tanımlanmış ve üzerinde çok sayıda çalışmalar yapılmış preinvaziv faza sahip bir kanserdir. Bu fazda yapılan serviks kanseri taramalarında hastalık yakalanabilmekte ve invaziv kansere progresyon öncesinde tedavi edilebilmektedir. Bu preinvaziv hastalıklar; hafif displazi CIN1, orta displazi (CIN2) ve şiddetli displazi/karsinoma insitu (CIN3) olarak, histolojik anormalliklerin görüldüğü geniş bir spektrumda incelenmektedir (**Şekil 2.4.**).



Şekil 2.4. Human papillomavirüs'ün neden olduğu klinik tablolar (Kombe Kombe ve ark.,2020)

Karsinogenez süreci için HPV ile kronik ve persistan enfeksiyon gerekli ancak yeterli değildir. Çok sayıda endojen ve eksojen etkenler de bu sürece katkıda bulunmaktadır.

Normal hücre siklusunda bazal epitelyal hücreler asimetric olarak çoğalarak bazal tabakayı yenilerler. Hücre diferansiasyonu sırasında bölünme sayısı apikal epitelin formasyonu ile sınırlıdır. YR HPV enfeksiyonunda hücre bölünmesinde devamlılık meydana gelir. Bu moleküler düzeyde E6 ve E7 proteinlerinin hiperekspresyonu ile sağlanır. E6 ve E7 onkoproteinlerinin hiperekspresyonu ise, viral genomun host genomuna entegrasyonu sonucu bazı genlerin ekspresyon kaybı (p97'yi negatif regüle eden E2 proteini geni) sonucu ortaya çıkmaktadır. E2 proteini baskısı olmadığında p97 serbestçe , HPV ilişkili hastalıkların ortaya çıkmasına neden olan E6 ve E7 ekspresyonlarını indüklemektedir (Moody,2017; Moody ve Laimins,2010; Pett ve Coleman,2007).

Primer enfeksiyon sonrasında enfeksiyonla ilişkili klinik durumları tanımak oldukça zordur. Serviks kanseri taraması yapıp anormallik saptanmadığı sürece asemptomatik olarak atlatılır. Ayrıca kadınların %98 'i HPV virüsüne maruz kaldıkları halde %30- 40 kadarı enfeksiyona uygun ortam oluşturmaktadır. HPV enfeksiyonu her iki cinsiyette de %75-90 civarında geçici bir enfeksiyon olarak atlatılmaktadır. Enfeksiyon persistans gösterdiğinde sırasıyla servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) 1, 2, 3 klinik tablosu

gelişmektedir. Yüksek gradeli (CIN2-3) lezyonlardan sonra kansere progresyon riski ise %3.3 olarak bildirilmiştir (Kombe Kombe ve ark.,2020).

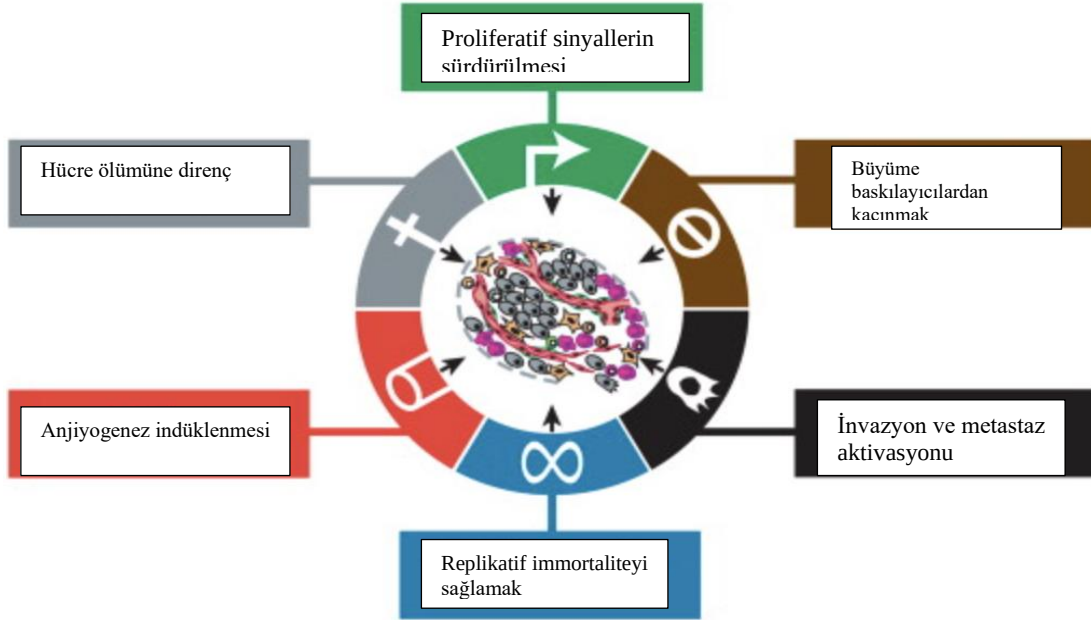
HPV enfeksiyonunda eliminasyonu süresi (2.5yıl) ; enfekte olunan HPV tipi, viral yük, immün durum, ve enfeksiyonun anatomik orijini ile ilişkilidir (Kombe Kombe ve ark.,2020). Bu durumların servikal kanser için risk faktörü oluşturan immünsupresyon, sigara içimi, oral kontraseptifler, yüksek parite diğer cinsel yolla bulaşan hastalıklar (özellikle klamidy), HIV ile benzerlik gösterdiğine dikkat edilmelidir. Ayrıca, son yayınlarda vajinal mikrobiyomun hastalık progresyonuna karşı protektif ya da stimüle edici rol oynayabileceği de ortaya konmuştur (Graham,2017). Enfeksiyonun elimine edilemediği durumlarda persistans gelişmekte ve preinvaziv süreçlere doğru progresyon başlamaktadır. Ancak persiste enfeksiyon klerens sonrası reinfeksiyonla karıştırılmamalıdır ki reinfeksiyon ile CIN3 gelişme riski, edinilmiş immünite nedeniyle persiste enfeksiyona göre 6 kat daha azdır (Gilham ve ark.,2019). Günümüzde bilinmektedir ki bu preinvaziv ve invaziv süreçlere progresyonda persiste enfeksiyon durumu oluşması gereklidir. Ancak persistans kavramı bazı durumlarda farklı tanımlanabilmektedir. Bazı çalışmalarda persistans ; iki farklı ölçümde HPV DNA test pozitifliği olarak tanımlanmış, ancak bu test arası süre bilinemeyeceğinden ve sabit olmadığından doğru bir tanımlama değildir. Ayrıca tek bir örnekleme ile de persiste enfeksiyon tanısı konyulamamakta çünkü hastanın öncesinde ne kadar süredir HPV DNA pozitif olduğu bu şekilde tespit edilememektedir.

Günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda YR HPV pozitif olan kadınlarda , yüksek viral yük özelliği gösterenlerde, sitolojik anormalliklerin daha sık görüldüğü gözlenmiştir. Bu tarz bir ölçümün HPV tabanlı serviks kanseri taramalarının etkinliğini arttıracığı tahmin edilebilir. Ancak artık daha açıktır ki, viral yük ve hastalık ilişkisi düşünüldüğünden daha karmaşık bir süreçtir. Ayrıca viral yük hastalık şiddeti ilişkisindeki karşıt sonuçlarla birlikte, bazı çalışmalarda viral yükün enfeksiyonun süresi, hastalık klerensi, progresyon ile de ilişkili olmayabileceği gösterilmiştir (Woodman ve ark.,2007).

Multipl HPV tipleri ile enfekte olma durumunda bu tiplerin birbiriyle yarışma ya da sinerji durumunda görev yapma durumu konusunda yayınlar tartışmalıdır. Bir'den fazla HPV suşu ile enfekte olma durumu hem kadınlar hem erkekler için oldukça sık rastlanılan bir

durumdur. Enfeksiyonun doğal seyrini inceleyen çalışmalarda herhangi bir yarışma durumu tespit edilmemekle birlikte yeni bir HPV tipi ile enfekte olma durumu diğer başka bir tiple önceden enfekte olmuş olmakla ilgisiz gibi görünmektedir (Liaw ve ark.,2001; Rousseau ve ark.,2001). Bununla birlikte HPV 58 ile enfekte olma riskinin; HPV 16 ve 18 ile aktif enfeksiyonu olan bir birey için HPV negatif olan bireye göre 7 kat daha yüksek olduğunu gösteren bir çalışma da yayınlanmıştır (Mendez ve ark.,2005). Eğer koenfeksiyon durumunda karşılıklı bir tip spesifik survival avantajı sağlanıyor ise bir HPV tipinin eliminasyonu diğerlerinin doğal seyrinde beklenmeyen bir fayda sağlayabilecektir (Woodman ve ark.,2007).

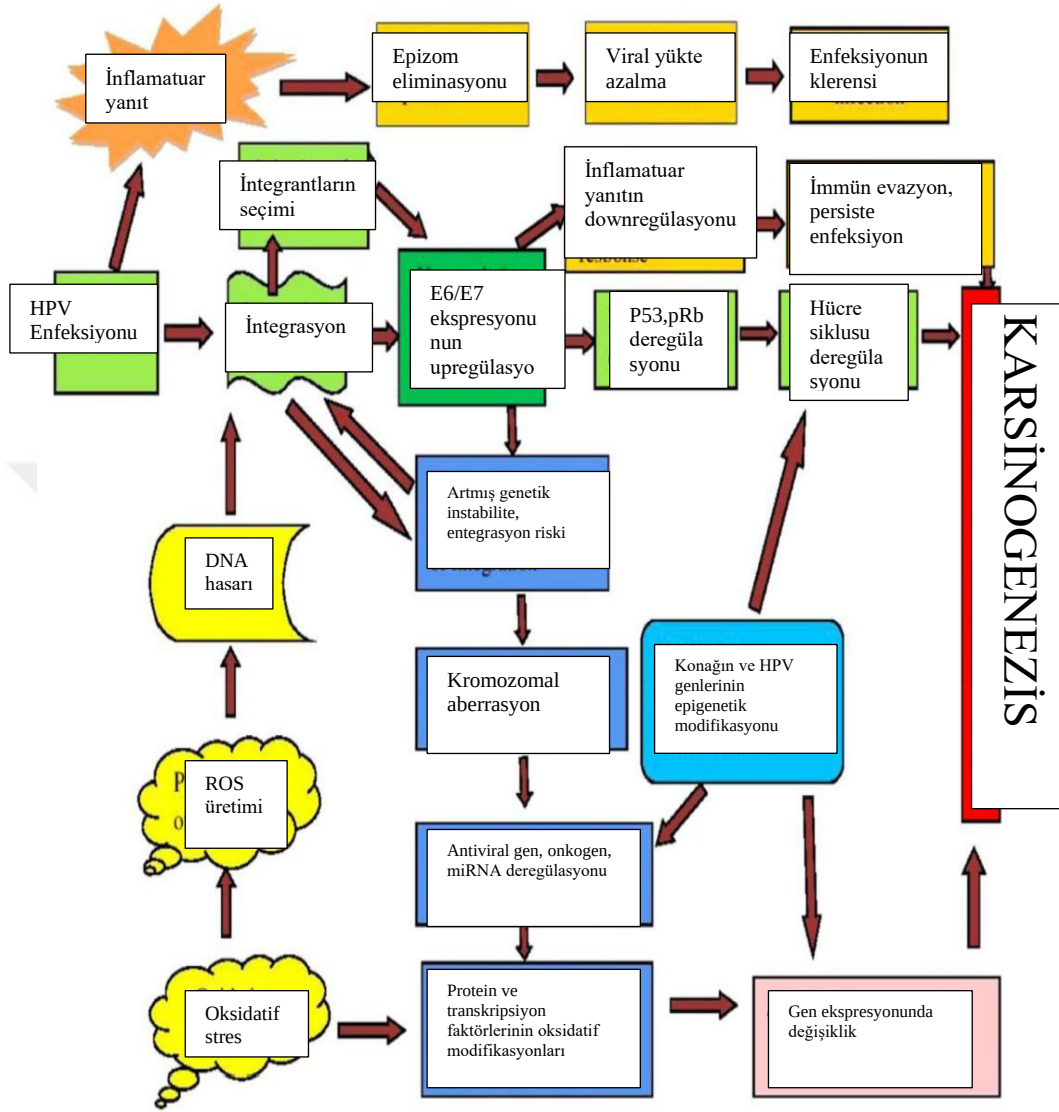
Bütün kanserlerin gelişim basamaklarını ortak olarak açıklayan ve erken karsinogenezin işareti olan altı adet ‘kanser işaretçisi’ sırasıyla şöyledir, kendi büyüme sinyallerini sağlarlar, büyümeyi inhibe edici sinyalleri görmezden gelir, hücre ölümü gerçekleşmez, sınırsız replikasyon gerçekleşir, anjiyogenezi sürdürür, ve dokuları bazal membran ve kappillerler aracılığı ile invaze ederler (Hanahan ve Weinberg,2000). (Şekil 2.5.)



Şekil 2.5. Kanser işaretçileri (Hanahan ve Weinberg,2000)

Normal şartlarda karsinogenezin erken safhalarında tümör gelişimine karşı hücre içi bariyerler, aktif antitümör immün yanıtın gelişimi ile paralellik gösterir. Aşıkır tümör

gelişimi ise tümörün immünolojik özelliklerinde değişiklikler ile koreledir. Son zamanlarda Schreiber ve arkadaşlarının da önerdiği gibi immünsürveyans etkinliğinde azalma da karsinogenezin yedinci özelliği olarak literatüre eklenmelidir (Dunn ve ark.,2004; Smyth ve ark.,2006). Özel olarak HPV ilişkili karsinogenezde anahtar rolü olan onkoproteinler, E5,E6 ve E7 dir. Bu proteinler hepsi aynı sonuca yönelik olarak birarada çalışarak, hücre siklus progresyonunu, keratinosit diferansiasyonunun gecikmesini ve apoptozun inhibisyonunu sağlayarak, host üzerinde viral replikasyon için uygun ortamın oluşmasını sağlarlar. Bu anahtar proteinler aynı zamanda enfeksiyonun persistansını sağlayan immün yanıt evazyonununda da rol oynamaktadır. Bu YR HPV enfeksiyonunun oluşturduğu uzayan enfeksiyon ortamında, daha sonra maligniteye transformasyona neden olacak genetik mutasyonların kazanılması gerçekleşmektedir (Scarth ve ark.,2021). Bu proteinlerin hangi mekanizmalar ve etkileşimler aracılığıyla bu süreçlerde rol oynadığına bakacak olursak; E7 proteininin, p107 ve p130 proteinleriyle bağlı bulunan retinoblastom proteininin parçalanması yoluyla hücreyi S fazına ilerlettiğini görmekteyiz. E6 proteini eş zamanlı olarak, proteozom aracılı parçalanma için p53 proteinini hedeflemekte, anormal S fazı girişleri nedeniyle oluşan DNA hasarına yanıt olarak ortaya çıkan proapoptotik sinyallerin inhibe edilmesinde rol oynamaktadır. Ek olarak E6 konak sinyal yollarından Hippo ve JAK/STAT yollarını modüle ederek proliferasyonu daha çok arttırmakta ve diferansiasyonu geciktirmektedir. E5 proteininin rolü tam anlaşılmamakla birlikte, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ile indüklenen sinyal yolağı aracılığıyla hücre proliferasyonunu sağladığı bilinmektedir (Scarth ve ark.,2021). HPV ve ilişkili servikal karsinogenez **Şekil 2.6.**'da özetlenmiştir.



Şekil 2.6. Human papillomavirüs ilişkili servikal karsinogenez (Wang ve ark.,2018)

2.5 HPV Enfeksiyonu ve İmmün Sistem

2.5.1 Kadın Genital Sistem İmmünolojisi

Dişi üreme sistemi benzersiz bir immünolojik bölgedir. Mukozayı çeşitli invaziv patojenlerden korurken kommensal mikrobiyotaya karşı toleransı korur ve allojenik olarak farklı bir fetüsün gelişimine zarar vermeyecek ortamı gebelik boyunca sürdürebilmektedir. Menstrüel siklus boyunca doku remodellingini sağlayan ve gebelik sürecindeki immün defansı sürdürebilen özelleşmiş bir bölgedir. Dişi genital sistemi mukoza özellikleri diğer mukozalara göre daha az çalışılmıştır. Bunun altında yatan nedenin menstruasyonla ilişkili bariz anatomik ve fizyolojik değişikliklerin gerçekleştiği sırada , anne , bebek ve mikrobiyotaya gibi üç farklı ve bağımsız genetik yapının süreçlere eşlik ediyor olması ön planda yer almaktadır. Buradan anlayacağımız üzere dişi genital sistem immünolojik olarak steril bir ortam değil, immünolojik olarak aktif bir ortamdır. Dişi genital sistemini enfekte eden literatürde tanımlanmış otuzdan fazla parazit, bakteri ve virüs vardır. Bunlar Trikomonas vajinalis, Neisseriya gonore, Klamidya trahomatis, Treponema pallidum, Herpes simplex virüs tip 2, Human papilloma virüs, İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve hepatit B virüsü. Bütün bu patojenlere karşı mevcut doğal immünite ve adaptif immünite mekanizmaları kullanılmaktadır. Bu koruyucu mekanizmalar her basamakta hormonal değişikliklerden etkilenmektedir. Örneğin en çok çalışılan patojen ajanlardan biri olan HIV için bir zararlılık penceresi tanımlanmıştır. Menstrüel siklusun 24-31. günleri yani geç sekretuar fazda viral transmisyonun daha fazla görüldüğü bu dönemin de zararlılık penceresi olarak değerlendirildiği görülmüştür. Burada östrojenin CD4 T hücrelerinde ve makrofajlarda HIV enfeksiyonuna hassasiyeti azalttığı görülmüştür. Bir çok çalışma zararlılık penceresi kavramının diğer cinsel yolla bulaşan hastalıklar için de tanımlanabileceğini göstermiştir. Örneğin gonokokal ve klamidyal pelvik inflamatuvar hastalıkların menstruasyon sırasında ya da hemen öncesinde daha sık görüldüğü ortaya konulmuştur.

Dişi genital sistemindeki doğal bağışıklık mekanizmaları, koruyucu mukus tabakası, sıkı epitelyal bariyer, antimikrobiyal peptidlerin sekresyonu, doğal bağışıklık hücreleri ve epitelden salgılanan sitokinlerdir. Ayrıca menstrual siklus boyunca gerçekleşen hormonal

değişiklikler; sperm migrasyonu, fertilizasyon, implantasyon ve gebelik süreçleri için gerekli optimizasyonu sağlayan immün sistem değişikliklerini regüle eder.

2.5.1.1.Bariyer Koruma

Mukozal immünolojik bariyer korumasına epitel hücreleri, mukus, ve pH katkıda bulunmaktadır. Üst dişi genital sistemi, endometrium, endoserviks, ve fallop tüpleri tek katlı kolumnar epitel ile döşelidir ve epitel hücreleri arasında sıkı bağlantılar mevcuttur. Estradiol bu sıkı bağlantıların integritesini azaltarak etki etmektedir. Epitel altı stroma da sitokin ve büyüme faktörleri salgılayarak epitel bariyer integritesini direk olarak etkiler. Örneğin TNF alfa transepitelyal rezistansı azaltarak bariyer korumanın azalmasına artmış patojen translokasyonuna neden olmaktadır. Alt dişi genital sistem vajina ve ektoserviksten oluşmaktadır ve çok katlı non-keratinize squamöz epitel ile döşelidir. Dış squamöz tabaka alttaki tabakaları koitus sırasında gerçekleşecek abrazyonlardan etkin biçimde korumaktadır. Sıkı bağlantıların olmaması küçük moleküllerin epiteller arası boşluklardan geçişine izin vermektedir. Bu durum patojenlerin de intraepitelyal transportuna neden olabilmektedir. Fiziksel bariyer olma özellikleri dışında uterus ve vajinal epitel hücreleri, toll like reseptör, NOD like reseptör gibi patern tanıyıcı reseptörleri eksprese etmektedirler. Bu reseptörler patojen ilişkili moleküler paternleri tanıyarak, sitokin, kemokin ve antimikrobiyal peptidlerin sekresyonunu sağlamaktadır.

Ektoservikte, CD45 + hücrelerin yaklaşık 1/3 kadarını T hücreler oluşturmaktadır ve bunlar lenfoid agregatlar oluşturma kapasitesine sahiptir. Servikal T hücrelerin %40 kadarı CD4+ T hücrelerdir ve çoğunluğu efektör memory ya da efektör fenotipe sahiptir. Diğer %60 lık kısmı oluşturan CD8+ T hücrelerin ise yine çoğunluğunu efektör fenotip oluşturmaktadır. Bu da serviksin hücre aracılı immünitede etkin bir bölge olmasını açıklamaktadır. NK ve B hücreler de bu bölgede bulunmakla birlikte T hücrelerden daha az sıklıkta yer almaktadırlar. Hem T hücreler hem de B hücreler ektoservikte endoservikse göre daha yoğun olarak yer almaktadır. Bu durum da mikrobiyal yük ile pozitif koreledir. Ayrıca CD8+ T, B ve NK hücreler menopozdan sonra azalmakta bu da servikal immün hücrelerin hormonal regülasyona maruz kaldığını göstermektedir. Myeloid antijen sunan hücreler de hem ektoservikte hem endoservikte bulunmaktadır. Antijen sunan hücreler olarak CD14+ hücreler en yüksek sıklıkta bulunmakta, en büyük

popölasyon CD11c negatif makrofajlar, ardından henüz makrofaj diferansiasyonu göstermeyen monositler ya da dendritik hücreler olan CD11c pozitif hücrelerdir. Konvansiyonel dendritik hücre alt tipleri de CD14 negatif antijen sunan hücreler kategorisinde yer almaktadırlar. Bu hücreler her ne kadar periferel kandan daha fazla olsa da CD14 pozitif hücrelerden daha azdır.

Bir diğler bariyer korumada görevli yapı mukustur. Mukus, müsün olarak bilinen glikolize protein ailesinden oluşmaktadır. Kalın jel yapı içerisinde patojeni hapsederek etkili olur. Bazı patojenlere direk adeze olabilir. Müsün içerisinde bulunan immünglobulin ve antimikrobiyaller de patojenlerin epitelyal mukozayı enfekte etmesini engelleyerek etkili olurlar. Servikal kriptlerden sekrete edilen mukus iki tiptir. Östrojenik mukus ince ve sulu iken düşük viskozite özelliğı gösterir ve sperm geçişine izin verir. Proliferatif faz boyunca bulunur ve ovulasyonda artar. Progestasyonel mukus ise kalın, yapışkandır ve sperm geçişini engeller. Ovulasyon sonrasında sekretuar fazda yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Mukusun ph değeri de, diğı genital sistemi immünitesinin önemli bir komponentidir. Normalde ph değeri 4-5 aralığında yani asidiktir. Bu asidik mikroçevre kommensal bakteriler tarafından salgılanan laktik asit ile sürdürölmektedir.

2.5.1.2.Doğal Bağışıklık Hücreleri

Makrofaj, dendritik hücrler, natural killer hücreler ve nötrofiller diğı genital sistemi immünitesinde rol alan doğal bağışıklık hücreleridir. Makrofaj ve dendritik hücreler patojenleri fagosit eden ve onları asidik ve enzimatik sindirime uğratan önemli hücrelerdir. Profesyonel fagositler olan makrofajlar, patojenin tanınması, debrilerin uzaklaştırılması, immün sistemin sitokin ve kemokinlerle indirek stimölasyonu ve inflamatuvar yanıtın gelişmesini sağlamaktadır. Sayı olarak en çok endometriyal stroma ve myometriyal bağ dokuda olmak üzere diğı genital sisteminde bulunan lökositlerin %10 kadarını oluşturmaktadır. Makrofajların endometriyuma migrasyonu estrojen ve progesteron ile regüle edilmekte ve endometriyumda en yüksek sayıya ise menstruasyondan hemen önce ulaşmaktadır. Vajinal makrofajlar ise siklus boyunca aynı sayıda kalmaktadırlar.

Dendritik hücreler, diğı genital sisteminde major antijen sunan hücrelerdir ve doğal ve adaptif immünite arasında bir köprü görevi görürler. endometriyumun subepitelyal

stromasında lokalizedir. Vajinal dendritik hücreler ise epitelyal tabaka içinde yerleşiktirler. Patojene maruziyet ve inflamatuvar uyarı dendritik hücrenin maturasyonuna ve CD38 ekspresyonu ve IL12 üretimine neden olmaktadır. Matür dendritik hücreler immün yanıtın T helper 1 yönünde gelişmesini desteklerler. Dendritik hücreler direk inaktivasyonla ve adaptif immüniteyi stimüle ederek enfeksiyondan korumaktadır. Dendritik hücreler sadece primer immün yanıtın indüklenmesinde değil, immünolojik toleransın indüklenmesi ve başarılı gebeliğin sürdürülmesinde de önemli rol oynarlar. Dendritik hücrelerin fonksiyon ve diferansiasyonu sitokinler, kemokinler ve estradiol tarafından oluşturulan lokal mikroçevre tarafından belirlenmektedir. Yakın zamanda uterin epitel hücrelerinden salgılanan meidatörlerin lokal dendritik hücrelerde kostimülator proteinlerin azalmış ekspresyonları ile karakterize tolerojenik fenotipe yol açtığı gösterilmiştir. Profesyonel antijen sunucu hücreler olarak makrofaj ve dendritik hücreler enfeksiyon sırasında adaptif immün yanıtın oluşturulmasında oldukça önemlidir. Patojene maruziyet ve fagositoz, makrofaj ve dendritik hücrelerin maturasyonunu ve tip1 ve tip2 major histokompatibilite kompleksleri (MHC)'de antijenin prezentasyonunu indüklemektedir. Bu moleküller üzerinde naive T hücrelerine antijen sunumu patojen spesifik adaptif immünitenin ekspansiyonu ile sonuçlanır.

Natural killer hücreler sitotoksik aktivite gösterirler, inflamatuvar yanıtı kuvvetlendirir, makrofaj aktivasyonu sağlar, sitotoksik T hücrelerin oluşmasına yardımcı olurlar. Sistemik lökositlerin yaklaşık %10 kadarını oluştururken, endometriyumdaki mukozal lökositlerin %70 kadarını oluşturur. Host defansı, implantasyon ve gebelik süreçlerinde rol alır. Üreme sisteminde yer alan natural killer hücreler fenotip olarak dolaşımda olanlardan farklılık gösterirler. Endometriyumda yerleşik natürel killer hücrelerin sayısı menstruel siklus boyunca değişmekte ve sekretuar fazda lökosit popülasyonunun %70'ini oluşturacak şekilde pik yapmaktadır. Diğer genital sistem bölgelerindeki sayıları ise menstruel siklus ile farklılık göstermemektedir ve bölgedeki lökositlerin %10-30 kadarını oluşturmaktadır. Kan natürel killer hücrelerine benzer şekilde uterin natürel killer hücreleri proinflamatuvar sitokinler üretmekte ve inflamatuvar yanıtı provake etmekte, makrofaj aktivasyonunu ve sitotoksik T hücre jenerasyonunu indüklemektedir. Kan natürel killer hücrelerinden farklı olarak ise uterin natürel killer hücreleri ek olarak anjiyogenik büyüme faktörleri sentezlemektedir. Natürel killer hücre fonksiyonları

defektif olan bireylerde artmış herpers simpleks enfeksiyonlarının görüldüğü bilinmektedir. Artmış NK hücre aktivitesi ise tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkilidir.

Nötrofiller bütün dişi genital sistem boyunca yerleşmekle birlikte NK hücrelerin tersine sayı olarak en fazla fallop tüplerinde bulunmakta, progresif olarak alt genital sisteme doğru azalmaktadır. Kemokin gradyenti boyunca nötrofiller endotelial bariyeri geçer, patojenleri fagositoz ile elimine eder, toksik oksijen ve nitrojen ürünleri üretir, sitokin ve defensin-serin proteazlar gibi antimikrobiyal ürünler üretir. IL-8 major nötrofil kemoatraktan sitokinidir. Sayıları menstruel siklus boyunca nispeten sabittir. Ancak endometriyumda menstruasyon sırasında belirgin derecede artmaktadır. Bu artışın iki amacı vardır. Birincisi daha sonra matrix metalloproteinazlarını aktive edecek elastaz salgılanması yoluyla endometrial dokuların yıkılması ikincisi ise epitelyal bariyer bozulmasıyla azalan bariyer fonksiyonunu desteklemektir.

2.5.1.3. Antimikrobiyal Peptidler

Dişi genital sisteminden izole edilen sekresyon geniş spektrumlu antimikrobiyal peptidler içermektedir. Bunlar ; defensinler, kemokinler, antiproteazlar ve çeşitli enzimlerdir. Defensinler membranda por formasyonu oluşturarak bakterileri direk öldürürken diğerleri kemoatraktan özellik gösterip doğal ve adaptif immünite hücrelerini bölgeye akümüle etmektedirler. Defensinler alfa ve beta olmak üzere ikiye ayrılırlar. Alfa defensinler ise insanlarda 6 farklı molekül olarak bulunmaktadır. Gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel, antifungal ve HIV ve HSV ye karşı antiviral aktiviteleri bulunmaktadır. Ancak alfa defensin HIV enfeksiyonunu arttırmaktadır. Beta defensinler de 6 gruptur. Yapısal olarak üretilebilirken mikrobiyal stimülasyon sonrası da sentezlenebilmektedirler. Bazı antimikrobiyal peptidler menstruel siklus ilişkili östrojen değişikliklerinden etkilenebilirken bazıları siklus boyunca stabil düzeyde kalmaktadır. Whey asidik protein ailesinden sekretuar lökosit proteaz inhibitörü ve elafin insan proteaz inhibitörleridir. Elastaz , katepsin G ve proteinaz3 ü inhibe ederler. Bu etkileri konakçı dokularını unregüle inflamasyonun yol açtığı ve proteinazlar aracılı yürütülen hasarlanmadan korumaktadır. Ayrıca antibakteriyel, antifungal ve antiviral etkileri de bulunmaktadır. Laktoferrin de nötrofil ve epitelyal hücrelerden sekrete edilen direk ve indirekt antiviral ve antibakteriyel özellikler gösteren diğer bir moleküldür. İndirekt

etkisini mikroorganizmalar için esansiyel olan ortamdaki demirin sekestrasyonu aracılığıyla yaparlar. Lizozim de yine nötrofiller tarafından sentezlenir bakteri duvarındaki peptidoglikanların lizisine ek olarak nonenzimatik yollarla da bakterileri öldürebilir. Hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı etkinliği bulunmaktadır (Amjadi ve ark.,2014).

2.5.1.4. Sitokin ve Kemokinler

Sitokin ve kemokinler normal hemostatik çevreyi sürdüren, dişi genital sisteminde endometrial proliferasyon, menstruasyon ve implantasyon süreçlerine katılan kimyasal habercilerdir. Bununla birlikte birçok doğal immünite fonksiyonunda yer alırlar. Kemokinler immün hücreleri dokuya çekerken aynı zamanda bu hücreleri farklılaştırır ve aktive eder. Monosit, makrofaj, NK hücreler ve dendritik hücreler gibi immün sistem hücrelerinden salgılanırlar. Kemokin ve sitokinlerin sekresyonu otokrin ve parakrin yollarla ve seks hormonları ile regüle edilmektedir. Bazı çalışmalar, GMCSF, GCSF, TNF alfa, IL-1,IL-6, LIF, TGF beta gibi sitokinler ve MIP-1beta, MCP-1 ve IL-8 gibi kemokinlerin yapısal olarak serviks, uterus ve fallop tüplerindeki polarize epitel tarafından sekresyonunun gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Uterin epitel hücreleri tarafından salgılanan IL-8 nötrofil migrasyonunu indüklemekte iken, MCP-1 ve MIP-1beta monosit ve T hücreler için potent kemoatraktanlardır. TNFalfa, IL-6, GMCSF ve GCSF lökositlerin daha aktif olan proinflamatuvar hücrelere diferansiasyonu tetiklemektedir. IL-8 in kemotaktik aktivitesi yanında erken sekretuar fazda proliferasyon ve anjiyogeneze, menstruasyon sırasında da apoptozise katkısı bulunmaktadır. Birçok çalışma , menstruel siklus boyunca servikovajinal lavajda sitokin seviyelerinde değişiklik gözlemlendiğini ortaya koymuştur . sekresyonları üzerine olan hormonal etkinin direk ve indirek yollarla gerçekleştiği görülmektedir. Örneğin endometriyal hücrelerden progesteron çekilmesinin, IL-8, MCP-1 ve COX-2 upregülasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle virüslere karşı immünitede önemli rol oynayan sitokin ailesi tip 1 interferonlardır. Viral ya da bakteriyel patojen varlığında hızla indüklenmektedirler. Dişi genital sisteminde hangi interferon alt tipinin baskın olduğu lokasyona göre değişmekle birlikte tam bilinmemektedir.

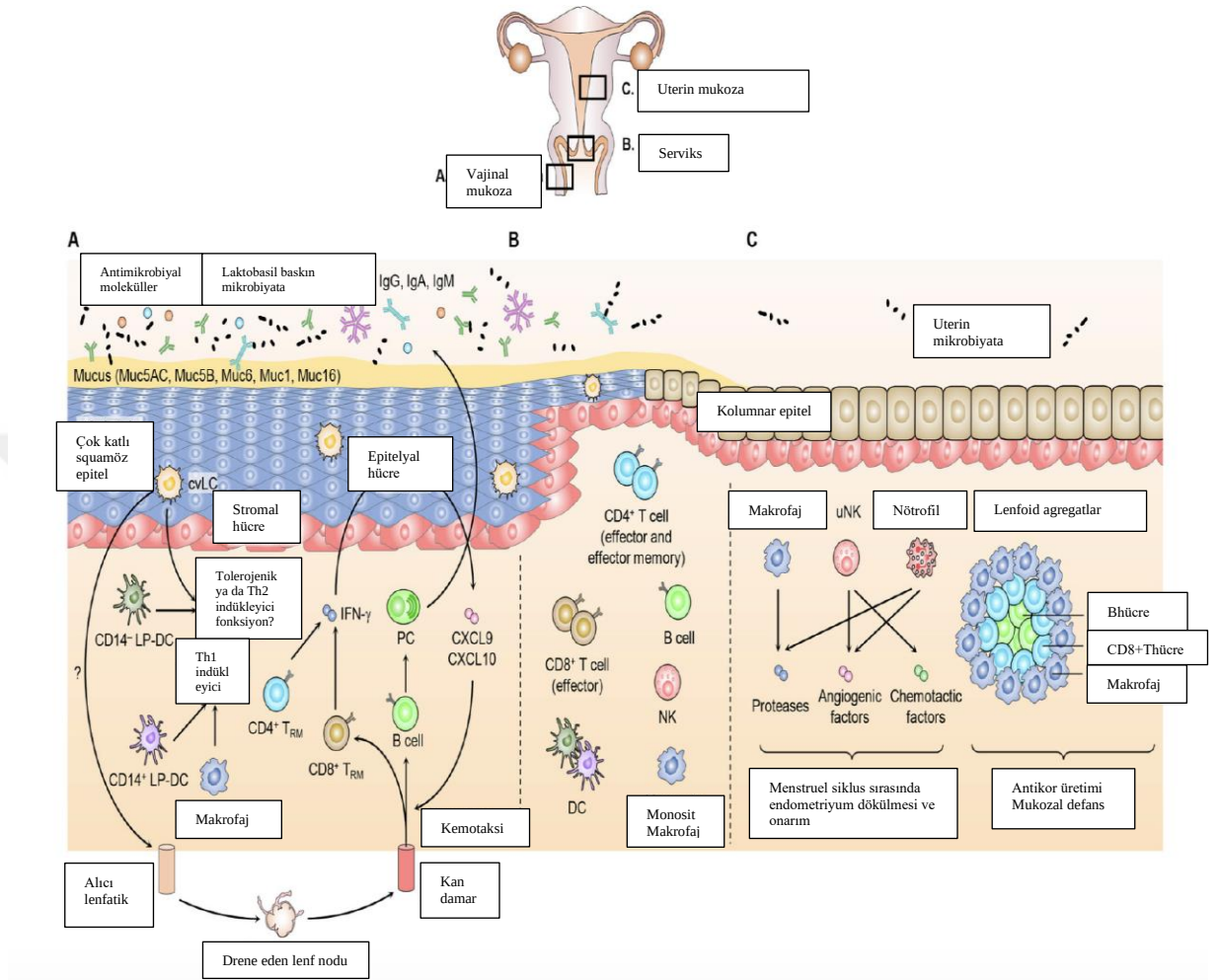
2.5.1.5. Adaptif İmmünite

Adaptif immünite antijen sunan hücrelerin T hücrelere antijen sunumu ve bu hücrelerin stimülasyonu ardından gelişen patojen spesifik immünitedir. Dişi genital sisteminde birçok hücre MHC molekülleri üzerinde antijen sunumu gerçekleştirmektedir. Bunlar; makrofajlar, dendritik hücreler, langerhans hücreleri ve hatta serviks ve endometriyum epitelyal hücreleridir. Adaptif immünite T helper1 (hücre aracılı), T helper2 (humoral), T regülatuar, T helper17 yanıtlarını içermektedir. T helper1 hücre aracılı immünite intraselüler patojenlerin destrüksiyonunu içerir ve primer olarak T lenfositler ile yönetilir. CD8+ sitotoksik efektör T hücreler , hücre yüzeyinde eksprese olan peptid bağlı MHC klas 1 molekülü aracılığıyla patojen ile enfekte hücreleri hedef alırlar. Perforin ve granzyme aracılı sitoliz ile apoptozisi indüklerler. Ek olarak CD4+ T hücreleri, sitotoksik T hücreleri yöneten ve viral replikasyonu direkt bloklayan yüksek düzeyde interferon gamma sekrete ederler. T hücreler vajen, serviks, uterus stromasında epitelin altında yerleşirler, ayrıca intraepitelyal lenfositler olarak adlandırıldıkları epitel içinde de dağılım gösterirler. Dişi genital sistemde CD8+ T hücreler (%35-50), CD4 T hücrelere (%25) göre baskın olarak bulunurlar. Uterin mukozaya spesifik olarak lenfoid agregatlar baskın olarak CD8+ T hücrelerden , santral B hücre çekirdeğinden ve onları çevreleyen makrofajlardan oluşmaktadır. Postmenopozal bireylerde bu agregatların bulunmaması estradiol ve progesteronun lenfoid agregat oluşumu ve büyüklüğünü kontrol ettiğini ortaya koymaktadır. Sekretuar fazda (implantasyon için en olası evre) en büyük boyutta olmaları hücre aracılı immünitenin supresyonunda bir rolü olabileceğini düşündürmüştür.

Humoral immünite antikorların serbest ve hücre ilişkili olarak bulunabilen antijenlere bağlanabilen antikorların üretilmesi ile karakterizedir. Bu şekilde patojenin hücreye girişi ve biyolojik aktivitesi nötralize edilmiş olur. Ayrıca antikor bağlanması patojenin makrofajlar tarafından fagositozunu ve kompleman sistemi tarafından eliminasyonunu da sağlamaktadır. CD4 + T helper hücreler B hücrelerin plazma hücrelerine maturasyonunu sağlayarak humoral immünitede önemli rol oynamaktadır. Immünglobulin A (IgA) sekresyonunun dominant izotip olduğu gastrointestinal ve respiratuar sistem gibi diğer mukozal yüzeylerin aksine genital sekresyonlarda hem immünglobulin G (IgG) hem de sekretuar IgA eksprese edilmektedir. Servikal mukus ve servikovajinal lavaj sıvısında yapılan çalışmalarda IgG düzeylerinin IgA düzeylerinden 2 ila 6 kat yüksek olduğu ortaya

konmuştur. Konsantrasyon gradyenti ile dokudan lümene taşınan IgA'nın aksine IgG estradiol yanıt olarak kandan dokuya oradan da lümene geçiş yapmaktadır . IgG pasif paraselüler difüzyon ya da neonatal Fc reseptörleri ile geçiş yapmaktadır. IgA ise polimerik immünglobulin reseptörlerini kullanmaktadır. Dimerik solubl formda bulunmaktadır. IgG ise monomerdir ve polimerik immünglobulin reseptörlerini kullanmamaktadır. Mukozal sekresyonlardaki IgG nin rolü tartışmalıdır. Bu izotip hem protektif hem de sitotoksik özellikler göstermektedir. Mukozal epiteli destrukte edebilecek kompleman proteinlerinin aktivasyonu, antikor aracılı sitotoksitenin indüksiyonu (Fc reseptör aracılı), gibi özellikleriyle sitotoksik etkide bulunabilmektedir(Reis Machado ve ark.,2014). Humoral yanıtın lokalizasyonunu belirleyen bir diğer etken antijen uygulama yoludur. Örneğin vajinal immünizasyon yapıldığında antikorlar daha çok servikte lokalize olurken, nazal uygulamalarda daha çok vajinada lokalize olmaktadır.

Fertilizasyon sırasında dişi genital sistemi boyunca immün sistem elemanlarında değişiklikler gözlenmektedir. Östrojen baskın proliferatif faz sırasında CD4+ CD25+ Foxp3+ regülatuar T hücreler uterusu genişletir ve uterusu CD8+ T hücrelerin sitolitik aktivitelerinin azaldığı döneme denk gelmektedir. Ayrıca özel intraepitelyal lenfositler olan GDT hücreleri de uterusu bulmakta ve maternal antifetal immün yanıtları baskılamaktadır. Bu hücreler antiviral immün yanıtta doğal ve adaptif immüniteyi köprü görevi görerek ilişkilendirmekte ve interferon aracılığı ile adaptif T helper 1 yanıtını geliştirmektedir. Proinflamatuvar sitokinlerden IL-6 varlığında ise regülatuar T hücreler T helper 17 (Th17) alttipine dönüşmekte, bu hücreler de nötrofil kemotaksisi ve neisseria gonorrhoeae gibi enfeksiyonların klerensini sağlamaktadır (Hickey ve ark.,2011). Kadın genital sistemini özetleyen şekil aşağıda incelenebilir (**Şekil 2.7.**).



Şekil 2.7. Kadın genital sistem immünitesinde rol alan yapılar (Zhou ve ark.,2018)

2.5.2 HPV Enfeksiyonuna İmmün Yanıt

2.5.2.1 Doğal İmmünite

Protektif immünite, nonspesifik doğal imünite ve antijen spesifik adaptif immünitenin birlikte rol aldığı süreçlerin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Doğal immünite tehlike/hasar sinyallerini (mannoz yapıları, ısı-şok proteinleri, DNA,RNA vs) sensörleri aracılığıyla tespit eder . Sentinel hücreler de (epithelial hücreler, dendritik hücreler, langerhans hücreleri) çevreyi sürekli olarak kontrol eder ve immün efektör hücreleri (monosit, makrofaj, polimorfik lökositler ve natural killer hücreler) mukozal dokuların korunması için koordine eder. Bu süreçler, alfa, beta, gamma interferonlar, transforming growth factor beta , alfa, ve çok sayıda interleokinler gibi sitokinler ve immünregülatuar

moleküllerin üretimini içermektedir. Bu moleküller virüsle enfekte hücreler üzerine direkt etki ederek sürece katkıda bulunmaktadır. Servikal epiteldeki DC ve LC, kan ya da dokudan antijenleri alıp işleme özelliği olan özel antijen sunan hücrelerdir. LC, MHC peptid prezentasyonu, kostimülatör moleküller (CD80,86,40), naive T hücre aktivasyonu için sitokin üretimi (IL-12/10) ve efektör hücrelere dönüşebilmek için terminal farklılaşmalarını sağlayacak özellikleri taşırlar (Niedergang ve ark.,2004; Stern,2005). DC tarafından elde edilen entegre bilgi daha sonraki T hücre aracılı T helper 1, T helper 2 ya da Tregülatuar hücre yönündeki farklılaşmayı şekillendirmektedir (Kalinski ve ark.,1999). Thelper 1 yanıtı, virusla enfekte hücrelerin temizlenmesinde önemli olan T sitotoksik hücrelerinin üretilmesini desteklemektedir. Thelper 2 yanıtı ise B hücrelerinin stimülasyonu ve nötralizan antikor üretimi için gerekli izotip dönüşümü sağlayan yanıtı oluşturmaktadır. Ayrıca immatür DC antijen spesifik yanıtıslığı ve toleransı indükleyebilmektedir (Niedergang ve ark.,2004).

Viral infeksiyonlara karşı doğal bağışıklığın başlatılabilmesi için ilk adım virüsün hücre içine girmesini takiben viral genomun tespit edilmesidir. Bunu sağlayan reseptörler patern tanıyıcı reseptörlerdir (PRR). Bu reseptörler hücre yüzeyinde ya da sitozolik yerleşimde bulunabilirler. Hücre içine giren viral RNA membrana bağlı toll like reseptörler (TLR) aracılığı ile de tanınabilirler. DNA virüsü sensörleri DNA dependent activator of IFN regulatory factor (DAI), absent in melanoma 2 (AIM2), NACHT, LRR ve PYD domains containing protein 3(NLRP3), gamma interferon inducible protein 16 (IFI16), siklik GMP-AMP sentaz (cGAS) şeklinde sıralanabilir. Bu yolların çoğu interferon (IFN) salgılanmasıyla sonuçlanan kaskadları tetiklemektedir. Bu kaskadlarda stimulator of interferon genes (STING) proteinleri ve IRF ailesinden proteinler rol almaktadır (Hong ve Laimins,2017). IFN sentezi ardından, ekstraselüler IFN, komşu hücredeki reseptörlerine bağlanarak JAK-STAT yolağını aktive eder ve virüsün hücreye girişini bloke edecek çok sayıda süreçte rol alan proteinlerin sentezlenmesini tetikler.

HPV için primer hedef hücreler olan skuamöz epitelyal keratinositler, HPV patogenezi için en sık araştırılan hücrelerdir. Yeni teorilere göre, transformasyon bölgesi cuboidal hücreler ve rezerv hücreler de HPV'nin hedefleridir (Herfs ve ark.,2012). HPV'nin özellikle transformasyon zonunu tercih etmesinin ve bu bölgenin preinvaziv lezyonlar için

hassas bölge olmasının altında bu bölgenin immünolojik olarak zayıf bir nokta olması yatmaktadır. Bir çok çalışmaya göre transformasyon zonunda langerhans hücreleri sayıca az ve immünsupresif bir sitokin olan IL-10 miktarı ektoservikse göre daha fazladır. Keratinositler hedef hücrelerdir, aynı zamanda HPV'ye karşı ilk savunma kalkanıdır. TLR'leri (Toll Like Reseptör) eksprese ederler, sitokinler salgırlar ve IFN gama tarafından uyarıldıktan sonra profesyonel olmayan antijen sunan hücre özelliklerine sahiptirler. NK hücrelerinden salgılanan IFN gama, keratinositlerde MHC II ve CD40 ekspresyonuna yol açar. Keratinositlerin diğer hücrelerle bu şekilde iletişimi, dendritik hücre fenotipini ve T hücre polarizasyonunu belirleme yeteneği sağlar (Herfs ve ark.,2012). Bir takım viral immün evazyon stratejisi keratinositlerin azalmış aktivasyonuna yol açmaktadır. Viral onkoproteinler keratinositte birçok genin ve nfkb gibi transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu değiştirir bunun sonucunda sitotoksik T lenfosit aktivitesi, antijen sunumu, hücre-hücre iletişimi , kemoatraksiyon ve patern tanıyıcı reseptör sinyalleşmesi etkilenir. Bunun sonucunda da E-kaderin, TNF alfa, interferon, interferon regülatör faktör-1, IL-6,IL-8,TLR-9, TAP-1, CCL-2, makrofaj inflamatuvar protein 1 alfa düzeyleri azalır (Bashaw ve ark.,2017). Sonuç olarak dengede bulunan proinflamatuvar ve kemotaktik mekanizmalar hasar görür ve kronik enfeksiyona yol açar. Keratinositlerden köken alan artmış ve zarar verici proinflamatuvar yanıt protumorojenik ortam yaratarak karsinogenezi destekleyebilir. Artmış IL-1beta, IL-6 ve IL-8 sentezi diğer proinflatuar COX2 ve CCL20 genlerini indükler ve diğer inflamatuvar hücreler olan tümör asosiye makrofajlar ve T helper 17 hücrelerini bölgeye çeker. Bu hücreler tümör büyümesi, anjiyogenez ve kanser gelişimi ile ilişkilidir.

Normalde serviksteki squamöz epitelin immünsüveyansı LC ve immatür DC tarafından sağlanmaktadır. Deride ve mukozada bolca bulunan LC antijeni alır ve işler ardından B ve T hücelere bu antijeni sunarak virüslere karşı doğal ve adaptif immüneyi tetikler. Squamöz intraepitelyal lezyonlarda LC dansitesinde bir artış görölmesine rağmen bunların fonksiyonunda bir azalma olduğu bilinmektedir (Giannini ve ark.,2002). LC'ler, epiteli istila eden virüslere karşı bağışıklık tepkisinde büyük rol oynayan uzmanlaşmış hücrelerdir. Bunlar intraepitelyal tabakada bulunur ve yüksek antijen sunma ve CD4 / CD8 lenfositleri stimüle etme kapasitesine sahiptir. Antijen sunumu tehlike sinyalleri olmadan gerçekleşirse, LC üzerindeki uyarıcı moleküllerin bulunmaması

nedeniyle T hücresi toleransı oluşabilir. Buna göre, Da Silva ve ark. Yüksek riskli HPV kapsidlerine maruz kalan sağlıklı donörlerden türetilen LC'lerin, fonksiyonel olarak olgun APC'ler olmadıklarını ve bu nedenle HPV16'ya özgü sitotoksik T-hücre yanıtlarını başlatamadıklarını göstermiştir (Da Silva ve ark.,2015). Ayrıca, Shannon ve ark. HPV enfeksiyonunu temizleyen kadınlarda artmış sayıda LC bulmuşlardır (Shannon ve ark.,2017). Bu nedenle, LC'nin sayısının ve fonksiyonlarının HPV klirensinde önemli bir rolü vardır.

Dendritic hücreler toll like reseptörler ile patojen üzerindeki özel patternleri tanır ve major histokompatibilite kompleksi üzerinden antijenleri T hücelere sunar. Toll like reseptörler virüse karşı gelişen doğal immünitede önemli rol oynar. Doğal bağışıklık hücrelerinin birçok çeşidinde bulunur ve PAMP ve DAMP olarak bilinen endojen ve eksojen tehditleri tanır. Toll like reseptörlerin aktivasyonu doğal bağışıklığı tetikleyen proinflamatuvar bir ekspresyon profili oluşturur. Çift zincirli HPV DNA en belirgin olarak Toll like reseptör 9 tarafından tanınır ve interferon alfa, beta, gamma kaskadı başlatılmış olur. HPV tarafından hedef alınan toll like reseptör ve interferon yolları virüsün karsinojenik potansiyelinde rol oynamaktadır. HPV 16'nın tümörojenik E6 ve E7 genlerinin TLR9 downregülasyonu ile ilişkili olduğu görülmektedir (Hasan ve ark.,2007). Serviks kanserinin güncel tedavi hedeflerinden bazıları da bu birtakım toll like reseptörlerinin upregülasyonu ile ilişkilidir. Matür DC, CD11c, CD40, CD80, CD83, CD86, CD209 ve HLA-DR markerları için pozitifdir ve HPV'ye karşı gelişen immün yanıtta esansiyeldir. Plastisite özelliği ve multipl reseptör bulundurması nedeniyle immün sistemdeki birçok hücre ile iletişim halindedirler. Bu nedenle de antiviral ve antijen spesifik immün yanıtın oluşmasında kritiktir. HPV ilişkili kanserlerin oluşumu ve gelişmesi dendritik hücrelerin sayısı, aktivite ya da maturasyonlarındaki değişiklik ile bağlantılıdır. Malignite progresyonu ile CD40, CD80, CD86 gibi kostimülatör markerların ve PD-1, PD-L 1 ve CTLA-4 gibi inhibitör markerlarının ilişkili olduğu gösterilmiştir. Servikal kanser hücrelerinin CCR7 depleksyonu sağlayarak dendritik hücrelerin lenf noduna migrasyonunu baskıladığı ve dendritik hücrelerin MMP-9 üretmesi yönünde destekleyerek tümör oluşumuna uygun ortamı yarattığı gözlenmiştir (Pahne-Zeppenfeld ve ark.,2014). CD40/CD40L ilişkisi kronik HPV enfeksiyonunda CD8 ve CD4 yanıtlarını indüklemek ve dendritik hücre maturasyonunu sağlamak için santral bir rol oynamaktadır. Dendritik hücre yüzeyindeki

PD-L1 markeri regülatuar T hücre ve CD8+ T hücre aktivitelerinin modülasyonu dolayısıyla HPV kaçış yolağı oluşturmak için önemli bir moleküldür. PD-L1+ dendritik hücre subpopulasyonunun yüksek riskli HPV hastalarında daha yoğun bulunduğu ve T helper 1 tip sitokinlerin downregülasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu durumda PD-1/PD-L1 yolağının aktivasyonu T hücreleri fonksiyonel tükenmeye ve anergi durumuna geçmektedirler. Dendritik hücrelere ek olarak PD-L1; stromal hücreler ve M2 makrofajlar üzerinde de kötü prognoz markeri olarak bulunmaktadır. Dendritik hücre aktivasyonu ve sitotoksik T hücre yanıtına karşı inhibitör aktivitesi olan bir diğer yüzey molekülü ise CTLA-4'dür. Bu molekül, B7 reseptör ailesine mensuptur ve regülatuar T hücreleri tarafından eksprese edilir, dendritik hücre yüzeyindeki CD80 ve CD86 ligandlarına CD28'den daha yüksek bir afinite ile bağlanır. Serviks kanserinde yüksek oranda eksprese edilir ve kötü prognoz ile ilişkilidir. TIM-3 diğer bir immün checkpoint proteindir. Artmış regülatuar T hücreler ve M2 makrofaj hücreleri ile ilişkilidir. TIM-3 blokajının ise artmış interferon gamma sentezi ile ilişkili olduğu ve bu nedenle gelecekteki immünterapi seçenekleri arasında bulunduğu bildirilmiştir. Her ne kadar matür dendritik hücreler antiviral immün koruma ile ilişkiliyse de immatür dendritik hücreler yüksek riskli HPV aracılığıyla upregüle olmakta ve host immünsupresyonuna ve immüntoleransa neden olmaktadır. Buradan anlaşılabileceği üzere immün yanıtın dendritik hücreler tarafından kontrolü sitokinlerin tümör mikroçevresinde kesin bir zamanlama ile bulunmasına bağlıdır. Bu moleküller dendritik hücrenin full maturasyonu için gerekli sinyalleri desteklemekte ve uygun alt tipe diferansiasyonuna yardımcı olmaktadır (immün efektör ya da immün supresif) (Barros ve ark.,2018).

Ortamdaki monosit kemotaktik protein 1 ve makrofaj inflammatuar protein makrofajların ortamda agregasyonuna yol açmaktadır. Ancak bu iki molekülün de HPV tarafından direk ya da indirek yollarla downregülasyona uğratıldığını görmekteyiz. Makrofajlar tümörü yabancı hücre olarak algılamaları nedeniyle de tümör etrafında akümüle olmaktadır. Toll like reseptör, lipopolisakkarit ve nonopsonik reseptörler aracılığı ile aktive olduğunda fagositoz ve proinflammatuar sitokin ve oksijen-nitrojen reaktif ürünleri sekresyonu yapmaktadır. Ancak beklenen proinflammatuar ve antitümör fonksiyonları yerine solid tümör mikroçevresindeki makrofajlar hastalık progresyonunda da rol alabilmektedir. Bu

etkilerden sorumlu olan tip klasik olmayan CD163+ CD206+ tümör asosiye M2 makrofajlardır. Bu tümör ilişkili makrofajlar kanser hücresi proliferasyonu ve migrasyon, anjiyogenez ve immün defansın restriksiyonuna yol açabilmektedir. Burada iki farklı makrofaj fenotipinden bahsedilmektedir; M1 proinflamatuvar klasik tip ve M2 immünomodülatuar nonklasik tümör asosiye fenotipler. M2 profili, doku onarımına yardım için artmış vasküler endotelyal growth faktör ve metalloproteaz-9 özelliği gösterirken tümör tarafından aktive edildiğinde bu özellikler bazal membran disrupsiyonu, tümör büyümesi ve metastaz ile sonuçlanmaktadır. Servikal lezyonlar progrese oldukça makrofaj sayısında bir artış gözlenmekte ve HPV ilişkili tümörlerde bu artıştan da esas olarak M2 fenotipindeki makrofajların sorumlu olduğu bilinmektedir (Hammes ve ark.,2007). M2 makrofajlar naive T hücrelerin T regülatuar hücrelere IL-10 aracılığı ile diferansiasyonunu ve sonuç olarak tümör ekspansiyonunu sağlamaktadır. Bu nedenle tümör ilişkili M2 makrofajların deplesyonu immünoterapide olası hedef olarak çalışılmaktadır. Makrofajlar, özellikle TNF ve NO sentezleyen M1 fenotipi tümör hücre lizisi ile lezyon regresyonuna da katkıda bulunabilmektedir. M2 fenotipi daha çok T helper 2 yanıtı oluştururken, M1 fenotipi Thelper 1 yönünde yanıtı desteklemektedir ki bu da HPV klerensiyle ilişkilidir. Makrofajların IL-12, IL-18 ve GM-CSF eksikliği ve CCL17, CCL22, IL-4, IL-10, IL-13 ve CSF-1 artışı nedeniyle M2 alttipine polarizasyonu, T sitotoksik yanıtın baskılanması ve immüsupresyonun stimülasyonu yoluyla tümör oluşumunu desteklediği görülmektedir (Mantovani ve Sica,2010).

Virüslere karşı gelişen doğal bağışıklıkta bir diğer önemli hücre grubu natural killer hücrelerdir. Bu grup hücreler lenfositlerdir ve viral saldırı ya da kanseröz transformasyon nedeniyle stres özelliği gösteren hücrelere, MHC kompleksine ihtiyaç duymadan hızlı yanıt verir . Bazı çalışmalarda HPV 16'ya bağlı gelişen servikal kanser ve yüksek dereceli preinvaziv lezyonlarda natural killer aktive edici reseptörler olan NKp30 ve NKp45 sitolitik fonksiyonları etkileyecek kadar belirgin olarak azalmaktadır (Mantovani ve Sica,2010).

Nötrofiller de fagositoz ve reaktif oksijen molekülleri sekresyonu özellikleri nedeniyle HPV'ye karşı doğal bağışıklıkta rol almaktadır. Nötrofiller enfekte alanda MMP-9 gibi, santral inflamasyon moleküllerini sentezleyerek inflamasyonu destekler. Servikal

kanserde, nötrofiller büyük miktarda bulunmaktadır ve kötü prognoz ile ilişkilidirler. Nötrofil lenfosit oranı da aynı şekilde kötü prognozla ilişkilidir. Klinik evre, tümör boyutu ve lenf nodu metastazı ile ilişkilidir bu nedenle nötrofiller tümör asosiye nötrofil olarak da adlandırılırlar (Barros ve ark.,2018).

HPV yaşam siklusu büyük oranda etrafındaki stromal hücrelerle de ilişkilidir. Bunların içinde ön planda fibroblastlar gelmektedir. Stromal hücrelerin HPV karsinogenezisindeki major rolü, proinflamatuvar bir çevreyi indüklemektir. Ek olarak, stromal hücreler, viral immün evazyonu, matriksin yapısal değişikliklerini, invazyonu, angiogenezi destekler ve kronik enfeksiyon ile ilişkilidir. Fibroblast fenotiplerinden olan kanser asosiye fibroblastları normal fibroblast fenotipinden ayıran spesifik bir marker bulunmamaktadır. Bu nedenle bu konudaki çalışmalar sınırlıdır. Bazı çalışmalarda keratinositler ve HPV ile enfekte hücrelerden salgılanan IL-1betanın normal fibroblasttan kanser asosiye fibroblast fenotipine dönüşümü desteklediği gösterilmiştir (Dudas ve ark.,2011). Farklı fibroblast fenotiplerinin HPV karsinogenezisinde ikisinin de esansiyel olduğu birbirlerini tamamladıkları düşünülmektedir. Normal fibroblastlar inflamasyon, immün evazyon ve proliferasyonun indüklenmesinden sorumlu ve bu da erken safhalardaki HPV ilişkili displastik değişiklikleri desteklerken, kanser asosiye fibroblastlar kanser hücrelerinin sürdürülmesi için gerekli uzamış stimulusu sağlar ve HPV asosiye karsinogenezdeki epitelyomezenşimal transizyon, migrasyon ve metastaz gibi orta ve ileri evre süreçlerde etkin yer almaktadır (Barros ve ark.,2018). Kanser asosiye fibroblastlar çok sayıda proinflamatuvar faktör, kemoatraktan ve ekstraselüler matriks remodelling molekülleri sekrete etmektedir. Bu remodelling kanser hücre polaritesinde değişiklik, migrasyon, hücre-hücre iletişimi ve hücre büyümesini etkilemektedir. Bu kemokinler aracılığı ile M2 makrofajlar, tümör asosiye nötrofiller, mast ve myeloid kaynaklı supresör hücreler gibi immün inflamatuvar ve modulatuar hücrelerin aktivasyon ve atraksiyonu, T lenfosit ve NK sitotoksik yanıtlarının azaldığı, T regülatuar hücrelerin aktivitelerinin arttığı kötü prognostik durumların ortaya çıkışını desteklemektedir.

Myeloid kaynaklı supresör hücreler, bir diğer HPV immünitesinde rol alan hücre grubudur. Monositler ya da polimorfonükleer fenotipte bulunabilirler. Kronik inflamasyonda ve kanserde immünsupresif rol oynayarak yer alabilmektedirler. Genelde

kötü klinik outcome ve tedavi direnci ile ilişkilidirler. Stroma ve tümör hücrelerinden salgılanan çeşitli inflamatuvar mediatörler tarafından aktive edilir ve kanser mikroçevresine toplanırlar. Burada inflamasyon, immünsupresyon, tümör invazyonu ve anjiyogenezi desteklerler. Sitotoksik T lenfosit aktivitesini engeller, interferon gamma downregülasyonu yapar, regülatuar T lenfosit düzeylerini arttırırlar. Buradan aslında HPV tümör hücrelerinin karsinogenezde santral rol oynadıklarını düşünebiliriz. Bu hücreler immünsupresyonu tetikleyen kostimulator ve kemoatraktan mediatörler sentezleyebilmekte ve immatür myeloid hücrelerin supresör hücrelere dönüşümünü tetikleyebilmektedir (Barros ve ark.,2018).

HPV konakçı insan ile beraber evrilirken, yaşam döngüsü boyunca, bağışıklık sisteminden mükemmel kaçınma mekanizmaları geliştirmiştir. Bunlar; virüsün HPV DNA sensörlerini hedef alması, IFN proteinlerinin ekspresyonunu regüle eden IRF proteinleri ile etkileşmesi ve HPV proteininin JAK-STAT yolağının aktivasyonunu bloke etmesi olarak sıralanabilmektedir (Hong ve Laimins,2017). Ayrıca enfeksiyon boyunca virusun yaşam siklusu içerisinde viremi ve sitoliz yoktur, bu nedenle bağışıklık sistemi HPV'ye karşı tepkisiz kalır. Dahası, HPV dökülmeden hemen önce işlemin son kısmına en immünojenik proteinler L1 ve L2'yi gizleyen mükemmel bir replikasyon stratejisi uygular(Deligeoroglou ve ark.,2013; Doorbar ve ark.,2012; Stanley,2012). HPV erken proteinleri (E6,E7) ayrıca, keratinositlerin doğuştan gelen immün sensörlerini doğrudan uyarmaz, bu nedenle keratinosit, immün yanıtın ve iltihabın uygun şekilde başlaması için gerekli olan proinflamatuvar sitokinleri serbest bırakamaz. Sonuç olarak, inflamasyonun olmaması, LC aktivasyonunu ve DC olgunlaşma sürecini engellemektedir [7]. HPV ayrıca MHC I (Majör Histo-Uyumluluk I) ve MHC II'yi (Majör Histo-Uyumluluk II) inhibe eder, intraepitelyal LC sayısını ve E-kadherin ekspresyonunu azaltır; böylece enfekte hücreler MHC I moleküllerini düşük düzeyde eksprese eder ve bu da bozulmuş sitotoksik T lenfosit fonksiyonu ile ilişkilidir (Piersma,2011). Bununla birlikte YR HPV, T regülatuar hücrelerin infiltrasyonunu, IL-10 ya da TGF beta üretimini indüklemektedir. Yapılan çalışmalarda YR HPV enfeksiyonu sırasında T helper1 ve Thelper 2 hücreler arasında bozulmuş bir denge olduğu da gösterilmiştir. İntraepitelyal ve invaziv servikal lezyonlarda belirgin şekilde Thelper 2 sitokin profili olduğu gözlenmiştir. YR HPV pozitif hastaların

servikal eksudatlarında da artmış T helper 2 sitokinleri (IL-10 vs), ve azalmış T helper 1 sitokinleri (IFN, IL-12, IL-2, TNF) tespit edilmiştir (Bais ve ark.,2005). Bu T helper 1 fenotip supresyonunu HPV'nin kendisinin yapıp yapmadığı henüz bilinmemektedir.

İmmünohistokimyasal çalışmalar hayvanlarda ve insanlarda genital, anal, kutanöz wartların regresyonunun, mononükleer hücrelerin (CD4,CD8, CD56 + hücreler ve makrofajlar) lezyon içine masif lokal infiltrasyonu ve Thelper 1 sitokinlerinin ekspresyonu ile karakterize olduğunu göstermiştir(Stanley ve Reports,2015).

2.5.2.2. Adaptif İmmünite

Adaptif immünite patojene karşı spesifik immün yanıtın gelişmesinden sorumludur. B hücreler, T helper , T sitotoksik ve T regülatuar hücreler sorumludur. T helper hücreler CD4+ yüzey molekülleriyle ayırd edilir ve oluşturdıkları sitokin mikroçevresi ile immün yanıtın yönünü belirlerler. Matür ama immünolojik olarak virjin T helper hücrelerin aktivasyonu onların fenotipini belirler ve iki alt tipe T helper1 ve T helper2 diferansiasyonla sonuçlanır. Bu farklılaşma sunulan antijenin tipi, kostimülatör sinyallerin varlığı, antijenin miktarı yapısı ve giriş yolu , antijen maruziyetinin tekrarlar şeklinde olması, adjuvan varlığı ve lokal mikroçevredeki sitokin ve hormonların durumuna göre belirlenmektedir. T helper naive hücrenin T helper 1 fenotipine farklılaşması için ortamda hem interferon gamma hem de IL-12 bulunmalıdır. Farklılaşma sonunda T helper 1 interferon gamma ve IL-2 salgılamakta ve hücre aracılı immünitenin aktivasyonunu tetiklemektedir. T helper 2 fenotipine dönüşüm için ise ortamda IL-4 ve IL-2 gereklidir. Dönüşüm sonrası ise IL-4, IL-5, IL-13, IL25, IL-10 ve amfiregülün salgılanmakta ve humoral immün yanıtın gelişimi sağlanmaktadır. Çalışmalar göstermiştir ki HPV lezyonlarının temizlenmesi için T helper hücrelerinin dominant yanıt olarak ortamda bulunması gerekmektedir. İntraselüler ve ekstraselüler atakların karşılanabilmesi için T helper 1 ve T helper 2 yanıtlarının bir denge içinde bulunması gerekmektedir. Ancak çalışmalar göstermiştir ki HPV lezyonlarında bu hassas denge bozulmuştur. Normalde HPV intraselüler bir ajan olarak T helper 1 immün yanıtını tetiklemelidir. Ancak görülmektedir ki intraepitelyal ya da invaziv servikal HPV lezyonlarında T helper 2 sitokin profili mevcuttur. Bu durumda azalmış T helper 1, artmış T helper 2 yanıtı selüler immünitenin baskılanmasına ve lezyon progresyonuna neden olmaktadır. CD8 + yüzey

markerı ise sitotoksik T lenfositleri işaret etmektedir. Sitotoksik T lenfosit yanıtı ana antijen spesifik immün yanıtıdır ve antijenleri major histokompatibilite sınıf 1 molekülü üzerinden tanır. Hücre aracılı immünite HPV lezyonlarının temizlenmesinde pivotal rol oynar. Çoğu T hücre aktivasyonu E6 ve E7 proteinleri aracılıdır ve destrüksiyon enfekte hücrelerdeki upregüle olan ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin aracılığıyla gerçekleşmektedir (Scott ve ark.,2001). Ancak yinede HPV sitotoksik hücrelere karşı defans geliştirmiştir. HPV E7 onkogeni, MHC sınıf 1 molekülü ile viral antijeni eşleştiren TAP-1 ekspresyonunu downregüle etmekte ve HPV antijen prezentasyonunu suprese etmektedir, bu da HPV için büyük bir immün kaçış taktiğidir. Ayrıca HPV 16 ilişkili E5 proteini MHC/HLA sınıf 1'i downregüle etmektedir. T regülatuar hücreler CD4, CD25 ve transkripsiyon faktörü Foxp3 eksprese eden, normalde toleransın indüksiyonunda gerekli olan bir T hücre alt grubudur. Varlığı immün yanıtı baskılar ve antitümör defans sistemini inhibitör sitokinler aracılığıyla baskılar. Bu hücrelerin TGF beta ve IL-2 aracılığıyla aktivasyonu malignite için kötü prognostiktir. T helper ve sitotoksik T hücrelerin proliferasyonunu da baskılar. Antijen sunan hücreler için elzem olan CD80, CD86 protein ekspresyonunu olumsuz etkiler ve dendritik hücrelerden T hücre popülasyonu için toksik olan indoleamin 2,3 dioksijenaz üretimini provoke eder (Oderup ve ark.,2006). TGF beta'nın rolü tam bilinmemekle birlikte CD4+ hücrelerde Foxp3 ekspresyonunu uyarak onların indüklenmiş regülatuar T hücrelerine dönüşümüne aracılık eder. Son çalışmalar TGF beta1 ve TGF beta2 düzeylerinin lezyon LSIL'den invaziv kansere doğru progresse oldukça arttığı, IL12 ve TNF alfa (klasik T helper 1 paterni) düzeylerinin ise azaldığını ortaya koymuştur. B hücreler ise viral ajanları nötralize ve opsonize eden humoral yanıtı sorumludur. Humoral immünite; antijen sunan hücreler ve T helper 2 sitokin paterni tarafından stimüle edilmekte ve CD4+ helper T hücrelerin B hücrelerin maturasyonunu sonucu antikor üretmesini asistansına bağlıdır. HPV ye karşı gelişen antikorlar ana olarak L1 kapsid proteinine karşı gelişmekte ancak E2,E6,E7 ve L2 ye karşı da zayıf antikor yanıtı tespit edilebilmektedir. Bu antikorların büyük kısmı IgG1 sınıfındandır. Burada iki tip nötralizan L1 antikorı bulunmaktadır. Birinci grup hücre yüzeyine bağlanmayı engellerken ikinci grup antikorlar bazal membrana bağlanmayı engellemektedir. İkisi de viral internalizasyonu, direk bağlanmayı ya da gerekli konformasyonel değişiklikleri bloke ederek engellemektedir. Natürel enfeksiyondan 8-9 ay sonra serokonversiyon ve

nötralizan antikörlerin oluşması beklenir ancak bunların seviyesi düşüktür ve bütün kadınlarda gözlenmez (Carter ve ark.,2000). Doğal enfeksiyon sonrası serokonversiyon immünkompetan bireylerde %60 oranında gerçekleşmesine rağmen, enfeksiyon sırasında antikor üretimi muhtemelen düşük titreler nedeniyle tekrarlayan enfeksiyonlardan korumamaktadır (Viscidi ve ark.,2005). Profilaktik aşılamadaki virüs like partiküllere karşı üretilen L1 nötralizan antikörler, ikinci sınıf antikörlerdir ve natürel enfeksiyonda oluşan yanıtı göre serum düzeyleri daha yüksektir ve uzun dönem çalışmalarda da serum seviyelerinin yüksek kaldığı gözlemlenmiştir (Stanley,2008).

2.5.3 Gamma-Delta T hücreler

Keratinositler, LC, DC, dokuda yerleşik MQ ve intraepitelyal GDT hücreleri, kadın genital kanalının mukozal immün savunmasının hücresel bileşenleridir. Geleneksel olmayan T hücrelerinin prototipi olan GDT hücreleri, ilk savunmada epitel bariyer koruması olarak büyük rol oynar. Bağırsak ve derideki GDT hücreleri çok iyi bilinmesine rağmen, genital mukozal GDT hücreleri oldukça az çalışılmıştır. Alfa beta TCR içeren klasik T hücreleri antijen sunumuna bağımlı ve MHC kısıtlılığı gösterirken, GDT hücreleri , MHC restriksiyonu olmadan , stres ile indüklenen ligandlar ve nonpeptid antijenler gibi çok sayıda antijen çeşidini tanıyabilirler.

GDT hücreleri, periferik kanda (% 10'dan az) küçük bir T lenfosit alt grubunu temsil etse de, ince bağırsakta mukozal % 60'a kadar İntraepitelyal lenfosit (IEL) içermektedir (Cheroutre ve ark.,2011). Değişken (V) delta zincirine bağlı olarak, GDT hücreleri üç alt tipe ayrılır: GDT1, GDT2 ve GDT3. Bunlardan GDT1 hücreleri mukozal dokularda baskın iken gamma komponenti olarak farklı tipleri (gamma 2/3/4/5/8) içerebilir, GDT2 hücreleri esas olarak kanda bulunur ve çoğunlukla gamma komponentini V γ 9 oluşturur (Zhao ve ark.,2018). GDT2 hücreleri CD27 ve CD45RA ekspresyonlarına göre dört farklı fonksiyonel alt tipe ayrılır. CD45RA+CD27+ (naive), CD45RA-CD27+ (lenf nodlarında zengin olan efektör fonksiyonu olmayan santral memory), CD45RA-CD27- (efektör memory), CD45RA+CD27- (inflamasyon alanında bulunan terminal diferansiye tip) . Hem GDT1 hem de GDT2 üzerlerinde taşıdıkları TLR ve NKG2d reseptörleri ile enfeksiyon ve tümör immünitesi sırasında efektör etkilerini gösterirler. GDT3 hücreler ise en küçük komponenti oluşturur, karaciğerde yoğun olarak bulunur, ve kronik viral

infeksiyon süreçlerinde rol alır(Zhao ve ark.,2018). GDT hücreler fonksiyonel olarak da gruplara ayrılabilir; IFN gamma üreten GDT, IL-17A üreten GDT, antijen sunucu GDT gibi. GDT1 hücreler mürin GDT intraepitelyal lenfositlere benzerlik gösterirken gamma9delta2 GDT lenfositleri belli türlere spesifiktir ve sadece insanlarda ve yüksek primatlarda bulunur(Zhao ve ark.,2018).

GDT1 ve GDT2 hücreleri, NKG2D reseptörleri tarafından strese bağlı moleküller olan MICA / MICB'yi tanır. Ek olarak, GDT1 hücreleri, APC'nin MHC sınıfIb'sindeki bakteriyel glikolipitlere yanıt verebilir (Dar ve ark.,2014). Antijen tanımadan sonra, aktivasyon işlemi GDT hücrelerinde başlar, ardından TLR ekspresyonu, sitokin-kemokinlik enzim sentezi ve sitotoksik aktivite, CD4 ve CD8'e antijen sunumu, B hücrelerine yardım ve DClerin olgunlaşması artar.

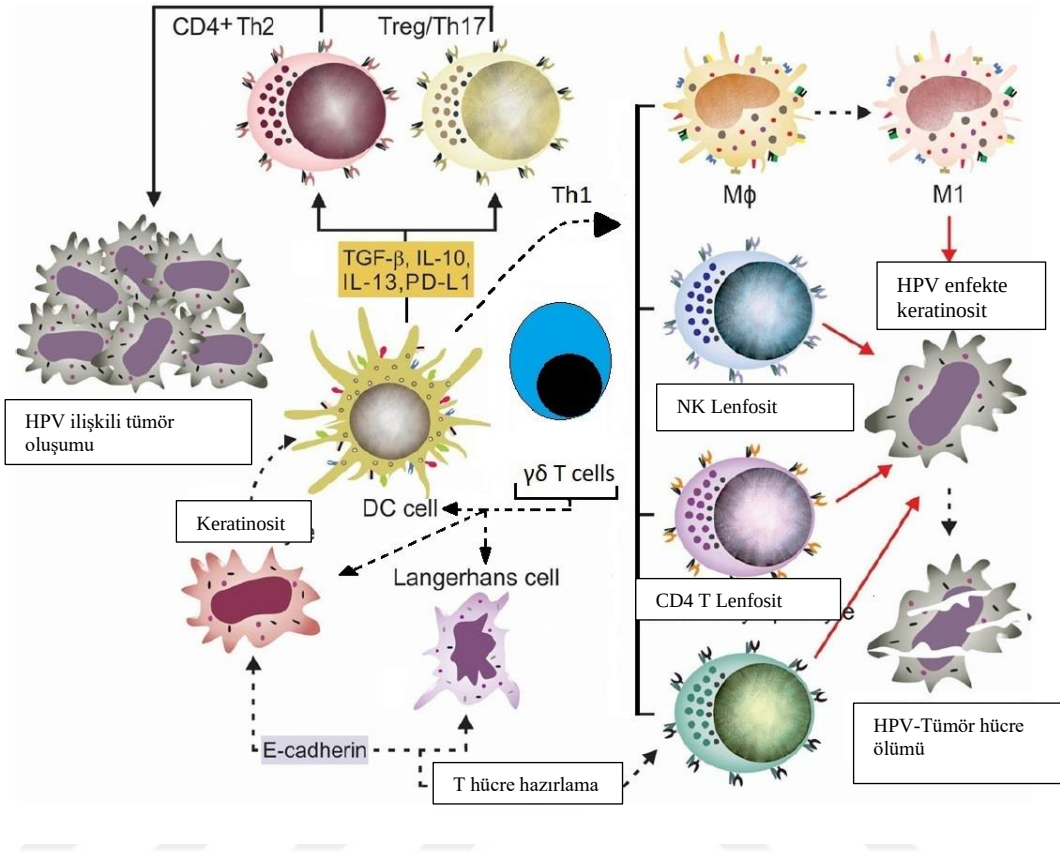
TCR ve GDT ile komşu hücreler arasındaki aksesuar moleküllerin aracılık ettiği karşılaşma, GDT işlevlerinin anahtarıdır (Witherden ve ark.,2018). Antiviral bağışıklıkta bu etkileşimin üyeleri, DC'ler, GDT hücreleri ve TLR'lerdir. Örneğin, GDT hücrelerinin optimal aktivasyonu için GDT hücreleri ve DC arasındaki hücre-hücre teması gereklidir, ayrıca GDT hücreleri DC'lerin antijen sunma özelliğini etkiler (Dar ve ark.,2014). Her ne kadar GDT hücreleri, APC'nin desteği olmadan peptit olmayan antijenlere cevap verebilse de, eğer APC sürece katılırsa, tepki önemli ölçüde iyileşir (Morita ve ark.,1995). Bu hücrelerin efektör fonksiyonlarında aksesuar moleküllerin veya koreseptörlerin olabileceği öne sürülmüştür (Dar ve ark.,2014). Aksesuar molekülün bir örneği olarak, aktifleştirilmiş GDT hücrelerinin PD – 1 ifade ettiği bilinmektedir ve GDT'de PD – 1'in bloke edilmesinin antitümör veya sitotoksik potansiyeli arttırdığı bildirilmektedir (Bhat ve ark.,2018; Iwasaki ve ark.,2011).

GDT hücrelerinin anatomik dağılımı genital mukoza için bilinmemektedir, ancak bu özel alanda diğer IEL'yi değerlendiren çalışmalar vardır. Kojima ve ark. GDT hücreleri dışındaki servikal immün hücre popülasyonu analiz etmiş ve İEL'in% 54'ünün CD4 +,% 46'sının CD8 ve % 5,6'sının NKT hücrelerden oluştuğunu bulmuştur (Kojima ve ark.,2011). Pudney ayrıca endoservikal kolumnar epitel boyunca 100 epitel hücre başına üç CD8 hücresi ve 1 CD4 hücresi olduğunu göstermiş, ancak ne yazık ki GDT hücreleri bu çalışmada spesifik olarak değerlendirilmemiştir (Pudney ve ark.,2005). Son

zamanlarda, dişi genital mukozasında GDT hücrelerinin varlığı, endoservikal sitobrushların veya servikal biyopsi örneklerinin akış sitometrik analizini yapan birçok çalışmada doğrulanmış ve bu hücrelerin CD4 veya CD8 yüzey belirteçleri için pozitif olabileceğı kanıtlanmıştır (Juno ve ark.,2014; Strbo ve ark.,2017). Önceki çalışmalarda analiz edilen intraepitelyal lenfositlerin zaten GDT hücrelerini içerdiğini ancak spesifik GDT yüzey belirteçleriyle daha fazla araştırılmadıkları için tespit edilemediğini varsaymaktayız.

İnsanların değil, ancak farelerin epidermal GDT hücreleri, belirgin bir dendritik morfolojiye sahiptir ve dolayısıyla dendritik epidermal T hücreleri (DETC'ler) olarak bilinir. DETC'ler LC ile birlikte komşusunu oluşturan keratinositlerin homeostazını korur (Jameson ve ark.,2002). Epitelde yerleşik GDT hücreleri, yalnızca epitelinin korunmasında değil, aynı zamanda patojenik saldırılardan zarar görmesinden sonra onarım sürecinin merkezinde de rol oynar (Witherden ve ark.,2018) . Birçok çalışma, epitelyal yerleşik GDT'nin yokluğunu epitelyal düzensizlik, yoğun hasar ve gecikmiş tamir mekanizmaları ile ilişkilendirmiştir (Jameson ve ark.,2002; Toulon ve ark.,2009). Ayrıca, bağırsaktan gelen GDT hücreleri, epitel içindeki aktif göç yoluyla çoklu epitel hücreleri ile temas eder. Bu, tek bir IEL'ye, sayıları çok düşük olsa bile, epitelin büyük alanlarını gözlemlene ve koruma yeteneğı verir (Edelblum ve ark.,2012; Sumida ve ark.,2017).

GDT hücrelerinin keratinosit homeostazındaki kanıtlanmış rolü ve diğer dokulardaki doku onarımında rol alması, servikal mikrotravmada HPV için de aynı mekanizmaların bulunduğunu göstermektedir. HPV enfeksiyonu, mikrotravma olarak doku hasarı ile başladığından, eğer IEL tamamen işlevsel ise, epitelde hareket ederek olay yerine ulaşabilir sayıca az olmalarından kaynaklanan sorunu aşabilir ve onarım süreci başlayabilir. HPV enfeksiyonu ve ilişkili servikal kanserde rol alan immün hücreler ve birbirleriyle ilişkileri **Şekil2.8.**'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Human papillomavirüs enfeksiyonu ve karsinogenezi sürecinde rol alan immün hücreler ve birbirleriyle ilişkileri gösterilmiştir (Barros ve ark.,2018).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Yöntem

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın hastalıkları ve doğum anabilim dalı ve Sağlık bilimleri araştırma ve uygulama merkezi laboratuvarlarında, merkez laboratuvarları akım sitometri laboratuvarında prospektif olarak yürütülmüştür. Bilimsel Araştırmalar proje kurulundan maddi destek alınmıştır. Çalışma dizayn edildikten sonra üniversite bünyesindeki etik kurul başkanlığına başvuruda bulunulmuş ve onay alınmıştır. Çalışma dizayn edilirken belirlenen çalışma grubuna HPV test sonucu pozitif hastalar ve kontrol grubuna HPV test sonucu negatif hastalar dahil edilmiştir. Çalışma grubuna dahil olma kriterleri: 30- 50 yaş aralığında olmak, jinekolojik açıdan asemptomatik olmak, en erken 1 yıl en geç 2 yıl önce HPV DNA test pozitifliği tespit edilmiş olmak , son güncel (en geç 2 ay içinde) pozitif HPV DNA testi sahibi olmak (yani HPV enfeksiyonu persistans gösteren hastalar) ya da klinik persistansın işareti olan yeni tanı servikal intraepitelyal neoplazi tanısı olmaktır. Kontrol grubuna dahil olma kriterleri ; 30-50 yaş aralığında olmak, jinekolojik açıdan asemptomatik olmak, en erken 1 yıl en geç 2 yıl önce HPV DNA test pozitifliği tespit edilmiş olmak, son güncel (en geç 2 ay içinde) HPV DNA testi negatif olmak yani HPV klerensi göstermiş olmaktır. “

Çalışmanın işleyişi ise şu şekilde planlanmıştır. Akdeniz üniversitesi tıp fakültesi kadın hastalıkları ve doğum polikliniğine başvuran, dahil etme ve dışlama kriterlerine uyan hastalar, çalışma ile ilgili bilgilendirilerek, çalışma ile ilgili daha önceden hazırlanmış olan bilgilendirilmiş onam formları hastalara verilerek uygun ortam ve sürede okumaları sağlanmış ve ardından hastalar tarafından onaylandı ise çalışma için gerekli işlemlere geçilmiştir. Örnek toplama süreçleri çalışma ve kontrol grupları için aynı şekilde ilerlemiştir. Hastalardan örnek toplama öncesi anamnez alınmış dışlama kriterlerine uyanlar çalışmaya dahil edilmemiştir. Hastalardan telefon numarası, yaş, gravida, parite, abortus sayıları, vücut kitle indeksi, son adet tarihi, herhangi bir şikayeti olup olmadığı, dahili problemi, kullandığı ilaçlar, alerjik durumu, sigara kullanımı, alkol kullanımı, medeni durumu, eğitim durumu, cinsel aktif olup olmadığı, partner sayısı, ırk ile ilgili sorgulamalar yapıldı ve değişken olarak kayıt edildi. Hastaların güncel ve 1-2 yıl önceki smear ve HPV DNA test sonuçları kayıt altına alındı. Hastalar onamları alındıktan sonra

jinekolojik muayene masasına alındı ve transvajinal ultrason yapıldı. Ardından tek kullanımlık steril spekulum yerleştirildi. Dışlama kriterleri saptanmadı ise ardışık olarak iki adet endoservikal sitobrush ile endoservikal kanala girilerek fırça 360 derece döndürülmek suretiyle örnek toplandı. Bu sırada görünür düzeyde kan içeren örnekler çalışma dışında bırakıldı. Örnekleri içeren fırçalar 5 ml RPMI solüsyonu içeren ve buzlu taşıma ünitesinde bekletilen 15ml lik Falkon tüplerine aktarıldı. Eş zamanlı olarak hastalardan 10 ml'lik ve 3 ml'lik EDTA'lı mor tüplere periferik venöz kan örnekleri alındı. 3 ml'lik tüp hemogram testi için laboratuvara gönderildi. Diğer örnekler buzlu taşıma ünitesinde en geç bir saat içinde laboratuvara ulaştırıldı ve analizlere hemen başlandı. Laboratuvara ulaştırılan örnekler eş zamanlı olarak hazırlandı ve analiz edildi. Periferik venöz kan örneklerinden lenfosit izolasyonu için densite gradyent yöntemi kullanıldı. Bütün işlemler biosafety level2 düzeyindeki laminar akım kabinlerinde gerçekleştirildi. Densite gradyent yönteminde , önceden hazırladığımız 2.5ml histopak içeren 15mllik falkon tüpüne, edalı tüp içinde, phosphate buffered saline (PBS) ile 1/1 oranında sulandırdığımız örnekten tüpün aldığı kadar koyuldu. Bu işlem pastör pipeti ile tüp eğikken ve sıvılar birbirine karışmadan yavaşça yapıldı. Ardından hazırlanan falkon tüpü dengeli bir şekilde santrifüj cihazına yerleştirildi ve 1800rpm de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası fazlarına ayrılan kanın en üst tabakasında plasma, onun altında periferik kan mononükleer hücrelerini içeren beyaz bulutsu tabaka, onun altında histopak, en altta da eritrositer seri hücreler yerlerini alır **(Resim 3.1.)**

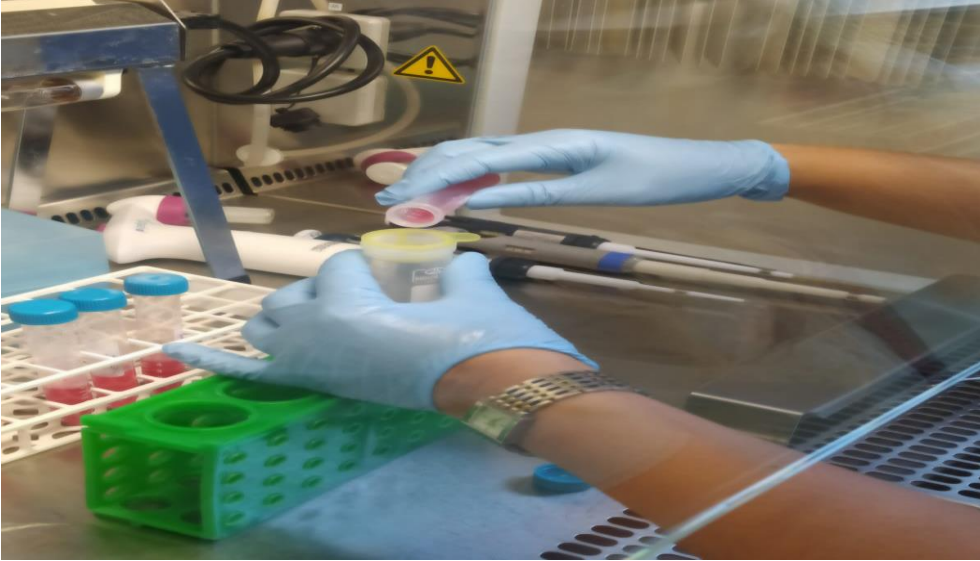


Resim 3.1. Santrifüj sonrası fazlarına ayrılan periferel venöz kan örneği

Beyaz bulutsu tabaka pastör pipetiyle toplanarak 1/1 oranında PBS ile sulandırıldı. Ardından tüpümüz 2500rpm devirde bir 7 dakika daha santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant döküldü tüpün dibine yapışan lenfositler 1.5ml cell wash solüsyonu ile yıkandı ve antikor boyamalarının yapılacağı flow tüplerine 100'er mikrolitre paylaştırıldı . Ardından boyama işlemine geçildi. Endoservikal örnekleri taşıyan tüp **(Resim 3.2.)** ise önce 45 saniye boyunca içindeki iki adet fırça ile beraber vortexlendi. 100 mikrometrelik süzgeçten geçirildi **(Resim 3.3.)**



Resim 3.2. Fırçalarla santrifüj edilen endoservikal örnek tüpü



Resim 3.3. Endoservikal örnekleri hücre süzgecinden geçirme işlemi

Ardından tüp 2000 rpm de 10dk boyunca fırçalar tüpün içindeyken santrifüj edildi. Ardından pellet bozulmadan nazikçe fırçalar çıkarıldı (**Resim 3.4.**).

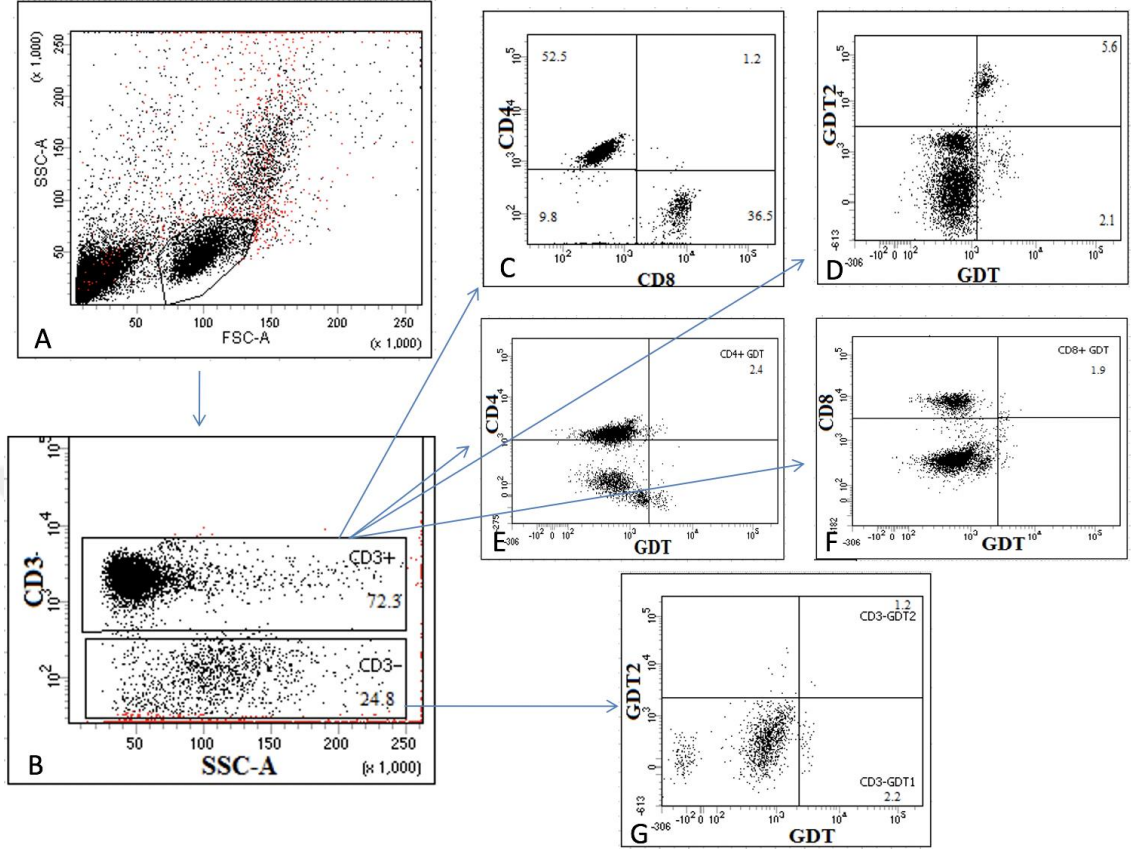


Resim 3.4. Santrifüj sonrası endoservikal örnek tüpünde oluşan pellet

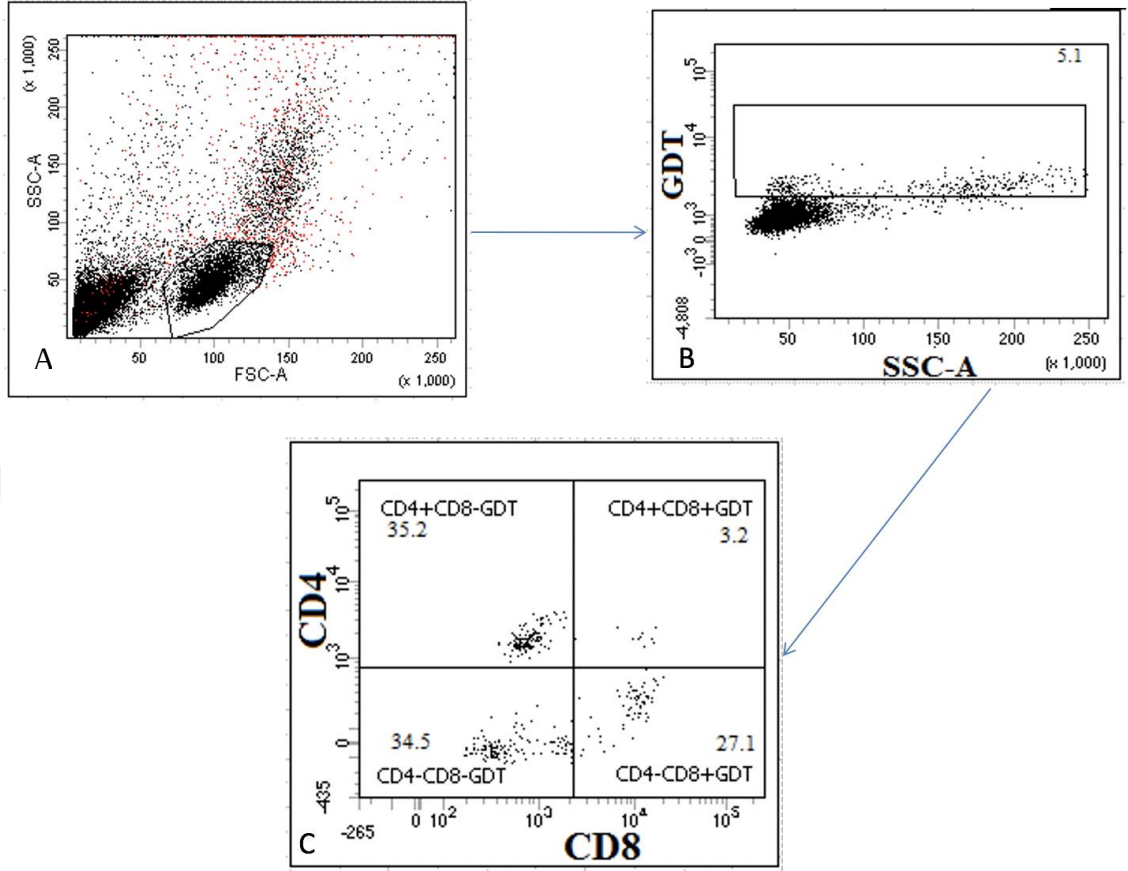
Süpernatant pipet ile pellete zarar vermeden alındı ve atıldı. Ardından 50ml'lik falkona 100 mikrometrelik hücre süzgeci yerleştirilerek, fırçalar tüpün içine yıkandı ardından santrifüj edilerek süpernatant atıldı. İki pellet mikropipetle toplandı ve birleştirildi. 600 mikrolitre cell wash ile yıkanan pelletlerden, 100 mikrolitre alınarak boyama yapılacak olan flow tüplerine aktarıldı. Periferik kan ve endoservikal örnekler için daha önceden oluşturduğumuz monoklonal antikör panelleri , panel A ve panel B şeklindeydi ve panel A CD45 (FITC- Biolegend clone 2D1), CD3 (APC/Cyanine 7 -Biolegend clone HIT3a), CD4 (PE/ Cyanine 7- Biolegend clone A161A1), CD8 (PerCP/Cyanine 5.5- Biolegend clone SK1), TCR gamma-delta (PE- Biolegend clone B1), TCR gamma-delta 2 (APC-Biolegend clone B6), şeklinde dizayn edilmiştir. Panel B ise CD45 (FITC-Biolegend clone 2D1), CD3 (APC/Cyanine 7-Biolegend clone HIT3a), CD19 (APC-Biolegend clone 4G7), CD16 (PE-Biolegend clone 3G8), CD56 (PE/Cy7-Biolegend clone 5.1H11), CD14 (PerCP/Cy5.5- Biolegend clone 63D3) şeklinde dizayn edildi.

Boyama işlemi için 100 mikrolitre örnek içeren flow tüplerine her monoklonal antikörden 5 mikrolitre olacak şekilde paylaştırıldı ve karanlık alanda ve oda ısısında 30 dk bekletildi. Ardından tüpler dengeli bir şekilde 2500 rpm 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve pellet 200 mikrolitre cell wash ile dilüe edildi. Tekrar son kez 2500rpm de 7 dakika santrifüj edilerek süpernatantı döküldü ve 600ml cell wash ile dilüe edilerek akım sitometri cihazında okumaya hazır hale getirildi.

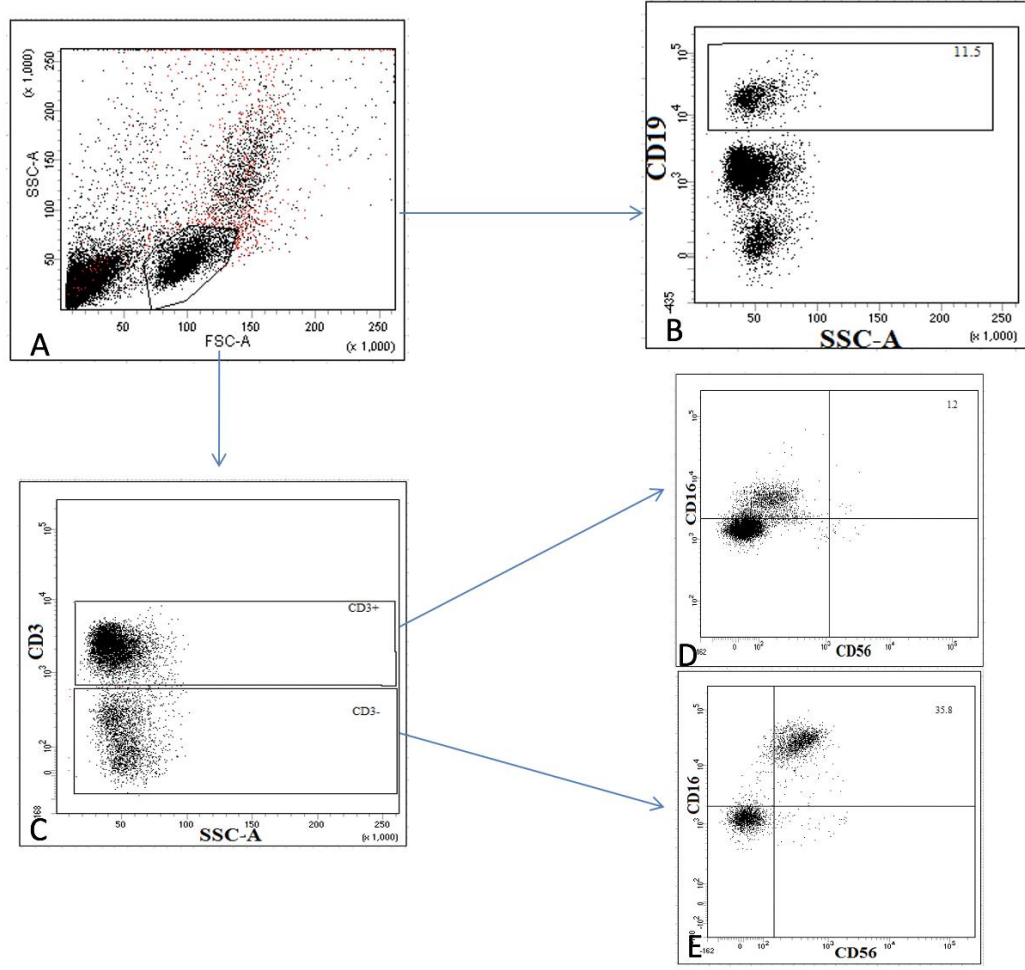
Tüplerin okumaları BD FACS Canto II akım sitometri cihazında gerçekleştirildi. Analizler ise BD FACS Diva software ile gerçekleştirildi. Analiz sırasında periferik kan ve endoservikal sitobrush örneklerinde; işlem sayısı, lökosit (CD45+) yüzdesi, T lenfosit (CD3+) yüzdesi, CD4 T lenfosit (CD3+CD4+) yüzdesi, CD8 T lenfosit (CD3+CD8+) yüzdesi, genel gamma-delta hücre (CD3+gamma-deltaTCR+) yüzdesi , gamma-delta 2 hücre (CD3+gamma-delta2 TCR+) yüzdesi, CD4 gamma-delta hücre yüzdesi (CD3+CD4+gamma-delta TCR+),CD8 gamma-delta hücre yüzdesi (CD3+CD8+gamma-delta TCR+), CD3 eksprese etmeyen genel gamma-delta hücre yüzdesi (CD3-gamma-delta TCR+), CD3 eksprese etmeyen gamma-delta 2 hücre yüzdesi (CD3-gamma-delta2 TCR+), CD45+CD3-, Double negatif T hücre yüzdesi (CD4-CD8-CD3+), Çift pozitif T hücre yüzdesi (CD4+CD8+CD3+), gamma-delta TCR + lerin içinde çift pozitif (CD4+CD8+) hücre yüzdesi, gamma-delta TCR + lerin içinde çift negatif (CD4-CD8-) hücre yüzdesi, gamma-delta T hücreler içindeki sadece CD4+ ve sadece CD8+ hücrelerin yüzdeleri, gamma-delta 1+/gamma-delta 2 +oranı, CD4+/CD8+ oranı, B lenfosit (CD19+) yüzdesi, Monosit (CD14+16+) hücre yüzdesi, Natural kiler hücre (CD3-CD16+CD56+) yüzdesi, NKT hücre (CD3+CD16+CD56+) yüzdesi verileri toplandı ve kayıt edildi. Hemogram testinden hemoglobin düzeyleri, hematokrit yüzdesi, lökosit sayısı, trombosit sayısı, ortalama trombosit hacmi (MPV), nötrofil sayısı, lenfosit sayısı, nötrofil/lenfosit oranı (NLR), platelet/lenfosit oranı (PLR), sistemik immün-inflamasyon indeksi (SII) parametreleri değerlendirildi ve kayıt edildi. Akım sitometri çalışmaları sırasında kullanılan kapılama stratejileri aşağıda verilmiştir.



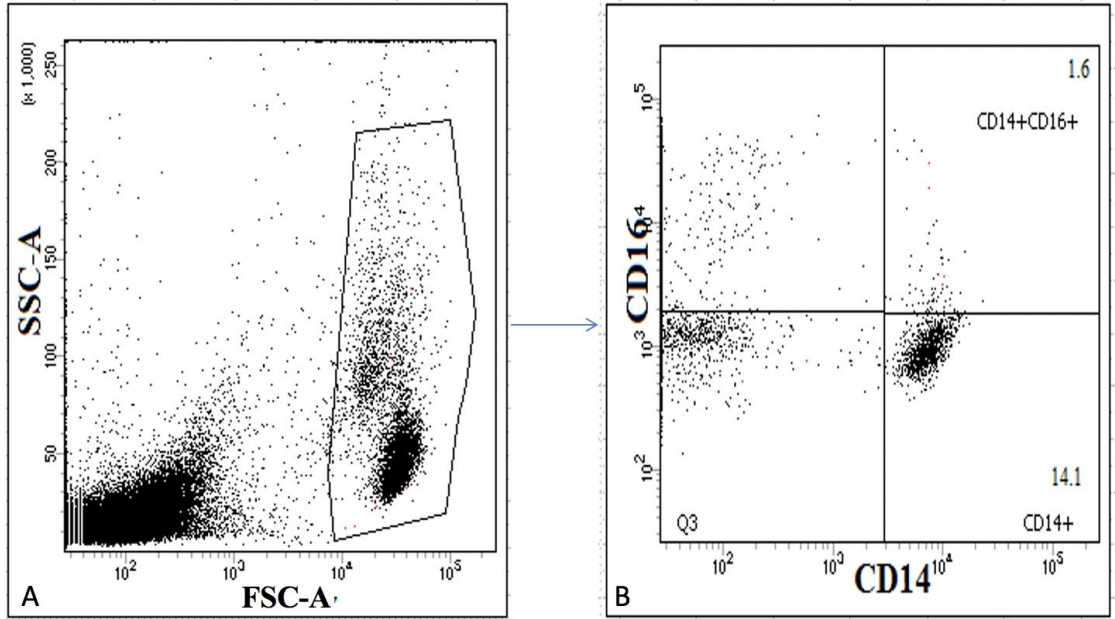
Şekil 3.1. Periferel kan akım sitometri analizi kapılama stratejileri; A) Morfolojik lenfosit kapılama, B) Lenfositlerde CD3+ ekspresyonu ve kapılanması, C) CD3+ hücrelerde CD4 ve CD8 ekspresyonu, D) CD3+ hücrelerde panGDT ve GDT2 ekspresyonu, E) CD3+ hücrelerde CD4+GDT ekspresyonu, F) CD3+ hücrelerde CD8+GDT ekspresyonu, G)CD3- hücrelerde panGDT ve GDT2 ekspresyonu



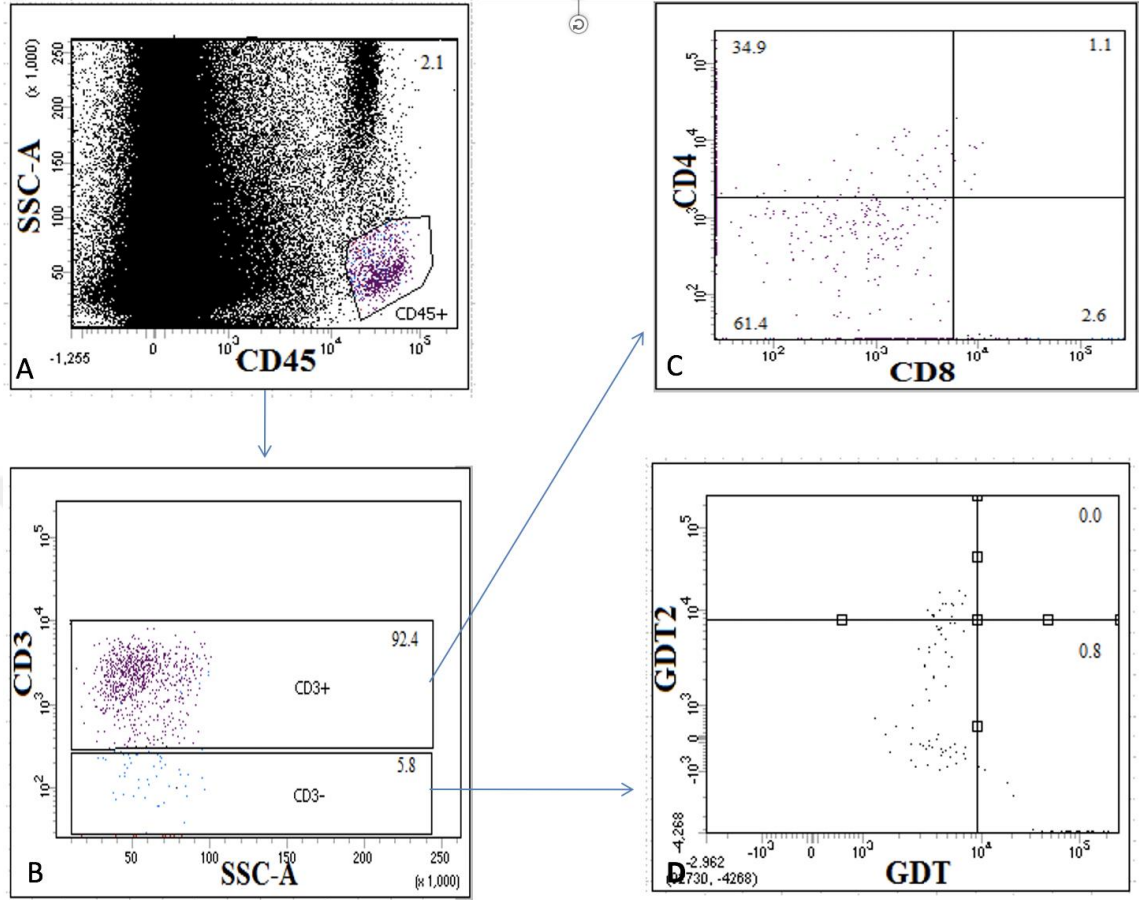
Şekil 3.2. Periferel kan akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı); A) Morfolojik lenfosit kapılması, B) Lenfosit kapısındaki hücrelerde panGDT+ hücrelerin kapılması, C) panGDT+ hücrelerde CD4 ve CD8 ekspresyonları



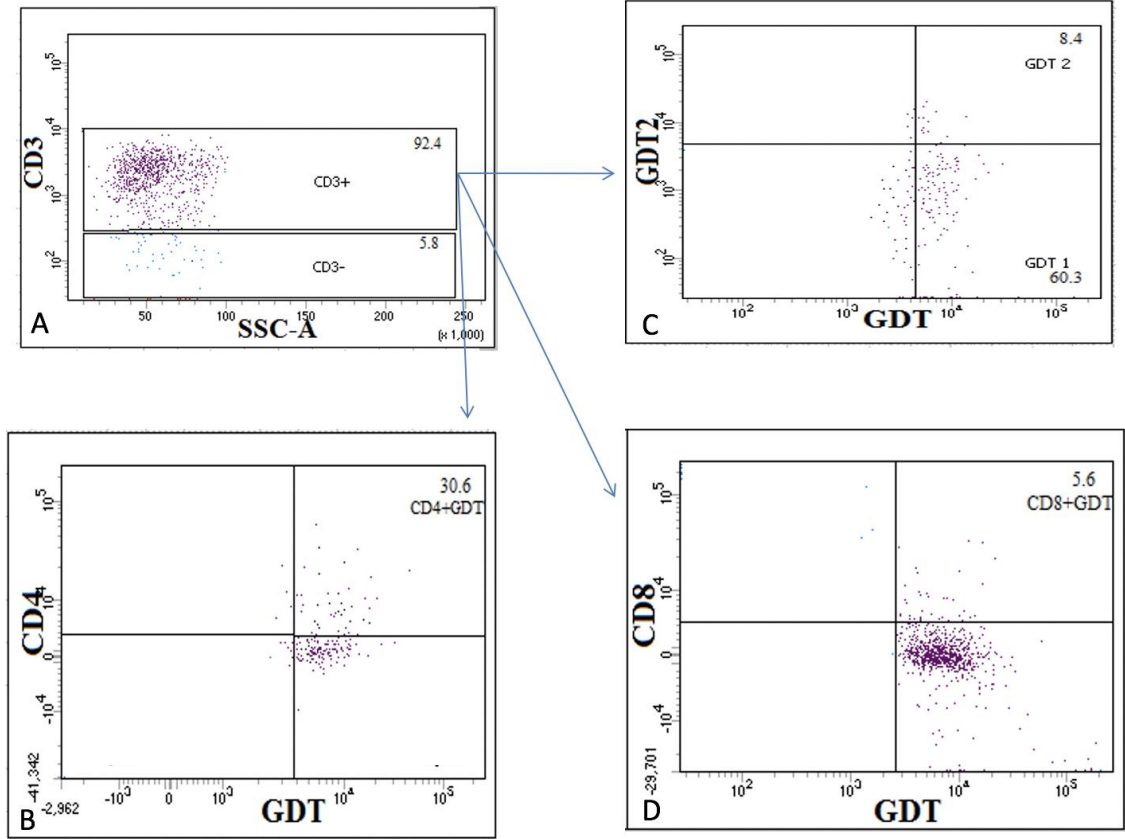
Şekil 3.3. Periferel kan akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı); A) Morfolojik lenfosit kapılama, B) Lenfosit kapısındaki hücrelerde CD19 ekspresyonu (B Lenfosit) C) Lenfosit kapısındaki hücrelerde CD3 ekspresyonu ve kapılanması, D) CD3+ hücrelerde CD16, CD56 ekspresyonu (NKT hücre), E) CD3- hücrelerde CD16, CD56 ekspresyonu (NK hücre)



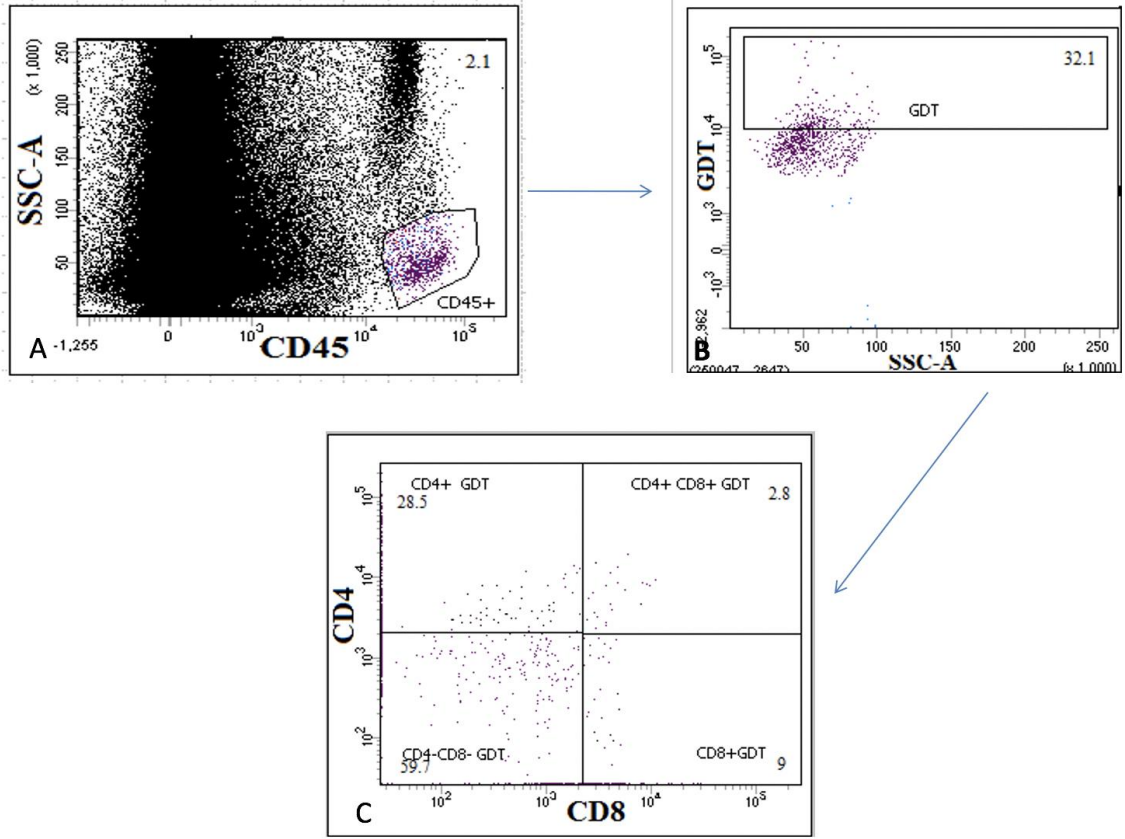
Şekil 3.4. Periferel kan akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı); A) Morfolojik monosit ve lenfosit kapılama, B) Monosit ve lenfosit kapısında CD16 ve CD14 ekspresyonları



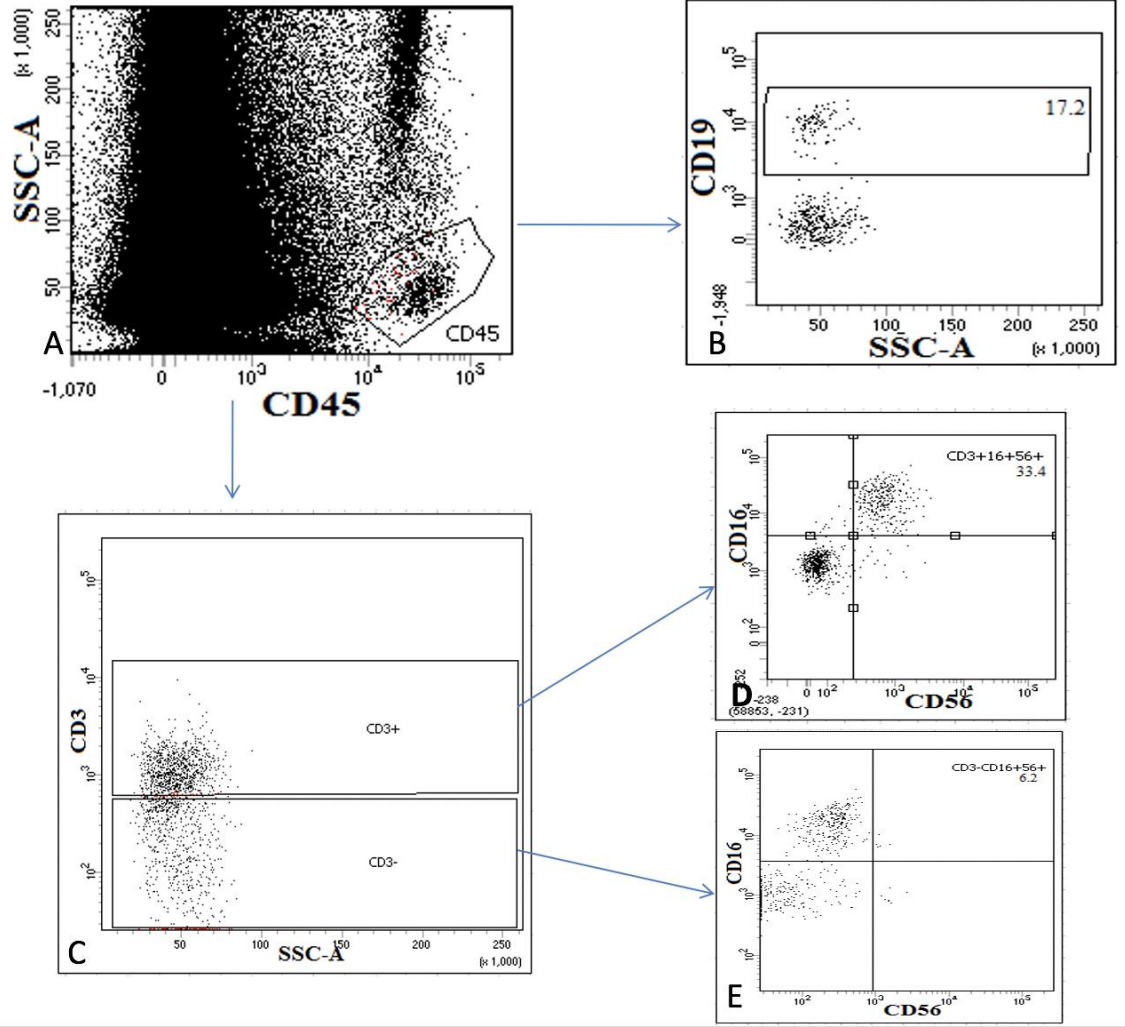
Şekil 3.5. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri; A) CD45 ekspresyonu ile immünolojik kapılama, B) CD45+ hücrelerde CD3 ekspresyonu ve kapılanması, C) CD3+ hücrelerde CD4 ve CD8 ekspresyonu, D) CD3- hücrelerde pan GDT ve GDT2 ekspresyonu



Şekil 3.6. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı) ; A) CD45 ekspresyonu ile yapılan immünolojik lenfosit kapılama stratejileri (tekrar gösterilmemiştir) ardından CD3 ekspresyonu ve kapılması, B) CD3+ hücrelerde CD4+GDT ekspresyonu, C) CD3+ hücrelerde panGDT ve GDT2 ekspresyonu, D) CD3+ hücrelerde CD8+GDT ekspresyonu



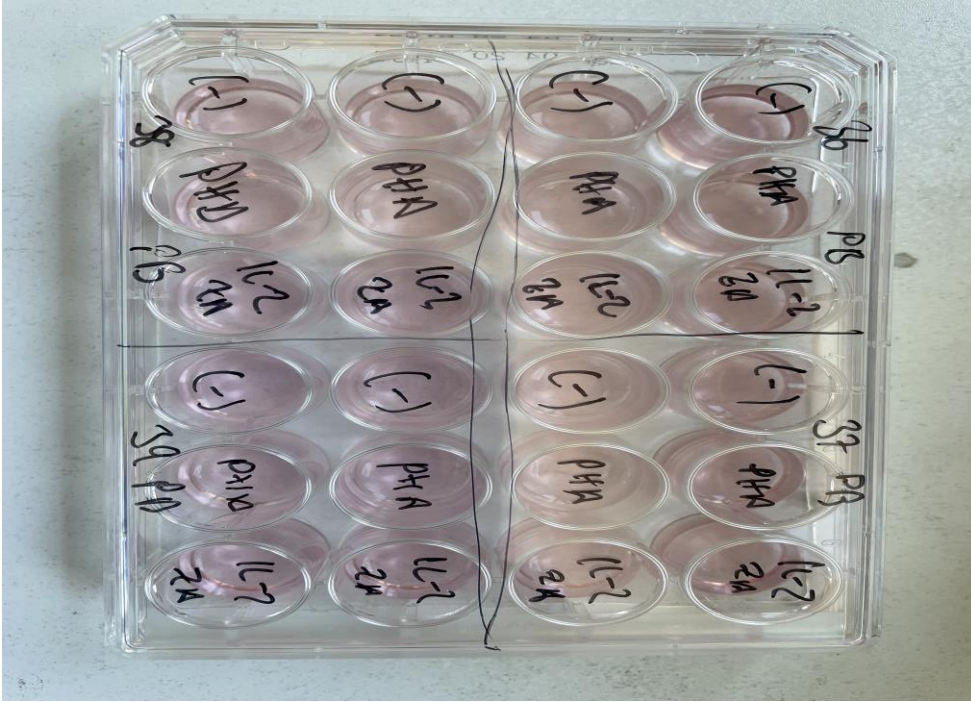
Şekil 3.7. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı) ; A) CD45 ekspresyonu ile immünolojik kapılama, B) CD45+ hücrelerde panGDT ekspresyonu ve kapılanması C) panGDT + hücrelerde CD4 ve CD8 ekspresyonu



Şekil 3.8. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı); A) CD45 ile immünolojik kapılama, B) CD45+hücrelerde CD19 ekspresyonu (B hücre), C) CD45+ hücrelerde CD3 ekspresyonu ve kapılanması, D) CD3+ hücrelerde CD16, CD56 ekspresyonu (NKT hücre), E) CD3- hücrelerde CD16 , CD56 ekspresyonu (NK hücre)

Akım sitometre analizi için monoklonal antikorlar ile boyamaya geçildiği sırada örnek tüpünden bir miktar örnek lenfosit hücre kültürü yapılmak üzere ayrıldı. Öncesinde; L-glutamin ve HEPES içeren RPMI 1640, %10 oranında fetal bovine serum (FBS), %2 oranında da penisilin-streptomisin solüsyonu içeren besiyeri hazırlandı. Her kuyucukta 1 ml olacak şekilde 24 kuyucuklu plağa aktarıldı. Ardından stimülanların hazırlanmasına geçildi. Zoledronik asit 5 mikromol konsantrasyonda olacak şekilde RPMI içinde hazırlandı. Fitohemagglütinin ise 5mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde RPMI solüsyonu içinde hazırlandı. IL-2 ise 1.5ng/ml konsantrasyonda hazırlandı. Bütün işlemler

biosafety II güvenlik kabininde laminar akım altında ve steril şartlarda yapıldı. Ardından örneklerden 100 mikrolitre alındı ve toma lamında hücre sayımı yapıldı . Önceden hazırladığımız 24 kuyucuklu plaklarda 1×10^6 hücre olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı. Her bir endoservikal ve periferik venöz kan örneği için , bir kuyucukta negatif kontrolü oluşturacak şekilde stimulan kullanılmadı sadece besiyeri ilavesi yapıldı. Diğer bir kuyucukta pozitif kontrol olması amaçlı fitohemagglütinin ile lenfosit stimülasyon yapıldı. Diğer bir kuyucukta ise rekombinant human IL-2 – Zoledronik asit ikilisi ile lenfosit stimülasyonu yapıldı (**Resim 3.5.**).



Resim 3.5. 24 kuyucuklu hücre kültürü plağı dizaynı

IL-2 , içeren solüsyon 72 saatte bir kuyucuğa eklenerek lenfosit stimülasyonu yapıldı. Ekim yapılması ardından kültür plateleri %5-10 karbondioksit ve 37 derecelik ortam ısısı sağlayan inkübatöre kaldırıldı. 48 saatte bir inkübatörden steril şartlar korunarak çıkarıldı ve inverted mikroskop altında lenfosit popülasyonu büyüme ve kontaminasyon açısından takip edildi ve fotoğraflandı.

3.2. İstatistiksel Analiz

Deskriptif istatistikler standart prosedürle elde edildi. Kontinue değişkenlerin normal dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile doğrulandı. Normal dağılan kontinue değişkenler ortalama $\pm$ SS (standart sapma) olarak verildi ve 2-tailed unpaired Student t test ile karşılaştırıldı. Bütün istatistiksel değerlendirmeler SPSS software versiyon 16.0 ile yapıldı. P değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterlerine uyan 41 hasta çalışmaya dahil edildi. Persiste HPV enfeksiyonu dökümanente edilen 19 hasta çalışma grubuna, HPV klerensi dökümanente edilen 21 hasta kontrol grubuna dahil edildi. Çalışmamıza katılan hastaların genel özellikleri ve sosyodemografik yapıları aşağıda tablo 4.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 4.1. Hastaların genel ve sosyodemografik özellikleri

	HPV Persistans (19)	HPV Klerens (22)	p değeri
	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	
	Sayı (%)	Sayı (%)	
Yaş	39.9 (6.9)	40.6 (6.1)	.71
Gravida	2.2 (1.3)	2.3 (1.6)	.75
Parite	1.6 (1.0)	1.6 (1.2)	.99
Abortus	0.5 (0.6)	0.6 (0.9)	.68
Vücut kitle indeksi (kg/m2)	27.5 (2.3)	28.3 (2.7)	.31

Sigara kullanımı **.59**

Var	8 (42.1%)	9 (40.9%)
Yok	11 (57.9%)	13 (59.1%)

Alkol kullanımı

Var	0	0
Yok	19 (100%)	22 (100%)

Ek hastalık

Var	6 (31.6%)	8 (36.4%)
Yok	13 (68.4%)	14 (63.6%)

.36

İrk

Beyaz	19 (100%)	22 (100%)
diğer	0	0

Medeni durum

Evli	15 (78.9%)	17 (77.3%)
Bekar	4 (21.1%)	5 (22.7)

.60

Eğitim düzeyi

Üniversite mezunu	8 (42.1%)	5 (22.7%)	.16
Lise ve altı mezunu	11 (57.9%)	17 (77.3%)	

Aktif cinsel hayat

Var	19 (100%)	22 (100%)
Yok	0	0
Partner sayısı		
1	19 (100%)	22 (100%)
1' den fazla	0	0

HPV persistansı gösteren hastalardan oluşan çalışma grubuna baktığımızda en sık görülen HPV alt tipinin HPV 16 %33.3 (5/15) olduğu gözlemlenmiştir. İkinci sırada %19.9 (3/15) ile HPV 35, 39, 56, ve 68 yer almaktadır. Üçüncü sıkkıkta ise %13.3 ile HPV 31,45,51 yer almaktadır. Hastaların %53.3 (8/15) 'ünde birden fazla tip HPV alt tipi ile enfeksiyon olduğu gözlenmiştir. Eski ve yeni HPV DNA testleri arasındaki süre ortalama 21 aydır. 9/19 (%47.3) hastanın HPV persistansı HPV DNA testi ile tanımlanmışken, 10/19 (%52.6) hastanın HPV persistansı klinik düzeyde CIN2⁺ lezyonların varlığı ile tanımlanmıştır. HPV persistansı grubunda yer alan 19 hastanın tamamına (%100) örnek toplama işlemi ardından kolposkopi işlemi yapılmıştır. %57.9 (11/19) hastada CIN2, %5.2 (1/19) hastada CIN3 tespit edilmiş ve bu hastalara (%68.4 (13/19)) leep işlemi yapılmıştır. Leep yapılan hastaların patoloji sonuçlarına baktığımızda %24.9 (3/12) hastada CIN3 , %33.3 (4/12)

hastada CIN2, %49.9 (6/12) hastada ise CIN1 tespit edilmiştir. Bu hastaların özellikleri tablo 4.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 4.2. HPV persistansı gösteren hastaların özellikleri

Hasta numarası	Yaş	Güncel HPV DNA	Güncel Smear	Eski HPV DNA	Eski Smear	Test arası süre (ay)	Kolposkopi	Leep	Tanı
1	48	-	ASC-H	-	-	-	CIN2	+	CIN1
2	39	35	LSIL	-	-	-	CIN2	+	CIN1
3	44	-	ASCUS	-	-	-	CIN2	+	CIN1
4	35	18,45	-	-	-	-	CIN2	+	CIN1
5	30	-	HSIL	-	-	-	CIN2	+	CIN3
6	40	16,56,68	normal	51,35	normal	14	Normal	-	-
7	32	59	normal	-	normal	-	CIN2	+	CIN3
8	45	16	normal	-	-	-	CIN2	+	CIN2
9	35	16	ASCUS	-	-	-	CIN2	+	CIN2

10	32	31,39,45,68	normal	16,18,68,56,52	normal	19	CIN2	+	CIN2
11	49	39,33	normal	16	normal	22	Normal	-	-
12	46	35	normal	51	normal	22	CIN1	-	-
13	49	56	normal	18,31,56	normal	18	Normal	-	-
14	48	16,35	normal	18,59	normal	24	Normal	-	-
15	31	16,51,68	ASCUS	16	normal	20	CIN3	+	CIN3
16	30	31,39	ASCUS	-	-	-	CIN2	+	CIN1
17	38	-	-	-	-	-	CIN2	+	CIN1
18	44	51,66	ASC-H	16,52	normal	24	Normal	+	CIN2
19	43	56	normal	16,31,33,56	normal	26	CIN1	-	-

Çalışmamız için alınan periferik venöz kan örneklerinden eş zamanlı olarak gönderilen hemogram analizlerindeki hematolojik ve immünolojik parametrelerin analizi **Tablo 4.3.**'de özetlenmiştir.

Tablo 4.3. Periferik venöz kan örneklerinde hematolojik ve immünolojik parametreler

	HPV Persistans (19)	HPV Klerens (22)	p değeri
	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	
Hematokrit %	35.9 (3.1)	38.3 (4.0)	.046
Hemoglobin(g/dl)	12.0 (1.6)	12.6 (1.3)	.23
Lökosit (10³/µl)	6.9 (1.7)	7.4 (1.1)	.23
Trombosit (10³/µl)	272.5 (86.3)	320.8 (70.2)	.055
Ort.Trombosit hacmi (fl)	10.0 (0.9)	10.0 (0.9)	.87
Nötrofil(10³/µl)	4.26 (1.6)	4.08 (0.85)	.64
Lenfosit(10³/µl)	1.9 (0.6)	2.5 (0.6)	.004
NLR	2.4 (1.5)	1.6 (0.4)	.024
PLR	151.9 (65.1)	172.3 (85.8)	.65
SII	695.4 (507.6)	534.7 (190.2)	.20

Periferik venöz kan ve endoservikal sitobrushlar ile elde edilen örnekler Akım sitometri cihazında lenfosit alt popülasyonları açısından incelenmiş ve sonuçlar % cinsinden **Tablo 4.4.** ve **Tablo 4.5.**'de özetlenmiştir. Periferik venöz kan ve endoservikal sitobrush için ortalama okunan hücre sayısı sırasıyla; periferik venöz kan örneklerinde ortalama 75.000, endoservikal sitobrush örneklerinde ise 778.000 dir.

Tablo 4.4. Periferik venöz kan akım sitometri analizi sonuçları

%	HPV Persistans (19)	HPV Klerens (22)	p değeri
	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	
CD3+	63.6 (31.2)	73.3 (11.9)	.21
CD3+CD4+ TLenfosit	45.9 (23.7)	57.5 (10.8)	.061
CD3+CD8+TLenfosit	24.5 (16.2)	35.8 (9.8)	.014
CD4/CD8 oranı	4.3 (11.1)	1.8 (0.8)	.29
CD3+CD4-CD8- TLenfosit	13.1 (18.4)	5.6 (4.6)	.10
CD3+CD4+CD8+ TLenfosit	1.4 (2.1)	1.4 (1.1)	.87
GDT	4.9 (5.5)	8.6 (6.7)	.071
GDT2	3.1 (4.0)	5.4 (4.5)	.10
GDT1	1.8 (1.7)	3.1 (3.0)	.082
GDT1/2 oranı	0.89 (1.3)	0.94 (0.9)	.90

CD4+GDT	2.4 (3.8)	4.3 (6.3)	.24
CD8+GDT	1.9 (2.5)	5.7 (8.9)	.081
GDT içinde CD4+ CD8+	3.2 (4.1)	2.0 (3.0)	.30
GDT içinde CD4-CD8-	28.1 (21.4)	23.6 (19.9)	.49
GDT içinde CD4+	30.2 (22.5)	42.1 (17.7)	.06
GDT içinde CD8+	22.6 (13.2)	32.2 (12.3)	.021
CD3-GDT	3.4 (5.0)	11.5 (13.0)	.013
CD3-GDT2	1.2 (2.1)	4.1 (6.9)	.074
CD3-CD45+	11.1 (16.6)	6.4 (11.8)	.30
B Lenfosit	11.5 (13.0)	7.6 (2.3)	.17
Monosit	14.9 (5.6)	13.3 (2.5)	.24
NK	29.8 (19.2)	25.8 (12.4)	.43
NKT	1.3 (1.8)	0.5 (0.3)	.07

Periferal kandaki GDT hücrelerinin oranlarına baktığımızda GDT2 hücrelerinin (%63.2) çoğunlukta olup GDT1 hücrelerinin (%36.7) iki katı kadar olduğu görülmektedir.

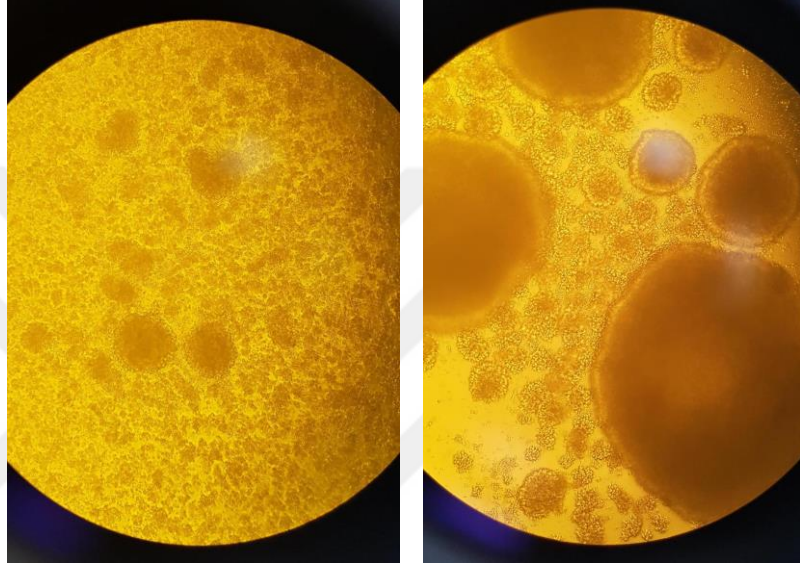
Tablo 4.5. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi sonuçları

%	HPV Persistans (19)	HPV Klerens (22)	p değeri
	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	
CD45+	2.3 (2.8)	1.9 (2.2)	.59
CD3+	52.0 (25.4)	73.6 (17.3)	.004
CD3+CD4+ TLenfosit	37.6 (25.1)	14.1 (16.7)	.002
CD3+CD8+TLenfosit	9.8 (11.5)	20.2 (13.7)	.013
CD4/CD8 oranı	18.9 (27.9)	1.4 (2.7)	.014
CD3+CD4-CD8- TLenfosit	49 (29.9)	61.4 (27.1)	.17
CD3+CD4+CD8+ TLenfosit	3.1 (2.5)	4.3 (6.0)	.43
GDT	41.2 (31.1)	42.7 (25.2)	.86
GDT2	15.5 (19.1)	10.5 (8.2)	.27
GDT1	26.8 (23.8)	32.1 (20)	.44

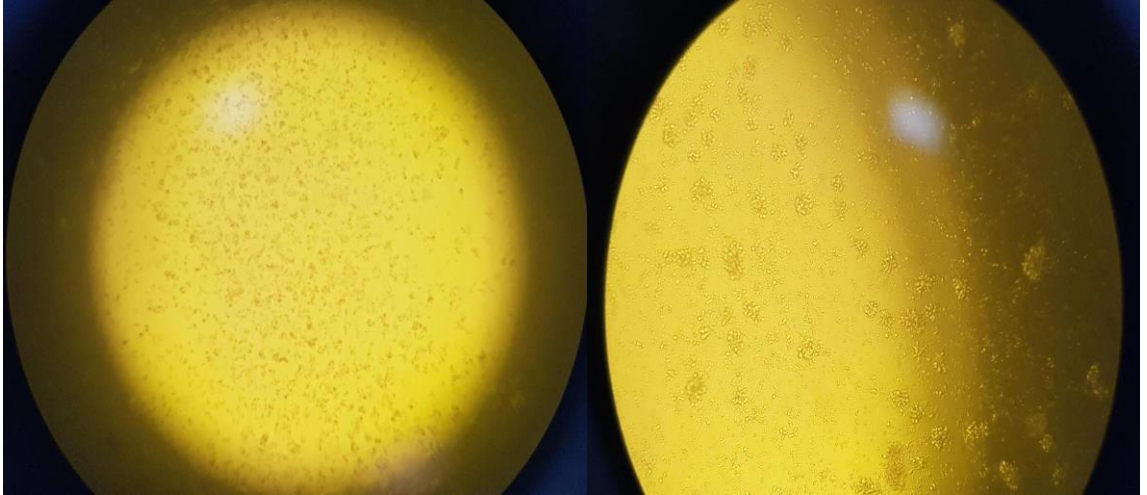
GDT1/2 oranı	2.6 (3.3)	4.1 (3.7)	.20
CD4+GDT	38.6 (30.3)	15.0 (8.6)	.004
CD8+GDT	7.2 (5.0)	15.1 (15.1)	.030
GDTiçinde CD4+CD8+	3.9 (5.7)	3.3 (4.6)	.70
GDTiçinde CD4-CD8-	51.1 (33.2)	69.6 (19.4)	.041
GDT içinde CD4+	32.1 (30.3)	12.9 (13.0)	.017
GDT içinde CD8+	9.0 (8.6)	15.0 (9.9)	.048
CD3-GDT	3.7 (4.8)	4.6 (6.8)	.61
CD3-GDT2	0.8 (2.0)	0.5 (1.5)	.62
CD3-CD45+	53.4 (25.4)	34.7 (18.6)	.013
B Lenfosit	20.5 (16.4)	21.8 (13.3)	.78
NK	15.1 (19.6)	4.7 (11.7)	.056
NKT	30.3 (30.3)	16.0 (21.5)	.09

Hastalardan alınan periferik venöz kan ve endoservikal sitobrush örnekleri eş zamanlı olarak önceden hazırladığımız besiyerlerine ekildi ve CO2 inkübatöründe izleme alındı. 5. Ve 7. gün izlemlerinde sağlıklı koloni oluşumları gözlemlenen PHA ile stimüle periferik kan ve endoservikal örnekler (**Resim 4.1.**) ve ZA + IL-2 ile stimüle edilen periferik kan

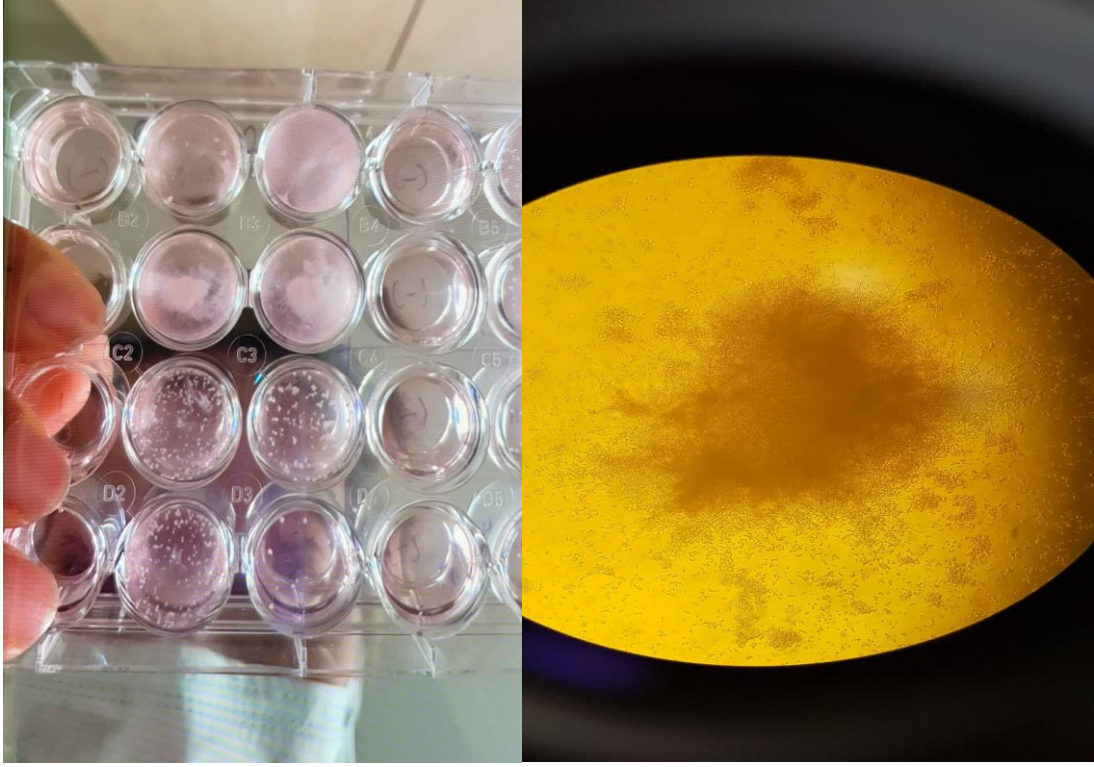
ve endoservikal örnekler (**Resim 4.2.**) 9. Günde fungus kontaminasyonu (**Resim 4.3.**) nedeniyle sonlandırıldı. Gerekli inkübatör, mikroskop, kabin ve ortam temizlikleri yapıldıktan sonra besiyeri solüsyonuna amfoterisin B eklenerek kültür ekimleri devam etti ancak sonraki ekimlerde 2. Günden itibaren fungal kontaminasyonların görülmeye devam etmesi nedeniyle kültür işlemine son verildi.



Resim 4.1. Solda, endoservikal sitobrush, PHA, 7.gün; Sağda periferik venöz kan, PHA, 7.gün



Resim 4.2. Solda, endoservikal sitobrush ZA-IL-2 7.gün; sağda periferik venöz kan ZA-IL-2, 7.gün



Resim 4.3. Fungal kontaminasyon makroskopik görünüm / mikroskopik görünüm

5. TARTIŞMA

Biz bu çalışmamızda, HPV ile persiste enfeksiyonu olan ve HPV enfeksiyonu için klerens göstermiş olan hastaların periferik venöz kan ve lokal endoservikal immünitesinde özellikle GDT hücreleri içeren bir farklılık bulmayı amaçladık. Hastalarımız gruplara; yaş, gravida, parite, vücut kitle indeksi, sigara-alkol kullanımı, ek hastalık, eğitim düzeyi, ırk, medeni durum, aktif cinsel hayat ve partner sayısı açısından eşit dağılım göstermiştir. Hastaların periferik venöz kan örneklerine baktığımızda ortalama hematokrit değerlerinin persistans grubunda istatistiksel anlamlı derecede daha düşük (%35.9 vs % 38.3 , p .046) olduğu saptanmış ancak iki grubun da hematokrit yüzdesinin halen normal değerler arasında (%35-45) olması , hemoglobin değerlerinin de normal olması ve iki grup arasında fark olmaması nedeniyle çalışmamızın sonuçlarını etkilemeyeceği düşünülmüştür. Çalışmamızda periferik venöz kanda sistemik inflamatuvar faktörler de incelenmiştir. İnflamasyon ve kanser gelişimi arasındaki nedensellik ilişkisi uzun zaman önce ortaya konmuştur(Coussens ve Werb,2002) . Tümör mikroçevresinde kronik inflamasyonun , tümör büyümesine, tümör anjiogenezine, invazyon ve metastaza , adaptif immün yanıtın yıkımına, antikanser ajanlara azalmış yanıtı neden olduğu bilinmektedir(Grivennikov ve ark.,2010). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda sistemik inflamatuvar yanıtın ölçülmesi çalışmalarında, bu testlerin kanser sonuçlarını predikte etmede , preinvaziv süreçlerde ise invaziv sürece gidişi predikte etmede rolü olduğu ortaya konmuştur. Bunların içinde artmış lökosit sayısı, hipoalbuminemi, artmış CRP, yüksek sitokin düzeyleri, artmış NLR, PLR, SII sayılabilir(Acmaz ve ark.,2014; Guthrie ve ark.,2013; McMillan,2013). Tavares-murta ve ark. İnvaziv serviks kanserinde sistemik lökosit sayısı değişimlerini inceledikleri çalışmalarında, CIN grubuna göre ileri evre serviks kanserinde artmış nötrofil , azalmış lenfosit sayısı bulmuşlardır(Tavares-Murta ve ark.,2010). Ayrıca lökositoz, nötrofili, lenfopeni, ve NLR>5 değerinin ileri evre kanser grubunda erken evre kanser ve CIN grubuna göre daha sık olduğunu gözlemlemişlerdir. Artmış NLR ‘un sistemik inflamatuvar durumların non-invaziv ve kost-efektif bir markeri olduğu gösterilmiştir(Templeton ve ark.,2014). Nötrofillerin tümör asosiye anjiyogenezde kritik rol oynayan VEGF’nin primer kaynağı olduğu düşünüldüğünde kötü prognoz ilişkisinin temeli de anlaşılmaktadır(Mishalian ve ark.,2013). NLR ayrıca, servikal

preinvaziv hastalıkların cerrahi tedavi sonrası rekürrens riskini belirlemede de bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Chun ve ark.,2017). 212 hastayı içeren bir retrospektif çalışmada 106 tane histolojik tanı CIN1-3 hastası sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmış kontrol grubu ile CIN1 tanı grubu arasında NLR açısından fark saptanmamıştır. Ancak CIN1 ve CIN2 tanı hastalar arasında ve CIN2 ve CIN3 tanı hastalar arasında anlamlı fark saptanmıştır. Aynı çalışmada HPV 16 persistansı gösteren grupta HPV negatif gruba göre medyan NLR değerleri daha yüksek saptanmıştır. Yani NLR, HPV enfeksiyonunun hangi hastalarda persiste edip CIN gelişeceğini de predikte etmektedir. Buna göre yüksek NLR bağımsız olarak CIN tanısını ve CIN evresini predikte etmektedir (Xu ve Song,2021). Bizim çalışmamızda yukarıda bahsettiğimiz belirteçlerle ilgili sonuçlara bakacak olursak; lenfosit sayısı HPV persistansı gösteren grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük (1.900 vs 2.500, p .004) saptanmıştır. Bununla ilişkili olarak da NLR, HPV persistansı grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek (2.4 vs 1.6) saptanmıştır. Ortalama lenfosit sayısı her ne kadar her iki grupta da normal değerler arasında (1000-4.800/ µl) olsa da ortalama lenfosit sayısının HPV persistansı grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olması azalmış/disfonksiyonel T lenfosit ilişkili antiviral immün yanıtın HPV persistansında rolü olabileceğini düşündürmüştür. Lökosit sayısı, trombosit sayısı, ortalama trombosit hacmi, nötrofil sayısı, PLR ve SII' de sistemik inflamasyon belirteçleri olarak çeşitli kanserlerde ve preinvaziv klinik durumlarda prognostik faktörler olarak literatürde kullanılmışlardır (Qi ve ark.,2021; Yang ve ark.,2019). Ancak bizim çalışmamızda bu parametreler için iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Literatürde HPV persistansında bozulmuş immün yanıtla ilgili olarak yapılan çalışmalar vardır. Bu çalışmalardan birinde araştırmacılar özellikle >65 yaş grubunda, PHA, influenza virus ve HPV16 L1 VLP' ye karşı azalmış lenfoproliferatif yanıt olduğunu göstermişlerdir(Garcia-Pineros ve ark.,2006). Aynı araştırmacılar daha sonra bu fenomenin altında yatan nedeni araştırmak için yaptıkları çalışmada, persiste HPV enfeksiyonu olan bireylerin plazmasında artmış sistemik inflamatuvar sitokinleri (IL-6,IL-8, TNFalfa, MIP-1alfa, GM-CSF, IL-1beta, ve IL-1alfa) tespit etmiş, ve bu artışın, persistansın süresi ve yüksek ya da düşük risk HPV pozitifliği olmasından bağımsız geliştiğini göstermişlerdir(Kemp ve ark.,2010). HPV persistansı gösteren hastalardaki sistemik lenfosit dağılımında farklılık var mıdır

hipoteziyle yaptığımız periferik venöz kan akım sitometri incelemelerinde; HPV persistansı gösteren grupta CD3+ ve CD3+CD4+ T lenfosit yüzdeleri HPV klerensi grubundan farklılık göstermezken, CD3+CD8+ T lenfosit yüzdeleri (24.5 vs 35.8 , p.014) HPV persistansı grubunda daha düşük saptanmıştır. Literatürdeki periferik kan lenfosit immünotiplendirilmesi ile ilgili yayınlara baktığımızda 2019 yılında yayınlanan bir makalede lenfositlerin kanda bulunma yüzdeleri şu şekilde bildirilmiştir; CD3+ T hücreler %56-84, CD3+CD4+ T hücreler %30-55, CD3+CD8+ T hücreler %13-43, CD19+B hücreler % 5-49, CD3-CD56+ hücreler %3-28, CD4/CD8 oranı 0.8-3.9 (Kokuina ve ark.,2019). Başka bir referans değer çalışmasında CD3-CD16+56+ NK hücre yüzdesi %6-37 arasında bildirilmiştir, CD3+CD16+56+ NKT hücreleri ise kanda oldukça düşük düzeyde bulunmakta ve bu değer bir literatürde <%1 (Xu ve ark.,2021) olarak verilirken bir diğerinde %2.5 (Min ve ark.,2021) olarak bildirilmektedir. Bu hücreler hem T hem NK hücre özelliklerini taşımakta, NK hücrelerden farklı olarak antijen spesifik reseptörler taşımaktadır(Min ve ark.,2021) .Bizim sonuçlarımız iki grupta birbirinden anlamlı fark göstermezken literatürde bildirilen bu değerlerle uyumludur. Bir çalışma grubunun CD4-CD8- çift negatif T hücreleri için yaptıkları referans değer belirleme çalışmasında, medyan değer % 3.4 (1.6-7.4) olarak bulunmuştur(Carlos ve ark.,2020). Bizim çalışmamızda bu hücre grubu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark olmamakla birlikte HPV persistansı grubunda literatürde bildirilenden yüksek ortalama yüzde değerleri saptanmıştır. Bu CD4-CD8- çift negatif hücrelerin literatürde bildirilen periferik immün toleransı indükleyici rolü ve inflamatuvar yanıtların regülasyonuna katılması özelliği, HPV enfeksiyonunun persiste etmesinde rolü olabileceği yönünde yorumlanmıştır. CD4+CD8+ çift pozitif hücrelere baktığımızda ise periferik kanda 75. persentil değeri %1 olarak bildirilmiş ve kadınlarda bir miktar daha yüksek olduğu vurgulanmıştır(Marini ve ark.,2020). Bizim çalışmamızda iki grupta da ortalama %1.4 olarak literatürde bildirilenden çok hafif yüksek bir değer saptanmıştır.

GDT hücrelerinin periferik kanda bulunma yüzdeleri iki grup arasında fark göstermezken GDT hücrelerinin, kendi içindeki CD4 ve CD8 ekspresyon dağılımlarına baktığımızda, CD8+ GDT hücrelerinin tüm GDT hücrelerine yüzdesi HPV persistansı grubunda klerens grubuna göre daha düşük (22.6 vs 32.2 , p .021) saptanmıştır. Sistemik immünitadaki

sitotoksik T lenfositler aleyhine görünen bu tablonun HPV'e karşı gelişen sitotoksik antiviral immün yanıtın defektif olabileceğini, persistansın da bununla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. CD8+ T lenfosit yanıtının antiviral / antitümoral immün yanıtındaki önemi göz önüne alındığında bu bulgu immünolojik perspektifle de uyumludur. Literatürde HPV persistansı ve immünite ile ilgili immünolojik çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bizim çalışmamızda saptadığımız, HPV persistansında sitotoksik T lenfosit aleyhine hücresel dağılımdaki farklılaşma daha önce bildirilmemiştir. Ancak periferel kanda immünfenotiplendirme ile ilgili , 45-75 yaş arası kadınlardaki HPV persistansı ve sistemik immünite arasındaki ilişkiyi inceleyen bir yayında , persistans gösteren bireylerde , CD69 ve HLADR eksprese eden aktive CD4+ T hücrelerinde ve diferansiye hafıza hücreleri işaret eden CD45RO+CD27-CD8+ T hücrelerinde HPV ile enfekte olmayan gruba göre artış saptanmıştır. Bu hücre gruplarında artış, HPV persistansında selüler immünitede aktivasyon/artışı işaret etmektedir. Bu çalışmada ayrıca indifferansiye hafıza hücreleri olan CD45RO+CD27+CD4+ T hücrelerinde persistansla negatif korelasyon saptanmıştır(Rodriguez ve ark.,2011). Bu çalışmanın ve bizim çalışmamızın sonuçlarından görmekteyiz ki, her ne kadar HPV enfeksiyonu lokal bir enfeksiyon olsa da, periferel immün sistemde T hücre alttıplerinde aktivasyon/differansiasyon/azalma yönünde değişikliklerle ilişkili olabilmektedir. Bizim çalışmamızda her ne kadar CD3+CD8+ T lenfosit ortalama yüzdesi persistans grubunda klerens grubuna göre daha düşük çıksa da, olması gereken normal aralıkta seyretmektedir. Bu da immün hücrelerin az miktar değişimlerinin bile konağın HPV enfeksiyonu mücadelesinde önemli olduğunu göstermektedir. Burada tespit edilen immünolojik disregülasyonun mu HPV persistansına eğilime yol açtığı, yoksa HPV persistansının mı gözlemlenen immünolojik değişikliklere yol açtığını tespit etmek bu çalışmamızla mümkün olmamıştır. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da hem CD3+CD4+ T hücrelerin yüzdesi hem de GDT hücreler içindeki CD4+ hücrelerin yüzdesi aynı CD3+CD8+ hücrelerde olduğu gibi klerens grubuna göre persistans grubunda daha düşük çıkmıştır ve p değeri istatistiksel olarak anlamlı olmaya çok yakındır (p :0.06).

Bizim çalışmamızda ayrıca periferel kanda , klerens grubunda CD3-GDT hücrelerinin yüzdesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek (3.4 vs 11.5, p .013) olduğu

görülmüştür. Literatürde daha önce alfabetaTCR taşıyan klasik T hücrelerinin aksine gammadeltaTCR taşıyan GDT1 hücrelerinin, CD3 kompleksini oluşturan zincirlerden epsilon subunitinin hiç eksprese edilmemesi ya da çok düşük eksprese edilmesi nedeniyle CD3e^{low} ve CD3e^{high} olarak iki popülasyona ayrıldığı bildirilmiştir. Yazarlar tarafından bu hücrelerin antijenik stimülasyona daha az yanıtı olabileceği, hatta bu fenotipi gösteren GDT hücrelerinin terminal diferansiasyon fenotipinde olduğu ve PD-1 eksprese ettiği gösterilmiş bu tablonun da bu hücrelerin daha önce aktive edildiği ve inaktive duruma geçtiği yönünde yorumlanmıştır(Dunne ve ark.,2018). Bu hücreler GDT hücreler için ana fonksiyonlardan biri olan IL-17 üretme kabiliyeti açısından test edildiklerinde ise PMA/I stimülasyonuna exvivo yanıtlarının, IL-17 üretme yönünde negatif olduğu görülmüş ve dolayısıyla bu hücrelerin inaktif terminal diferansiye hücreler olduğu doğrulanmıştır(Dunne ve ark.,2018). Bizim çalışmamızda klerens grubunda bu CD3-GDT hücrelerin daha fazla bulunması HPV klerensinde GDT hücrelerin önemli rol oynadığını düşündürmüştür. Ayrıca CD3-GDT2 hücreleri iki grup arasında farklı olmadığından bu farkın GDT1 hücrelerinden kaynaklandığı varsayılmıştır. CD3+GDT hücrelerinin periferik kanda dağılımı ile ilgili yapılan çalışmalarda, %69 oranında GDT hücrelerinin total lenfositlerin %10' dan azını oluşturduğu, %22 oranında %10-20 aralığında bulunabildiği, %8 ise %20' den fazla olabileceği bildirilmiştir(Roden ve ark.,2008). Bizim çalışmamızda, periferik venöz kan CD3+ panGDT yüzdesinde, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla birlikte (%4.9 vs %8.6 p.071), bulgular literatürle uyumlu ve normal sınırlarda çıkmıştır. Her ne kadar aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmasa da persistans grubunda daha düşük ortalama CD3+panGDT yüzdesi olduğu görülmüştür. GDT hücrelerinin antiviral immün yanıtındaki önemi göz önünde bulundurulduğunda bu fark önem arz etmektedir. Periferik kan GDT hücrelerinin CD4+ ve CD8+ 'lığı için dağılımına baktığımızda en çok CD4-CD8- çift negatif GDT (%28.1) ve CD4+GDT (%30.2) hücrelerinin baskın olduğunu görmekteyiz. Bu hücreler persistans ve klerens grubunda farklılık göstermemektedir. Üçüncü en sık hücre grubu CD8+GDT hücreleri (%22.6) ve en az oranla CD4+CD8+ çift pozitif GDT hücrelerinin (%3.2) bulunduğunu görmekteyiz. CD8+GDT oranının persistans grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olmasından ve olası etkilerinden daha önce bahsetmiştik. HPV persistansı ile ilişkili CD8+GDT hücre fraksiyonunda azalma literatürde daha önce

tanımlanmamıştır. Literatürde CD4+ GDT hücrelerin periferal kandaki sıklığı için oldukça nadir olarak bahsedilmekte ve sayı olarak oldukça kısıtlı olarak bildirilmektedir(Andreu-Ballester ve ark.,2012). Literatürde sağlıklı bireylerde periferal kan GDT hücrelerinin yüzey markerlarının dağılımına bakıldığında, GDT hücrelerin büyük kısmının CD4 ve CD8 yüzey markerları için çift negatif, %20-30 kadarının CD8 + GDT olduğu, %0.1-7 kadarının da CD4+ GDT olduğu bildirilmiştir(Holmen Olofsson ve ark.,2021). Bizim çalışmamızda CD4+GDT oranın literatüre göre yüksek bulunmasının, azalan CD8+GDT fraksiyonunu kompanse etmek amacıyla olabileceği düşünülmüştür ve HPV persistansı ile böyle bir ilişki literatürde daha önce tanımlanmamıştır. Bu konuyla alakalı olarak periferal kan CD4+GDT hücrelerinin, CD56 ko-ekspresyon düzeyiyle korele bir şekilde kanser hücrelerini öldürebileceği buradaki CD56+'lığının CD4+GDT hücreleri için bir sitotoksite markerı olduğu bildirilmiştir(Holmen Olofsson ve ark.,2021). Bizim çalışmamızda literatürden farklı olarak yüksek yüzdede saptanan CD4+GDT hücreleri her ne kadar çalışmamızda CD56 mab kullanılmış olsa da farklı panellerde olmaları nedeniyle CD56 ko-ekspresyonu için değerlendirilememiştir. Literatürde GDT hücresinin yüzde dağılımının değiştiği durumlar tanımlanmıştır. Örneğin kolon kanseri hastaları ve sağlıklı bireylerin karşılaştırıldığı bir çalışmada , CD3+GDT ve CD3+CD8+GDT hücreleri kolon kanseri grubunda sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış olarak bulunmuştur(Andreu-Ballester ve ark.,2020). Bizim çalışmamızda GDT1 ve GDT2 hücrelerin periferal kandaki dağılımına baktığımızda ise literatürle uyumlu bir şekilde GDT2 hücrelerinin GDT1 hücrelerine baskın olduğu (%63.2 vs %36.7) gözlemlenmiştir. GDT3 hücreleri dolaşımdaki T hücrelerinin yalnızca %0.2'sini oluşturması ve özellikle karaciğerde yerleşmeleri nedeniyle bizim çalışmamızda değerlendirilmemiştir (Mangan ve ark.,2013). GDT1/2 oranına baktığımızda ise periferal kandaki GDT hücrelerin büyük çoğunluğunu GDT2 hücrelerinin oluşturması nedeniyle, literatürde sayısal değeri normal popülasyonda %1'den küçük olarak bildirilmiştir(Li ve ark.,2021). Bazı kanserlerde bu oranın >1 olduğu da bildirilmiştir(Li ve ark.,2021). Bizim çalışmamızdaki sonuçlar bu anlamda literatürle uyumludur.

Endoservikal örneklerden yapılan akım sitometri analizi sonuçlarını değerlendirecek olursak , her iki grupta elde edilen CD45+ hücre yüzdeleri (%2.3 vs %1.9 p.59) literatürde verilen %2.7 (Strbo ve ark.,2016) değeri ile oldukça yakındır ve iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark yoktur. HPV persistansı gösteren grupta, CD3+ T lenfosit (%52 vs %73.6 p.004), CD3+CD8+ T lenfosit (%9.8 vs %20.2 p.013) HPV klerensi gösteren gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük saptanmıştır. CD3+CD4+ T lenfosit ise (%37.6 vs %14.1, p.002) HPV persistansı grubunda anlamlı derecede daha yüksek saptanmıştır. Artan CD4+ T lenfosit ve azalan CD8+ T lenfosit nedeniyle CD4/CD8 oranı da istatistiksel olarak anlamlı derecede persistans grubunda daha yüksek saptanmıştır. Buradan periferik kan örneklerinde ortaya koyduğumuz HPV persistansında CD8+sitotoksik T lenfositlerin deplese olduğu (istatistiksel olarak anlamlı), CD4+T helper hücrelerin kompansatris artış gösterdiği (istatistiksel olarak anlamlı değil) immün profilin, lokal immüniteye yansıdığı (istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde) gözlemlenmektedir. Endoservikal GDT hücrelerin total lenfosit yüzdesine baktığımızda, daha önce bildirilen verilerle uyumlu bir şekilde oldukça yüksek yüzdelere (%41.2 vs %42.7, p .86) görmekteyiz . Literatürde akciğer, bağırsak ve cilt gibi bariyer dokularda GDT hücrelerinin %10-100 oranında bulunabilecekleri bildirilmiştir.(Mangan ve ark.,2013). Bizim çalışmamızda, GDT hücrelerinin, endoservikal dokudaki alttiplerinin dağılımına baktığımızda, HPV persistansı grubunda GDT hücrelerinin %65 oranında GDT1 hücrelerinden oluştuğunu görmekteyiz. HPV persistansı grubunda GDT1 oranı tüm lenfositlerin %26.8'i iken, klerens grubunda %32.1'idir. Görüldüğü üzere klerens grubunda GDT1 hücre yüzdesi daha fazla olmakla birlikte istatistiksel anlamlı bir fark elde edilememiştir (p .44). GDT1/2 oranı da GDT1 ve GDT2 hücrelerindeki fark nedeniyle beklendiği üzere HPV klerensi grubunda daha yüksek olmakla birlikte, iki grup arasında anlamlı fark yoktur. CD3+CD4+ GDT oranlarına baktığımızda ise periferik kandaki tablonun tam tersine ortalama yüzde değerlerinde, HPV persistansı grubunda belirgin artış ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (%38.6 vs %15, p .004). CD3+CD8+ GDT oranları ise periferik kandaki ile benzer şekilde klerens grubuna göre HPV persistansı grubunda belirgin olarak daha düşüktür (%7.2 vs %15.1, p .030) . Buradan yola çıkarak; HPV persistansında, hem genel , hem lokal immünitede, sitotoksik lenfositlerde azalma olduğu ve endoservikal dokudaki CD3+CD8+ T hücrelerinin

%73.4'ünü GDT hücreler oluşturduğundan, lokal sitotoksik hücrelerdeki azalmanın esas olarak CD3+CD8+GDT hücrelerindeki azalmadan kaynaklandığı ortaya konmuştur. Aynı şekilde endoservikal mukozadaki CD3+CD4+T hücrelerinin tamamına yakını GDT hücrelerinden oluştuğundan, bu artıştan da yine GDT hücreleri sorumludur denebilir. Endoservikal mukozadaki GDT hücrelerinin, kendi içindeki dağılımına bakacak olursak, periferik kandan farklı olarak, endoservikal CD4-CD8-GDT hücreler hem HPV persistansı hem de HPV klerensi grubunda büyük çoğunluğu oluşturmaktadır. Ancak persistans grubunda, klerens grubuna göre belirgin olarak azalmıştır (%51.1 vs %65, p .041). Endoservikal mukozada CD3+CD4+GDT hücreleri, ikinci en sık GDT alttipidir ve beklendiği gibi persistans grubunda klerens grubuna göre belirgin yüksek saptanmıştır (%32.1 vs %12.9, p .017) . CD3+CD8+ GDT hücreleri endoservikal mukozada üçüncü sıklıkta gördüğümüz GDT alttipidir ve HPV persistansı grubunda klerens grubuna göre istatistiksel anlamlı bir şekilde belirgin olarak daha düşük saptanmıştır (%7.2 vs %15.1, p .048). Bu çalışma, kadın genital sisteminde GDT hücreleri ve HPV ilişkisini inceleyen ilk çalışmadır. HPV persistansında hem periferik kanda gösterilen genel immünofenotiplerin dağılımındaki farklılık, hem de endoservikal örneklerde gösterilen lokal immünofenotip dağılımındaki farklılık, literatürde ilk kez ortaya konmuş oldukça önemli bulgulardır.

GDT hücreleri, regülatuar potansiyel, antijen sunma kapasitesi, B hücresi yardımcı aktivitesi gibi geniş işlevsel plastisite gösterir ve çeşitli sitokinlerin üretimi için potansiyele sahiptir (Kabelitz ve He,2012). Ayrıca GDT hücreleri pro ve antitümör özellikleri gösterebilir. Bu antitümör özellikler ile, GDT hücrelerinin çeşitli modellerde SCC oluşumuna karşı koruyabileceği gösterilmiştir (Girardi ve ark.,2003; Girardi ve ark.,2001). Aynı zamanda Van Hede ve ark. HPV 16 onkoproteinlerinin fare derisindeki GDT hücreleri üzerindeki rolünü değerlendiren bir çalışma yürütmüş ve HPV onkoproteinlerinin, anjiyogenezi ve kanser gelişimini destekleyen esas olarak proanjiyogenik IL17A salgılayan GDT hücrelerini desteklediği anormal bir GDT dağılımına neden olduğunu göstermiştir. İnsan servikal biyopsi örneklerinde proanjiyogenik değişiklik, preinvasif hastalık aşamasında değil, sadece skuamöz hücreli kanser evresinde gözlenmiştir (Van Hede ve ark.,2017). GDT dağılımındaki

değişiklikleri, insanda viral enfeksiyonlara karşı test etmek için Strbo ve ark. HIV pozitif ve negatif kadınlarda GDT hücrelerini incelemiş ve endoservikal GDT 1 hücrelerinin HIV pozitif kadınlarda azaldığını göstermiştir. Çalışmalarında GDT hücrelerini yüzey moleküllerine göre ayrıntılı olarak tanımlamışlardır. Genital mukozanın sabit bir durumda gerçek gözetiminden sorumlu olan baskın alt türün GDT 1 hücreleri olduğunu ve bu hücrelerin temel olarak CD4-CD8-çift negatif hücreler olduklarını belirtmişlerdir. Bununla birlikte, şaşırtıcı bir şekilde, HIV pozitif hastalarda daha yüksek CD8 + endoservikal GDT1 ve GDT2 hücrelerinin olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte GDT 2 hücreleri, yüzeylerinde CD4'ü eksprese edebilir ve aktivasyon durumunda bölgede bulunabilir (Strbo ve ark.,2016). Mürin uterusunda yapılan bir çalışmada, GDT hücrelerinde azalmanın candida albicansa azalmış rezistans ile ilişkili olduğu ve bununla birlikte L-17 bağımlı nötrofil yanıtında azalma olduğu bildirilmiştir(Monin ve ark.,2020). Başka bir çalışmada, Alcaide ve ark. genital mukozadaki baskın GDT hücrelerinin alt tipini analiz etmiş ve normal vajinal florası olan kadınlarda daha fazla GDT1 hücresi ve anormal vajinal florası olan kadınlarda daha fazla GDT2 hücresi bulmuşlardır. Ayrıca, GDT hücrelerinin, dişi genital sisteminin HIV'ye karşı hassasiyetin bir göstergesi olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (Alcaide ve ark.,2016). Tuero ve ark. SIV ile enfekte olmuş Rhesus makaklarındaki genital mukozal ve sistemik GDT hücrelerini analiz etmiş ve insan periferik kanının aksine, R. makaklarının kanlarında GDT2'den daha fazla GDT1 hücresine sahip olduğunu gözlemlemiştir. Bu çalışmada genital mukozadaki GDT1 ve GDT2 hücreleri vajinal, ektoservikal ve endoservikal dokular arasında karşılaştırılabilir düzeydedir. Bu popülasyonda, CD8 + ve çift negatif (CD4- CD8-) alt grupları, GDT1 ve GDT2 hücreleri açısından, mukozal dokular arasında benzerdir. Şaşırtıcı bir şekilde, SIV ile enfekte olmuş makakların genital mukozasında sadece birkaç CD4 + ve çift pozitif (CD4 + CD8 +) hücre gözlenmiştir (Tuero ve ark.,2016). Bu çalışmanın sonucunda, daha önce çalışılmamış olmasına rağmen, dişi genital sistemde yerleşik GDT hücrelerinin mukozanın dinamik bir bölümü olduğu, SIV'a karşı antiviral immünitede, dağılımları ve fonksiyonel kabiliyetlerindeki (özellikle GDT1) herhangi bir değişikliğin antiviral immün yanıtta zayıflamaya yol açabileceği gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak, aynı tablonun HPV enfeksiyonu için de geçerli olabileceği, mukozal GDT hücrelerdeki defektin

hastalığın erken döneminde kontrolü zorlaştırarak, persiste HPV enfeksiyonu ve servikal karsinogeneze rol oynayabileceği düşünülmüştür.

DC'nin, doğuştan gelen lenfositlerle etkileşimlerinin, enfeksiyona bütünleşik bir bağışıklık tepkisi için ana kontrol mekanizmasını temsil ettiği iyi bilinmesine rağmen, GDT hücrelerinde gerçekleşecek değişikliklerin, keratinositler, DC-LC ve GDT hücreleri arasındaki anormal çapraz iletişime yol açarak patogeneze katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Hücreler arasındaki crosstalk ile ilgili olarak, Cardone ve ark. HIV'in DC'nin fonksiyonel GDT aktivasyonunu destekleme kapasitesini azalttığını bildirmiştir (Cardone ve ark.,2015). Burada görülmektedir ki, GDT hücrelerini içeren karmaşık çapraz iletişim, HIV enfeksiyonunda antiviral bağışıklık tepkisini etkilemektedir. Cimini ve ark. Primer ve kronik HIV enfeksiyonunun dolaşımdaki ve bağırsaklardaki etkilerini incelemiştir. İlişkili GDT hücreleri, efektör GDT1 hücrelerinin sıklığında, hem dolaşımda hem de mukozal kompartmanlarda bir artış gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, GDT2 hücreleri tarafından kendiliğinden oluşan IFN- γ üretimi kronik HIV enfeksiyonunda kaybolmuştur. Bu nedenle, primer HIV enfeksiyonu sırasındaki mukozal GDT1 ve GDT2 hücrelerinin fonksiyonel kabiliyetlerinin kronik HIV'de kaybolduğu ve persiste antijenik stimülasyonun indüklediği tükenme mekanizmalarının ortaya çıktığını belirtmişlerdir (Cimini ve ark.,2015). Biz, bu çalışmamızda persiste HPV enfeksiyonunda da benzer tükenme ile karşılaşılabilceğini öngörmekle birlikte bu hipotez bundan sonraki çalışmalarımızın konusu olacaktır. Hedef hücreler ve yaşam döngüleri HPV ve HIV için farklı olsa da, bağışıklık sistemi tarafından viral enfeksiyonun kontrolü aynı hücre üyelerini ve mekanizmalarını içerir, bu nedenle diğer virüsler (HIV) bağlamında bildiklerimiz GDT hücreleri ve HPV ile ilişkilerine ışık tutabilir. Diğer mukozalarda (respiratuar, Gastrointestinal sistem) birinci basamak savunmada GDT hücrelerinin varlığı, bu hücrelerin antiviral çözünür faktörler üreterek güçlü ve hızlı antiviral aktivite göstermesi ve enfekte olmuş hücrelerin öldürülmesi ve ayrıca GDT hücrelerinin HPV (CMV / HIV) dışındaki viral hastalıktaki rollerinin kanıtları, GDT hücreleri ve HPV persistansı arasındaki ilişkinin makul olduğunu göstermektedir. Nonlitik enfeksiyon ve viremi yokluğu, HPV'nin immün kaçınma mekanizmalarını desteklemiş olsa da, HPV gibi bir intraepitelyal enfeksiyon, eğer mevcut ve tamamen işlevselse, normalde GDT hücreleri

veya LC tarafından yakalanıp etkin immün yanıt başlatılabilmelidir. Bununla birlikte HPV enfeksiyonunun başlangıcında, APC'lerin (LC / DC) zayıf stim lasyonu ve olgunlaşması, GDT hücrelerinin süreçte eksik halka olduğu fikrine yol açmış ve bu hipotezimizi oluşturmamızda destek olmuştur. . Bu  alışma özellikle genital mukoza da ilk savunma bölgesinde periferik kan dışında GDT lenfositlerin çok daha etkin olduğunu , sitotoksik antiviral yanıtın virüs temizlenmesinde özellikle önemli olabileceğini ve eksikliklerinin de özellikle lokal immün yanıtta viral persistansda önemli olabileceğini akla getirmektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bizim çalışmamızın ışığında, literatürde oldukça az çalışılan HPV persistansının altında yatan immünolojik nedenler araştırılmış ve bir miktar aydınlatılmış olmakla birlikte bu konuda halen daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu konunun aydınlatılması ile toplumda oldukça sık görülen ve serviks kanseri gelişimi ile ilişkili olan persiste HPV enfeksiyonunun kimlerde persiste edeceği , hangi hastaların serviks kanseri açısından yüksek riskli olacağı tespit edilebilecek, daha yakın monitörizasyon/tarama/takip ile bu bireyler kanserden korunabileceklerdir. Bununla birlikte, gelecekte gelişen teknolojiler ile, bu bireylerdeki defektif GDT profili, GDT hücrelerini içeren sistemik ya da lokal adaptif terapilerle tedavi edilebilecektir. Bu çalışma, özellikle HPV persistansı olabilecek hastaları öngörmede, bazı immün markerların ve CD8+GDT gibi değerlerin önemli olabileceğini göstermesi açısından da önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Acmaç, G., Aksoy, H., Unal, D., Ozyurt, S., Cingillioglu, B., Aksoy, U., Muderris, I. 2014." Are neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratios associated with endometrial precancerous and cancerous lesions in patients with abnormal uterine bleeding?", *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(4), 1689-1692.
- Alcaide, M.L., Strbo, N., Romero, L., Jones, D.L., Rodriguez, V.J., Arheart, K., Martinez, O., Bolivar, H., Podack, E.R., Fischl, M.A. 2016." Bacterial Vaginosis Is Associated with Loss of Gamma Delta T Cells in the Female Reproductive Tract in Women in the Miami Women Interagency HIV Study (WIHS): A Cross Sectional Study", *PLoS One*, 11(4), e0153045.
- Amador-Molina, A., Hernandez-Valencia, J.F., Lamoyi, E., Contreras-Paredes, A., Lizano, M. 2013." Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response", *Viruses*, 5(11), 2624-2642.
- Amjadi, F., Salehi, E., Mehdizadeh, M., Aflatoonian, R. 2014." Role of the innate immunity in female reproductive tract", *Adv Biomed Res*, 3, 1.
- Andreu-Ballester, J.C., Galindo-Regal, L., Hidalgo-Coloma, J., Cuellar, C., Garcia-Ballesteros, C., Hurtado, C., Uribe, N., Del Carmen Martin, M., Jimenez, A.I., Lopez-Chulia, F., Llombart-Cussac, A. 2020." Differences in circulating gammadelta T cells in patients with primary colon cancer and relation with prognostic factors", *PLoS One*, 15(12), e0243545.
- Andreu-Ballester, J.C., Garcia-Ballesteros, C., Benet-Campos, C., Amigo, V., Almela-Quilis, A., Mayans, J., Ballester, F. 2012." Values for alphabeta and gammadelta T-lymphocytes and CD4+, CD8+, and CD56+ subsets in healthy adult subjects: assessment by age and gender", *Cytometry B Clin Cytom*, 82(4), 238-244.
- Arbyn, M., Weiderpass, E., Bruni, L., de Sanjose, S., Saraiya, M., Ferlay, J., Bray, F. 2020." Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis", *Lancet Glob Health*, 8(2), e191-e203.
- Bais, A.G., Beckmann, I., Lindemans, J., Ewing, P.C., Meijer, C.J., Snijders, P.J., Helmerhorst, T.J. 2005." A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions", *J Clin Pathol*, 58(10), 1096-1100.
- Barros, M.R., Jr., de Melo, C.M.L., Barros, M., de Cassia Pereira de Lima, R., de Freitas, A.C., Venuti, A. 2018." Activities of stromal and immune cells in HPV-related cancers", *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1), 137.
- Bashaw, A.A., Leggatt, G.R., Chandra, J., Tuong, Z.K., Frazer, I.H. 2017." Modulation of antigen presenting cell functions during chronic HPV infection", *Papillomavirus Res*, 4, 58-65.
- Bhat, S.A., Vedpathak, D.M., Chiplunkar, S.V. 2018." Checkpoint Blockade Rescues the Repressive Effect of Histone Deacetylases Inhibitors on gammadelta T Cell Function", *Front Immunol*, 9, 1615.

Bruni, L., Diaz, M., Castellsague, X., Ferrer, E., Bosch, F.X., de Sanjose, S. 2010." Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings", *J Infect Dis*, 202(12), 1789-1799.

Bzhalava, D., Muhr, L.S., Lagheden, C., Ekstrom, J., Forslund, O., Dillner, J., Hultin, E. 2014." Deep sequencing extends the diversity of human papillomaviruses in human skin", *Sci Rep*, 4, 5807.

Cardone, M., Ikeda, K.N., Varano, B., Gessani, S., Conti, L. 2015." HIV-1-induced impairment of dendritic cell cross talk with gammadelta T lymphocytes", *J Virol*, 89(9), 4798-4808.

Carlos, A.R., Franzolin, F., Alvim, M.H. 2020." [Problematization of gender relations at the first Brazilian Eugenics Conference: the status of women, determination of biological gender and reproductive control]", *Hist Cienc Saude Manguinhos*, 27(3), 781-801.

Carter, J.J., Koutsky, L.A., Hughes, J.P., Lee, S.K., Kuypers, J., Kiviat, N., Galloway, D.A. 2000." Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection", *J Infect Dis*, 181(6), 1911-1919.

Cheroutre, H., Lambolez, F., Mucida, D. 2011." The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes", *Nat Rev Immunol*, 11(7), 445-456.

Chun, S., Shin, K., Kim, K.H., Kim, H.Y., Eo, W., Lee, J.Y., Namkung, J., Kwon, S.H., Koh, S.B., Kim, H.B. 2017." The Neutrophil-Lymphocyte Ratio Predicts Recurrence of Cervical Intraepithelial Neoplasia", *J Cancer*, 8(12), 2205-2211.

Cimini, E., Agrati, C., D'Offizi, G., Vlassi, C., Casetti, R., Sacchi, A., Lionetti, R., Bordoni, V., Tumino, N., Scognamiglio, P., Martini, F. 2015." Primary and Chronic HIV Infection Differently Modulates Mucosal Vdelta1 and Vdelta2 T-Cells Differentiation Profile and Effector Functions", *PLoS One*, 10(6), e0129771.

Coussens, L.M., Werb, Z. 2002." Inflammation and cancer", *Nature*, 420(6917), 860-867.

Da Silva, D.M., Woodham, A.W., Skeate, J.G., Rijkee, L.K., Taylor, J.R., Brand, H.E., Muderspach, L.I., Roman, L.D., Yessaian, A.A., Pham, H.Q., Matsuo, K., Lin, Y.G., McKee, G.M., Salazar, A.M., Kast, W.M. 2015." Langerhans cells from women with cervical precancerous lesions become functionally responsive against human papillomavirus after activation with stabilized Poly-I:C", *Clin Immunol*, 161(2), 197-208.

Dar, A.A., Patil, R.S., Chiplunkar, S.V. 2014." Insights into the Relationship between Toll Like Receptors and Gamma Delta T Cell Responses", *Front Immunol*, 5, 366.

de Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., Plummer, M. 2012." Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis", *Lancet Oncol*, 13(6), 607-615.

de Martel, C., Plummer, M., Vignat, J., Franceschi, S. 2017." Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type", *Int J Cancer*, 141(4), 664-670.

de Sanjose, S., Brotons, M., Pavon, M.A. 2018." The natural history of human papillomavirus infection", *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 47, 2-13.

de Sanjose, S., Diaz, M., Castellsague, X., Clifford, G., Bruni, L., Munoz, N., Bosch, F.X. 2007." Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis", *Lancet Infect Dis*, 7(7), 453-459.

Deligeoroglou, E., Giannouli, A., Athanasopoulos, N., Karountzos, V., Vatopoulou, A., Dimopoulos, K., Creatsas, G. 2013." HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy", *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2013, 540850.

Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I.G., Stoler, M., Broker, T.R., Stanley, M.A. 2012." The biology and life-cycle of human papillomaviruses", *Vaccine*, 30 Suppl 5, F55-70.

Dudas, J., Fullar, A., Bitsche, M., Schartinger, V., Kovalszky, I., Sprinzl, G.M., Riechelmann, H. 2011." Tumor-produced, active interleukin-1beta regulates gene expression in carcinoma-associated fibroblasts", *Exp Cell Res*, 317(15), 2222-2229.

Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D. 2004." The three Es of cancer immunoediting", *Annu Rev Immunol*, 22, 329-360.

Dunne, P.J., Maher, C.O., Freeley, M., Dunne, K., Petrasca, A., Orikiiriza, J., Dunne, M.R., Reidy, D., O'Dea, S., Loy, A., Woo, J., Long, A., Rogers, T.R., Mulcahy, F., Doherty, D.G. 2018." CD3epsilon Expression Defines Functionally Distinct Subsets of Vdelta1 T Cells in Patients With Human Immunodeficiency Virus Infection", *Front Immunol*, 9, 940.

Edelblum, K.L., Shen, L., Weber, C.R., Marchiando, A.M., Clay, B.S., Wang, Y., Prinz, I., Malissen, B., Sperling, A.I., Turner, J.R. 2012." Dynamic migration of gammadelta intraepithelial lymphocytes requires occludin", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(18), 7097-7102.

Garcia-Pineros, A.J., Hildesheim, A., Herrero, R., Trivett, M., Williams, M., Atmetlla, I., Ramirez, M., Villegas, M., Schiffman, M., Rodriguez, A.C., Burk, R.D., Hildesheim, M., Freer, E., Bonilla, J., Bratti, C., Berzofsky, J.A., Pinto, L.A. 2006." Persistent human papillomavirus infection is associated with a generalized decrease in immune responsiveness in older women", *Cancer Res*, 66(22), 11070-11076.

Giannini, S.L., Hubert, P., Doyen, J., Boniver, J., Delvenne, P. 2002." Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix", *Int J Cancer*, 97(5), 654-659.

Gilham, C., Sargent, A., Kitchener, H.C., Peto, J. 2019." HPV testing compared with routine cytology in cervical screening: long-term follow-up of ARTISTIC RCT", *Health Technol Assess*, 23(28), 1-44.

Girardi, M., Glusac, E., Filler, R.B., Roberts, S.J., Propperova, I., Lewis, J., Tigelaar, R.E., Hayday, A.C. 2003." The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR)gammadelta+ and TCRalphabeta+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer", *J Exp Med*, 198(5), 747-755.

Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R.E., Hayday, A.C. 2001." Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells", *Science*, 294(5542), 605-609.

Graham, S.V. 2017." The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review", Clin Sci (Lond), 131(17), 2201-2221.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M. 2010." Immunity, inflammation, and cancer", Cell, 140(6), 883-899.

Guthrie, G.J., Charles, K.A., Roxburgh, C.S., Horgan, P.G., McMillan, D.C., Clarke, S.J. 2013." The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: experience in patients with cancer", Crit Rev Oncol Hematol, 88(1), 218-230.

Hammes, L.S., Tekmal, R.R., Naud, P., Edelweiss, M.I., Kirma, N., Valente, P.T., Syrjanen, K.J., Cunha-Filho, J.S. 2007." Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression--clinicopathological correlation", Gynecol Oncol, 105(1), 157-165.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000." The hallmarks of cancer", Cell, 100(1), 57-70.

Hasan, U.A., Bates, E., Takeshita, F., Biliato, A., Accardi, R., Bouvard, V., Mansour, M., Vincent, I., Gissmann, L., Iftner, T., Sideri, M., Stubenrauch, F., Tommasino, M. 2007." TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16", J Immunol, 178(5), 3186-3197.

Herfs, M., Yamamoto, Y., Laury, A., Wang, X., Nucci, M.R., McLaughlin-Drubin, M.E., Munger, K., Feldman, S., McKeon, F.D., Xian, W., Crum, C.P. 2012." A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer", Proc Natl Acad Sci U S A, 109(26), 10516-10521.

Hickey, D.K., Patel, M.V., Fahey, J.V., Wira, C.R. 2011." Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections", J Reprod Immunol, 88(2), 185-194.

Holmen Olofsson, G., Pedersen, S.R., Aehnlich, P., Svane, I.M., Idorn, M., Thor Straten, P. 2021." The capacity of CD4(+) Vgamma9Vdelta2 T cells to kill cancer cells correlates with co-expression of CD56", Cytotherapy, 23(7), 582-589.

Hong, S., Laimins, L.A. 2017." Manipulation of the innate immune response by human papillomaviruses", Virus Res, 231, 34-40.

Iwasaki, M., Tanaka, Y., Kobayashi, H., Murata-Hirai, K., Miyabe, H., Sugie, T., Toi, M., Minato, N. 2011." Expression and function of PD-1 in human gammadelta T cells that recognize phosphoantigens", Eur J Immunol, 41(2), 345-355.

Jameson, J., Ugarte, K., Chen, N., Yachi, P., Fuchs, E., Boismenu, R., Havran, W.L. 2002." A role for skin gammadelta T cells in wound repair", Science, 296(5568), 747-749.

Juno, J.A., Boily-Larouche, G., Lajoie, J., Fowke, K.R. 2014." Collection, isolation, and flow cytometric analysis of human endocervical samples", J Vis Exp(89).

Kabelitz, D., He, W. 2012." The multifunctionality of human Vgamma9Vdelta2 gammadelta T cells: clonal plasticity or distinct subsets?", Scand J Immunol, 76(3), 213-222.

- Kalinski, P., Hilken, C.M., Wierenga, E.A., Kapsenberg, M.L. 1999." T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal", *Immunol Today*, 20(12), 561-567.
- Kemp, T.J., Hildesheim, A., Garcia-Pineros, A., Williams, M.C., Shearer, G.M., Rodriguez, A.C., Schiffman, M., Burk, R., Freer, E., Bonilla, J., Herrero, R., Pinto, L.A. 2010." Elevated systemic levels of inflammatory cytokines in older women with persistent cervical human papillomavirus infection", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(8), 1954-1959.
- Kocjan, B.J., Bzhalava, D., Forslund, O., Dillner, J., Poljak, M. 2015." Molecular methods for identification and characterization of novel papillomaviruses", *Clin Microbiol Infect*, 21(9), 808-816.
- Kojima, S., Kawana, K., Fujii, T., Yokoyama, T., Miura, S., Tomio, K., Tomio, A., Yamashita, A., Adachi, K., Sato, H., Nagamatsu, T., Schust, D.J., Kozuma, S., Taketani, Y. 2011." Characterization of gut-derived intraepithelial lymphocyte (IEL) residing in human papillomavirus (HPV)-infected intraepithelial neoplastic lesions", *Am J Reprod Immunol*, 66(5), 435-443.
- Kokuina, E., Breff-Fonseca, M.C., Villegas-Valverde, C.A., Mora-Diaz, I. 2019." Normal Values of T, B and NK Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood of Healthy Cuban Adults", *MEDICC Rev*, 21(2-3), 16-21.
- Kombe Kombe, A.J., Li, B., Zahid, A., Mengist, H.M., Bounda, G.A., Zhou, Y., Jin, T. 2020." Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation", *Front Public Health*, 8, 552028.
- Li, X.H., Lu, M.Y., Li, Y.J., Liu, Z.H., Yin, Z.N., Liu, B., Wu, Y.Z. 2021." Circulating PD1(+)Vdelta1(+)gammadelta T Cell Predicts Fertility in Endometrial Polyp Patients of Reproductive-Age", *Front Immunol*, 12, 639221.
- Liaw, K.L., Hildesheim, A., Burk, R.D., Gravitt, P., Wacholder, S., Manos, M.M., Scott, D.R., Sherman, M.E., Kurman, R.J., Glass, A.G., Anderson, S.M., Schiffman, M. 2001." A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types", *J Infect Dis*, 183(1), 8-15.
- Mangan, B.A., Dunne, M.R., O'Reilly, V.P., Dunne, P.J., Exley, M.A., O'Shea, D., Scotet, E., Hogan, A.E., Doherty, D.G. 2013." Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human Vdelta3 T cells", *J Immunol*, 191(1), 30-34.
- Mantovani, A., Sica, A. 2010." Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity", *Curr Opin Immunol*, 22(2), 231-237.
- Marini, A., Avino, D., De Donno, M., Romano, F., Morganti, R. 2020." Percentages and Absolute Numbers of CD4+CD8+ Double-positive T Lymphocytes in the Peripheral Blood of Normal Italian Subjects: Relationship with Age and Sex", *Turk J Haematol*, 37(2), 125-126.
- McMillan, D.C. 2013." The systemic inflammation-based Glasgow Prognostic Score: a decade of experience in patients with cancer", *Cancer Treat Rev*, 39(5), 534-540.

Mendez, F., Munoz, N., Posso, H., Molano, M., Moreno, V., van den Brule, A.J., Ronderos, M., Meijer, C., Munoz, A., Instituto Nacional de Cancerologia Human Papillomavirus Study, G. 2005." Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines", *J Infect Dis*, 192(7), 1158-1165.

Min, X.Y., Liu, C.F., Cao, B., Zhang, T., Yang, X., Ma, N., Wang, N., Li, K. 2021." Human CD3(+)CD56(+)NKT-like cells express a range of complement receptors and C3 activation has negative effects on these cell activity and effector function", *Hum Immunol*, 82(9), 625-633.

Mirabello, L., Clarke, M.A., Nelson, C.W., Dean, M., Wentzensen, N., Yeager, M., Cullen, M., Boland, J.F., Workshop, N.H., Schiffman, M., Burk, R.D. 2018." The Intersection of HPV Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis", *Viruses*, 10(2).

Mirabello, L., Yeager, M., Cullen, M., Boland, J.F., Chen, Z., Wentzensen, N., Zhang, X., Yu, K., Yang, Q., Mitchell, J., Roberson, D., Bass, S., Xiao, Y., Burdett, L., Raine-Bennett, T., Lorey, T., Castle, P.E., Burk, R.D., Schiffman, M. 2016." HPV16 Sublineage Associations With Histology-Specific Cancer Risk Using HPV Whole-Genome Sequences in 3200 Women", *J Natl Cancer Inst*, 108(9).

Mishalian, I., Bayuh, R., Levy, L., Zolotarov, L., Michaeli, J., Fridlender, Z.G. 2013." Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression", *Cancer Immunol Immunother*, 62(11), 1745-1756.

Monin, L., Ushakov, D.S., Arnesen, H., Bah, N., Jandke, A., Munoz-Ruiz, M., Carvalho, J., Joseph, S., Almeida, B.C., Green, M.J., Nye, E., Hatano, S., Yoshikai, Y., Curtis, M., Carlsen, H., Steinhoff, U., Boysen, P., Hayday, A. 2020." gammadelta T cells compose a developmentally regulated intrauterine population and protect against vaginal candidiasis", *Mucosal Immunol*, 13(6), 969-981.

Moody, C. 2017." Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes", *Viruses*, 9(9).

Moody, C.A., Laimins, L.A. 2010." Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation", *Nat Rev Cancer*, 10(8), 550-560.

Morita, C.T., Beckman, E.M., Bukowski, J.F., Tanaka, Y., Band, H., Bloom, B.R., Golan, D.E., Brenner, M.B. 1995." Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells", *Immunity*, 3(4), 495-507.

Niedergang, F., Didierlaurent, A., Kraehenbuhl, J.P., Sirard, J.C. 2004." Dendritic cells: the host Achilles's heel for mucosal pathogens?", *Trends Microbiol*, 12(2), 79-88.

Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C.M., Ivars, F. 2006." Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression", *Immunology*, 118(2), 240-249.

Pahne-Zeppenfeld, J., Schroer, N., Walch-Ruckheim, B., Oldak, M., Gorter, A., Hegde, S., Smola, S. 2014." Cervical cancer cell-derived interleukin-6 impairs CCR7-dependent migration of MMP-9-expressing dendritic cells", *Int J Cancer*, 134(9), 2061-2073.

Pett, M., Coleman, N. 2007." Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis?", *J Pathol*, 212(4), 356-367.

Piersma, S.J. 2011." Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients", *Cancer Microenviron*, 4(3), 361-375.

Pudney, J., Quayle, A.J., Anderson, D.J. 2005." Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone", *Biol Reprod*, 73(6), 1253-1263.

Qi, W.X., Xiang, Y., Zhao, S., Chen, J. 2021." Assessment of systematic inflammatory and nutritional indexes in extensive-stage small-cell lung cancer treated with first-line chemotherapy and atezolizumab", *Cancer Immunol Immunother*, 70(11), 3199-3206.

Reis Machado, J., da Silva, M.V., Cavellani, C.L., dos Reis, M.A., Monteiro, M.L., Teixeira Vde, P., Miranda Correa, R.R. 2014." Mucosal immunity in the female genital tract, HIV/AIDS", *Biomed Res Int*, 2014, 350195.

Roden, A.C., Morice, W.G., Hanson, C.A. 2008." Immunophenotypic attributes of benign peripheral blood gammadelta T cells and conditions associated with their increase", *Arch Pathol Lab Med*, 132(11), 1774-1780.

Rodriguez, A.C., Garcia-Pineros, A.J., Hildesheim, A., Herrero, R., Trivett, M., Williams, M., Atmella, I., Ramirez, M., Villegas, M., Schiffman, M., Burk, R., Freer, E., Bonilla, J., Bratti, C., Pinto, L.A. 2011." Alterations of T-cell surface markers in older women with persistent human papillomavirus infection", *Int J Cancer*, 128(3), 597-607.

Rousseau, M.C., Pereira, J.S., Prado, J.C., Villa, L.L., Rohan, T.E., Franco, E.L. 2001." Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection", *J Infect Dis*, 184(12), 1508-1517.

Scarth, J.A., Patterson, M.R., Morgan, E.L., Macdonald, A. 2021." The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation", *J Gen Virol*, 102(3).

Scott, M., Nakagawa, M., Moscicki, A.B. 2001." Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection", *Clin Diagn Lab Immunol*, 8(2), 209-220.

Shannon, B., Yi, T.J., Perusini, S., Gajer, P., Ma, B., Humphrys, M.S., Thomas-Pavanel, J., Chieza, L., Janakiram, P., Saunders, M., Tharao, W., Huibner, S., Shahabi, K., Ravel, J., Rebbapragada, A., Kaul, R. 2017." Association of HPV infection and clearance with cervicovaginal immunology and the vaginal microbiota", *Mucosal Immunol*, 10(5), 1310-1319.

Smyth, M.J., Dunn, G.P., Schreiber, R.D. 2006." Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity", *Adv Immunol*, 90, 1-50.

Stanley, M. 2008." Immunobiology of HPV and HPV vaccines", *Gynecol Oncol*, 109(2 Suppl), S15-21.

Stanley, M. 2010." Pathology and epidemiology of HPV infection in females", *Gynecol Oncol*, 117(2 Suppl), S5-10.

Stanley, M.A. 2012." Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus", *Clin Microbiol Rev*, 25(2), 215-222.

Stanley, M.A., Sterling, J.C. 2014." Host responses to infection with human papillomavirus", *Curr Probl Dermatol*, 45, 58-74.

Stanley, M.J.C.O., Reports, G. 2015." Immunology of HPV Infection, 4(4), 195-200.

Stern, P.L. 2005." Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination", *J Clin Virol*, 32 Suppl 1, S72-81.

Strbo, N., Alcaide, M.L., Romero, L., Bolivar, H., Jones, D., Podack, E.R., Fischl, M.A. 2016." Loss of Intra-Epithelial Endocervical Gamma Delta (GD) 1 T Cells in HIV-Infected Women", *Am J Reprod Immunol*, 75(2), 134-145.

Strbo, N., Romero, L., Alcaide, M., Fischl, M. 2017." Isolation and Flow Cytometric Analysis of Human Endocervical Gamma Delta T Cells", *J Vis Exp*(120).

Sumida, H., Lu, E., Chen, H., Yang, Q., Mackie, K., Cyster, J.G. 2017." GPR55 regulates intraepithelial lymphocyte migration dynamics and susceptibility to intestinal damage", *Sci Immunol*, 2(18).

Tavares-Murta, B.M., Mendonca, M.A., Duarte, N.L., da Silva, J.A., Muta, T.S., Garcia, C.B., Murta, E.F. 2010." Systemic leukocyte alterations are associated with invasive uterine cervical cancer", *Int J Gynecol Cancer*, 20(7), 1154-1159.

Templeton, A.J., McNamara, M.G., Seruga, B., Vera-Badillo, F.E., Aneja, P., Ocana, A., Leibowitz-Amit, R., Sonpavde, G., Knox, J.J., Tran, B., Tannock, I.F., Amir, E. 2014." Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis", *J Natl Cancer Inst*, 106(6), dju124.

Toulon, A., Breton, L., Taylor, K.R., Tenenhaus, M., Bhavsar, D., Lanigan, C., Rudolph, R., Jameson, J., Havran, W.L. 2009." A role for human skin-resident T cells in wound healing", *J Exp Med*, 206(4), 743-750.

Tuero, I., Venzon, D., Robert-Guroff, M. 2016." Mucosal and Systemic gammadelta+ T Cells Associated with Control of Simian Immunodeficiency Virus Infection", *J Immunol*, 197(12), 4686-4695.

Van Hede, D., Polese, B., Humblet, C., Wilharm, A., Renoux, V., Dortu, E., de Leval, L., Delvenne, P., Desmet, C.J., Bureau, F., Vermijlen, D., Jacobs, N. 2017." Human papillomavirus oncoproteins induce a reorganization of epithelial-associated gammadelta T cells promoting tumor formation", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(43), E9056-E9065.

Viscidi, R.P., Snyder, B., Cu-Uvin, S., Hogan, J.W., Clayman, B., Klein, R.S., Sobel, J., Shah, K.V. 2005." Human papillomavirus capsid antibody response to natural infection and risk of subsequent HPV infection in HIV-positive and HIV-negative women", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(1), 283-288.

Wang, X., Huang, X., Zhang, Y. 2018." Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer", *Front Microbiol*, 9, 2896.

Witherden, D.A., Johnson, M.D., Havran, W.L. 2018." Coreceptors and Their Ligands in Epithelial gammadelta T Cell Biology", *Front Immunol*, 9, 731.

Woodman, C.B., Collins, S.I., Young, L.S. 2007." The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues", *Nat Rev Cancer*, 7(1), 11-22.

Xu, K., Miao, L., Chen, W., Wu, H., Gong, Y., Tu, X., Guo, W., Pan, B., Qu, C., Wu, X., Wang, B. 2021." Establishment of the reference intervals of lymphocyte subsets for healthy Chinese Han adults and its influencing factors", *Ann Transl Med*, 9(19), 1495.

Xu, L., Song, J. 2021." Elevated neutrophil-lymphocyte ratio can be a biomarker for predicting the development of cervical intraepithelial neoplasia", *Medicine (Baltimore)*, 100(28), e26335.

Yang, J., Guo, X., Wu, T., Niu, K., Ma, X. 2019." Prognostic significance of inflammation-based indexes in patients with stage III/IV colorectal cancer after adjuvant chemoradiotherapy", *Medicine (Baltimore)*, 98(6), e14420.

Zhao, Y., Lin, L., Xiao, Z., Li, M., Wu, X., Li, W., Li, X., Zhao, Q., Wu, Y., Zhang, H., Yin, J., Zhang, L., Cho, C.H., Shen, J. 2018." Protective Role of gammadelta T Cells in Different Pathogen Infections and Its Potential Clinical Application", *J Immunol Res*, 2018, 5081634.

Zhou, J.Z., Way, S.S., Chen, K. 2018." Immunology of the Uterine and Vaginal Mucosae", *Trends Immunol*, 39(4), 302-314.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

ADI	Selen	UYRUĞU	TC
SOYADI	Doğan	TEL NO	
DOĞUM TARİHİ		E-POSTA	

Eğitim Bilgileri

MEZUN OLDUĞU KURUM		MEZUNİYET YILI
Lise		
Lisans		
Yüksek Lisans		
Doktora		
Doktora		

İŞ DENEYİMİ

GÖREVİ	KURUM	SÜRE (YIL- YIL)

YABANCI DİLLERİ	SINAV TÜRÜ	PUANI

PROJE DENEYİMİ

PROJE ADI	DESTEKLEYEN KURUM	SÜRE (YIL-YIL)

Burslar-Ödüller: -

Yayınlar ve Bildiriler:

A.Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

A.1 Dogan NU, Haktankacmaz SA, **Dogan S**, Ozkan O, Celik H, Eryilmaz OG, Doganay M, Gulerman C, A reliable way to predict intraabdominal adhesions at repeat cesarean delivery: scar characteristics..Acta Obstet Gynecol Scand. 2011 May;90(5):531-4. doi: 10.1111/j.1600-0412.2011.01080.x. Epub 2011 Mar 16.

A.2 Doğan S, Salman MC, Deren O, Geyik S Carotid-cavernous fistula in term pregnancy due to spontaneous rupture of carotid-cavernous aneurysm. J Obstet Gynaecol Res. 2012 Feb;38(2):427-30. doi: 10.1111/j.1447-0756.2011.01703.x. Epub 2011 Dec 19.

A.3 Dogan S, Atak Z, Ozyuncu O, Deren O Unilateral focal renal artery stenosis complicated by early onset superimposed pre-eclampsia.J Obstet Gynaecol. 2012 Jul;32(5):489-90. doi: 10.3109/01443615.2012.682743

A.4 Yuce K, Pinar A, Salman MC, Alp A, Sayal B, **Dogan S**, Hascelik G. Detection and genotyping of cervical HPV with simultaneous cervical cytology in Turkish women: a hospital-based study. Arch Gynecol Obstet. 2012 Jul;286(1):203-8. doi: 10.1007/s00404-012-2280-z. Epub 2012 Mar 7. Review.

A.5 Dogan NU,Çiçek N, Uygur D, **Doğan S**, Erol N The effect of long interpregnancy interval on labor characteristics and pregnancy outcomes: A Tertiary maternity hospital experience. Healthmed Journal 2012 , 6(7), 2419-2422

A.6. Salman MC, Bozdog G, **Dogan S**, Yuce K. Role of postmenopausal bleeding pattern and women's age in the prediction of endometrial cancer.Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2013 Oct;53(5):484-8. doi: 10.1111/ajo.12113. Epub 2013 Aug 2.

A.7 Dogan S, Ozyuncu O. Early prenatal diagnosis of iniencephaly associated with holoprosencephaly and cyclops. J Obstet Gynaecol. 2013 Feb;33(2):201-2. doi: 10.3109/01443615.2012.740531.

A.8 Dursun P, Ayhan A, Mutlu L, Çağlar M, Haberal A, Güngör T, Özat M, Özgü E, Onan A, Taşkıran C, Güner H, Yetımlar H, Kasap B, Yüce K, Salman MC, Sayal B, **Doğan S,** Harma M, Harma M, Basaran M, Aydoğmuş H, Ergün Y, Şehirli S, Gültekin E, Köse S, Yildirim Y, Yenen M, Dede M, Alanbay I, Karaca R, Metındır J, Keskin L, Üstüner I, Avşar F, Yüksel H, Kırdar S. HPV types in Turkey: multicenter hospital based evaluation of 6388 patients in Turkish gynecologic oncology group centers. Turk Patoloji Derg. 2013;29(3):210-6. doi: 10.5146/tjpath.2013.01188.

A.9. Dogan NU, Schneider A, Chiantera V, **Dogan S,** Dursun P. Tertiary cytoreduction in the setting of recurrent ovarian cancer (Review). Oncol Lett. 2013 Sep;6(3):642-647. Epub 2013 Jul 4.

A.10 Doğan S, Özyüncü Ö, Atak Z, Turgal M. Perinatal outcome in cases of isolated single umbilical artery and its effects on neonatal cord blood gas indices. J Obstet Gynaecol. 2014 Oct;34(7):576-9. doi: 10.3109/01443615.2014.919578. Epub 2014 May 27.

A.11 Dursun P, Dogan NU, Kolusari A, **Dogan S,** Ugur MG, Komurcu O, Altuntas B, Gultekin M, Celik NY, Karaca M, Guzel AB, Cim N, Ege S, Koc O, Yigit FA. Differences in geographical distribution and risk factors for urinary incontinence in Turkey: analysis of 6,473 women. Urol Int. 2014;92(2):209-14. doi: 10.1159/000353347. Epub 2013 Sep 13.

A.12. Unal B, **Doğan S,** Karaveli FŞ, Simşek T, Erdoğan G, Candaner I. Giant Endometrial Polyp in a Postmenopausal Woman without Hormone/Drug Use and Vaginal Bleeding. Case Rep Obstet Gynecol. 2014;2014:518398. doi: 10.1155/2014/518398. Epub 2014 Jun 29.

A.13. Ozalp SS, Telli E, Oge T, Tulunay G, Boran N, Turan T, Yenen M, Kurdoglu Z, Ozler A, Yuce K, Ulker V, Arvas M, Demirkiran F, Bese T, Tokgozoglu N, Onan A, Sanci M, Gokcu M, Tosun G, Dikmen Y, Ozsaran A, Terek MC, Akman L, Yetimalar H, Kilic DS, Gungor T, Ozgu E, Yildiz Y, Kokcu A, Kefeli M, Kuruoglu S, Yuksel H, Guvenal T, Hasdemir PS, Ozcelik B, Serin S, Dolanbay M, Ario DT, Tuncer N, Bozkaya H, Guven S, Kulaksiz D, Varol F, Yanik A, Ogurlu G, Simsek T, Toptas T, **Dogan S**, Camuzoglu H, Api M, Guzin K, Caliskan E, Doger E, Cakmak B, Ilhan TT. Multicenter analysis of gestational trophoblastic neoplasia in Turkey. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(8):3625-8.

A.14 Bozdag G, Mumusoglu S, **Dogan S**, Esinler I, Gunalp S. Osseous Metaplasia and Subsequent Spontaneous Pregnancy Chance: A Case Report and Review of the Literature.Gynecol Obstet Invest. 2015;80(4):217-22. doi: 10.1159/000439529. Epub 2015 Nov 18. Review.

A.15 Altay A, Toptas T, **Dogan S**, Simsek T, Pestereli E. Analysis of Metastatic Regional Lymph Node Locations and Predictors of Para-aortic Lymph Node Involvement in Endometrial Cancer Patients at Risk for Lymphatic Dissemination.Int J Gynecol Cancer. 2015 May;25(4):657-64. doi: 10.1097/IGC.0000000000000392.

A.16. Qzler A, **Dogan S**, Mamedbeyli G, Rahatli S, Haberal AN, Dursun P, Ayhan A. Primary yolk sac tumor of endometrium: report of two cases and review of literature.J Exp Ther Oncol. 2015;11(1):5-9. Review.

A.17 **Doğan S**, Özyüncü Ö, Atak Z. Fibroids During Pregnancy: Effects on Pregnancy and Neonatal Outcomes.J Reprod Med. 2016 Jan-Feb;61(1-2):52-7.

A.18 Ozkan O, Dogan NU, Ozkan O, Mendilcioglu I, **Dogan S**, Aydinuraz B, Simsek M. Uterus transplantation: From animal models through the first heart beating pregnancy to the first human live birth. Womens Health (Lond). 2016 Jul;12(4):442-9. doi: 10.1177/1745505716653849. Review.

A.19. Dogan S, Simsek T. Possible relationship between endocrine disrupting chemicals and hormone dependent gynecologic cancers. Med Hypotheses. 2016 Jul;92:84-7. doi: 10.1016/j.mehy.2016.04.041. Epub 2016 Apr 25.

A.20 Dogan S, B Simsek Paracervical Block and Paracetamol for Pain Reduction During IUD Insertion: A Randomized Controlled Study Journal of clinical and diagnostic research ,2017, 11 (11), QC9-QC11

A.21. Yavas G, Yavas C, Dogan NU, Ilhan TT, **Dogan S**, Karabagli P, Ata O, Yuce E, Celik C. Pelvic radiotherapy does not deteriorate the quality of life of women with gynecologic cancers in long-term follow-up: A 2 years prospective single-center study.J Cancer Res Ther. 2017 Jul-Sep;13(3):524-532. doi: 10.4103/0973-1482.187243.

A.22 Doğan EA, Doğan S, Göksu ET, Özkaynak S, Aktan Ç, Mendilcioğlu İ. Ventriculoperitoneal shunt treatment in a pregnant renal transplant recipient with idiopathic intracranial hypertension: Case report and review of the literature.Neurol Neurochir Pol. 2018 May - Jun;52(3):401-405. doi: 10.1016/j.pjnns.2018.01.005. Epub 2018 Feb 6. Review.

A.23 Özkan Ö, Özkan Ö, Çinpolat A, Doğan NU, Bektaş G, Dolay K, Gürkan A, Arıcı C, Doğan S. Vaginal reconstruction with the modified rectosigmoid colon: surgical technique, long-term results and sexual outcomes. J Plast Surg Hand Surg. 2018 Aug;52(4):210-216. doi: 10.1080/2000656X.2018.1444616. Epub 2018 Mar 8.

A.24 Uslu B, Dogan S, Özdem S, Şimşek T. Serum concentrations of HE4 and Ca125 in uncomplicated pregnancies: a longitudinal study. J Obstet Gynaecol. 2019 Jul 16:1-7. doi: 10.1080/01443615.2019.1603212.

A.25 Dogan NU, Dogan S, Favero G, Köhler C, Dursun P. The Basics of Sentinel Lymph Node Biopsy: Anatomical and Pathophysiological Considerations and Clinical Aspects.J

Oncol. 2019 Jul 29;2019:3415630. doi: 10.1155/2019/3415630. eCollection 2019. Review.

A.26 Ozyurt E, Ekin Sari G, **Dogan S**. Acute unilateral swelling of parotid gland after general anesthesia: Anesthesia Mumps Balkan Med J. 2019 Aug 26. doi: 10.4274/balkanmedj.galenos.2019.2019.6.103.

A.27. Dogan S, Tongur T, Er kaymaz T, Erdogan G, Unal B, Sik B, Simsek T. Traces of intact paraben molecules in endometrial carcinoma. Environ Sci Pollut Res Int. 2019 Aug 28. doi: 10.1007/s11356-019-06228-1.

A.28 Cisterna chyli: An important landmark in laparoscopic paraaortic lymphadenectomy. Dogan NU, **Dogan S**, Erol M, Uzun BT. Gynecol Oncol. 2020 Feb;156(2):511. doi: 10.1016/j.ygyno.2019.12.004. Epub 2019 Dec 29

A.29 The extent of cyclin D1 expression in endometrial pathologies and relevance of cyclin D1 with the clinicopathological features of endometrioid endometrial carcinoma. Yildirim HT, Nergiz D, Sadullahoglu C, Akgunduz Z, Yildirim S, **Dogan S**, Sezer C. Indian J Pathol Microbiol. 2020 Jul-Sep;63(3):412-417. doi: 10.4103/IJPM.IJPM_589_19. PMID: 32769330

A.30 Encountering the accessory polar renal artery during retroperitoneal lymphadenectomy. Karadağ C, Birge O, Bakir MS, **Doğan S**, Tuncer HA, Şimşek T. Clin Case Rep. 2020 Dec 12;9(1):177-179. doi: 10.1002/ccr3.3493. eCollection 2021 Jan. PMID: 33505687

A.31 Laparoscopic treatment of recurrent and chemoresistant cesarean scar choriocarcinoma. Bakır MS, Birge Ö, Karadağ C, **Doğan S**, Simsek T. Clin Case Rep. 2021 Jan 18;9(3):1457-1461. doi: 10.1002/ccr3.3801. eCollection 2021 Mar. PMID: 33768867

A.32 Obstetrician-gynecologists' practice patterns regarding HPV testing in cervical cancer screening in Turkey. Akgün Aktaş B, Toptaş T, Üreyen I, **Doğan S**, Uysal A. Turk J Obstet Gynecol. 2021 Mar 12;18(1):15-22. doi: 10.4274/tjod.galenos.2021.36418. PMID: 33715328

A.33 The insolvable problem; survival effect of lymphadenectomy in advanced stage ovarian cancer. Bakır MS, Birge Ö, Karadag C, **Doğan S**, Tuncer HA, Simsek T. Ginekolo Pol. 2021 Apr 29. doi: 10.5603/GP.a2021.0073. Online ahead of print. PMID: 33914302

A.34 Timing of surgery following SARS-CoV-2 infection: an international prospective cohort study. COVIDSurg Collaborative; GlobalSurg Collaborative. Anaesthesia. 2021 Jun;76(6):748-758. doi: 10.1111/anae.15458. Epub 2021 Mar 9. PMID: 33690889

A.35 Risk factors that increase recurrence in borderline ovarian cancers.

Birge O, Bakır MS, Karadag C, Dinc C, **Doğan S**, Tuncer HA, Simsek T. Am J Transl Res. 2021 Jul 15;13(7):8438-8449. eCollection 2021. PMID: 34377341

A.36 SARS-CoV-2 infection and venous thromboembolism after surgery: an international prospective cohort study. COVIDSurg Collaborative; GlobalSurg Collaborative. Anaesthesia. 2021 Aug 24. doi: 10.1111/anae.15563. Online ahead of print. PMID: 34428858

A.37 Prophylactic subcutaneous retention sutures in the prevention of superficial wound separation of midline laparotomy. Iltar E, Ureyen I, Toptaş T, **Doğan S**, Uysal A. Int J Gynecol Cancer. 2021 Sep;31(9):1260-1267. doi: 10.1136/ijgc-2021-002446. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34290046

A.38 SARS-CoV-2 vaccination modelling for safe surgery to save lives: data from an international prospective cohort study. COVIDSurg Collaborative, GlobalSurg Collaborative. Br J Surg. 2021 Sep 27;108(9):1056-1063. doi: 10.1093/bjs/znac101. PMID: 33761533

A.39 Evaluation of elderly women with uterin cervical cancer. Birge Ö, Bakır MS, Karadag C, **Doğan S**, Tuncer HA, Simsek T.Cancer Rep (Hoboken). 2021 Oct 10:e1570. doi: 10.1002/cnr2.1570. Online ahead of print.PMID: 34632735

A.40 Effects of pre-operative isolation on postoperative pulmonary complications after elective surgery: an international prospective cohort study. COVIDSurg Collaborative; GlobalSurg Collaborative.Anaesthesia. 2021 Nov;76(11):1454-1464. doi: 10.1111/anae.15560. Epub 2021 Aug 9.PMID: 34371522

A.41 Clinicopathological risk factors and survival analysis of ovarian cancer with synchronous endometrial cancer diagnosed after surgery MS Bakır, Ö Birge, C Karadag, **S Doğan**... - European Journal of gynecologic oncology, 2021

A.42 Innate immune response against HPV: Possible crosstalking with endocervical $\gamma\delta$ T cells. **Dogan S**, Terzioglu E, Ucar S.J Reprod Immunol. 2021 Oct 14;148:103435. doi: 10.1016/j.jri.2021.103435. Online ahead of print.PMID: 34741834 Review

A.43 Systemic capillary leakage syndrome. **Dogan S**, Kivrak-Salim D, Ureyen I, Iltar U, Kurtoğlu E.Int J Gynecol Cancer. 2021 Dec;31(12):1602-1605. doi: 10.1136/ijgc-2021-003034.

A.44 SARS-CoV-2 infection and venous thromboembolism after surgery: an international prospective cohort study. COVIDSurg Collaborative; GlobalSurg Collaborative.Anaesthesia. 2022 Jan;77(1):28-39. doi: 10.1111/anae.15563. Epub 2021 Aug 24.PMID: 34428858