



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

**SAĞLIKLI PREMENOPAZAL VE
POSTMENOPAZAL KADINLARDA ENDOSERVİKAL
İNTRAEPİTELYAL GAMMA DELTA T LENFOSİT
POPÜLASYONUNUN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Burcu YAĞMUR

Antalya,2023



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

**SAĞLIKLI PREMENOPAZAL VE
POSTMENOPAZAL KADINLARDA ENDOSERVİKAL
İNTRAEPİTELYAL GAMMA DELTA T LENFOSİT
POPÜLASYONUNUN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Burcu YAĞMUR

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. Selen DOĞAN

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2023

*Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından TTU-2022-6058 proje numarası ile desteklenmiştir.*

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca benden bilgi, beceri ve tecrübelerini esirgemeyen, üzerimde büyük emekleri olan en başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İbrahim İnanç MENDİLCİOĞLU olmak üzere, tez çalışmam ve uzmanlık eğitimim boyunca yanımda olup bana zaman ayıran, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Doç. Dr. Selen DOĞAN'a, eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Tayup ŞİMŞEK, Prof. Dr. Mehmet ŞİMŞEK, Prof. Dr. Abdullah BOZTOSUN, Prof. Dr. Mete ÇAĞLAR, Prof. Dr. Nasuh Utku DOĞAN, Doç. Dr. Murat ÖZEKİNCİ, Doç. Dr. Şafak OLGAN, Doç. Dr. Cem Yaşar SANHAL, Doç. Dr. Mahmut İlkin YERAL, Doç. Dr. Hasan Aykut TUNCER'e en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm uzmanlara, asistan arkadaşlarıma, hemşire, ebe, sekreter ve personellere;

Tez çalışmam sürecinde laboratuvar çalışmalarında emeği geçen sevgili Münevver KAHRAMAN'a;

Ve hayatım boyunca beni destekleyen, her zaman yanımda olan annem Birgül YAĞMUR, babam Celal YAĞMUR, ablalarım Seher YAĞMUR ve Gülşah YAĞMUR'a

Sonsuz teşekkürler...

Dr. Burcu YAĞMUR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	vi
Tablolar Dizini.....	viii
Şekiller Dizini	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Serviks Anatomisi	3
2.2. Serviks Embriyolojisi	4
2.3. Serviks Histolojisi	4
2.4. Uterus İmmünitesi ve Mikrobiyota	5
2.5. Dişi Üreme Sistemi Bağışıklık Hücreleri ve Flow Sitometri	12
2.6. Lenfosit Gelişimi	15
2.6.1. B Hücre Gelişimi	15
2.6.2. T Hücre Gelişimi	16
2.6.2.1. Gamma-Delta ($\gamma\delta$) T Hücreleri	19
2.6.3. NK Hücreleri.....	23
2.7. Dendritik Hücreler.....	24
2.7.1. Langerhans Hücreleri.....	25
2.8. Monositler ve Makrofajlar.....	25
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Araştırmanın Tipi ve Yeri, Etik Kurul Onayı.....	27
3.2. Araştırmaya Alınma Kriterleri	27
3.3. Araştırmanın Yeri ve Örnek Alma Prosedürleri.....	27
3.4. Laboratuvar Aşamaları	28

3.5. Araştırmanın Analizi	30
3.6. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇLAR	49
7. ÖZET.....	50
8.ABSTRACT.....	51
9.KAYNAKLAR	52
10. EKLER.....	60
Ek 1. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APC	Antijen sunan hücre
CAR	Kimerik antijen reseptörü
CD	Cluster of differentiations (Yüzey farklılaşma antijenleri)
CCR7	Kemokin reseptörü tip 7
DC	Dendritik cell
GDT	Gammadelta T hücresi
HIV	Human immunodeficiency virüs
HLA	Human leukocyte antigen
IFN	İnterferon
IG	İmmünglobulin
IL	İnterlökin
LAMP-1	Lizozom ilişkili membran glikoproteini 1, CD107a
LC	Langerhans cell
mRNA	Messenger ribonükleik asit
MCP	Monosit kemoatraktan protein
MHC	Major histocompatibility complex
NK	Natural killer
NKG2D	Natural killer hücresi alt grubu
NKR	Natural killer reseptör
SIV	Simian immunodeficiency virus
TCR γ/δ	T cell reseptör gamma delta
TCR α/β	T cell reseptör alfa beta

TCM	Merkezi bellek T hücresi
T_{EM}	Efektör hafıza T hücresi
T_{EMRA}	Terminal olarak farklılaşmış efektör T hücresi
T helper	Yardımcı T hücreleri
TLR	Toll like receptor
TNF α	Tümör nekroz faktör alfa
TRM	Yerleşik bellek T hücreleri
Treg	Düzenleyici T hücreleri
$\gamma\delta$	Gamma delta
Vγ9Vδ2	Gamma delta hücresi alt grubu

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Menopoz Sonrası Servikal Bağışıklık Etkenlerindeki Değişim.....	11
Tablo 4.1. Menopoz durumlarına göre hasta özellikleri I	37
Tablo 4.2. Menopoz durumlarına göre hasta özellikleri II.....	38
Tablo 4.3. Menopoz durumuna göre laboratuvar bulguları I	39
Tablo 4.4. Menopoz durumuna göre laboratuvar bulguları II	40
Tablo 4.5. Menopoz durumuna göre laboratuvar bulguları III.....	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kadın Genital Sistem Anatomisi	4
Şekil 2.2. Serviks histolojisinin mikroskopik çizimi (11).	5
Şekil 2.3. Gebelikte desidua bazalis ve koriodesidua immünolojisi(15).	9
Şekil 2.4. Flow sitometrik analizin şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.5. BD FACS Canto II akım sitometri cihazında yaptığımız flow sitometri analizi örneği	14
Şekil 2.6. $\gamma\delta$ T hücrelerinin görevleri	23
Şekil 2.7. Kadın genital sistem immünitesinde yer alan yapılar(15).	26
Şekil 3.1. 50 ml falkon tüpte RPMI solüsyonu içerisinde santrifüj edilen fırçalar	29
Şekil 3.2. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri; A) Morfolojik lenfosit kapılama, B) Lenfositlerde CD3+ kapılama, C) CD3+ hücrelerde GDT ekspresyonu, D) CD3+ hücrelerde GDT2 ekspresyonu, E) CD3+ hücrelerde CD4 ve CD8 ekspresyonu, F) Lenfositlerde GDT kapılama, G) GDT+ hücrelerde CD4 ve CD8 ekspresyonu	31
Şekil 3.3. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı); A) Morfolojik lenfosit kapılama, B) Lenfosit kapısındaki hücrelerde GDT kapılama, C) Lenfosit kapısındaki hücrelerde GDT2 kapılama, D) GDT kapısı içerisinde CD45RA ve CD27 ekspresyonları, E) GDT2 kapısı içerisinde CD45RA ve CD27 ekspresyonları.....	32
Şekil 3.4. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı); A) Morfolojik lenfosit kapılama, B) Lenfosit kapısındaki hücrelerde GDT kapılama, C) Lenfosit kapısındaki hücrelerde GDT2 kapılama, D) GDT içerisinde NKG2D ekspresyonu, E) GDT2 içerisinde NKG2D ekspresyonu, F) GDT içerisinde HLADR ekspresyonu, G) GDT2 içerisinde HLADR ekspresyonu	33

Şekil 3.5. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı); A) Morfolojik lenfosit kapılama, B) Lenfosit kapısındaki hücrelerde GDT kapılama, C) Lenfosit kapısındaki hücrelerde GDT2 kapılama, D) GDT ve CD107a ekspresyonu, E) GDT2 ve CD107a ekspresyonu 34

Şekil 3.6. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı); A) Morfolojik lenfosit kapılama, B) Lenfosit kapısındaki hücrelerde GDT kapılama, C) GDT ve CD 69 ekspresyonu..... 35



1.GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanda dişi üreme sisteminde bulunan mukozal dokular, jinekolojik kanserler ve cinsel yolla bulaşan hastalıklara yol açan çeşitli patojenlerin yol açtığı enfeksiyonlar için birincil temas bölgeleridir. Bir kadının hayatı boyunca yaşadığı menstrüel dönem, gebelik gibi hormonal değişikliklerin olduğu zamanlarda immün sistem yoğun bir şekilde çalışırken menopoza sonrası çalışması yavaşlamaya başlar. Mukozal bağışıklıkta menopoza sonrası yaşanan bu değişim kadınların cinsel yolla bulaşan hastalıklara ve jinekolojik kanserlere yakalanma riskini arttırmaktadır (1).

T hücreleri, lenfositlerin bağışıklık yanıtında oldukça önemli görevi olan bir alt kümesidir. Özellikle tümör hücrelerine karşı ve hücre içi patojenik organizmalara karşı savunma oluşturan, hücre aracılı bağışıklıkta önemli rol oynarlar. T hücreleri oluştuktan sonra zamanla vücuttaki görevlerine göre farklılaşmalar meydana gelmektedir. Menopoza sonrası seks hormon düzeylerinin azalması ile T hücreleri fonksiyonel ve fenotipik birtakım değişikliklere uğramaktadır (2).

T hücrelerinin bir alt grubunu oluşturan gamma delta ($\gamma\delta$) T hücrelerinin fizyolojik rolü henüz tam anlamıyla anlaşılamamıştır. $\gamma\delta$ T hücrelerinin hücresel bağışıklığın ilkel şekli olduğu düşünülmektedir. Epitelyal bariyer korumasında patojenlere karşı oluşan ilk savunma hattı görevi görür. $\gamma\delta$ T hücreleri travma ve enfeksiyon gibi durumlara karşı epitelin koruyucusu olma görevini üstlenmiştir . Periferik kanda $\gamma\delta$ T hücreleri, normal T hücre popülasyonunun çok az bir kısmını oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalarda endoservikal kanalda bulunan $\gamma\delta$ T hücreler kadın üreme sisteminde bulunan diğer kısımlara göre daha yüksek inflamatuvar rol üstlenir. Bu duruma örnek olarak HIV enfeksiyonunda endoservikal kanaldaki $\gamma\delta$ T lenfosit sayısının değiştiği bilinmektedir (3).

Yaşlanmanın hematopoetik kök hücre ve progenitör hücrelerin işlevini olumsuz etkilediğini belgeleyen çok sayıda çalışma vardır. Yaşlanmanın etkilerini yavaşlatmak ve tersine döndürmeye yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Lenfoid hücreler uzun süreler boyunca varlığını sürdürdükleri için yaşa bağlı

kusurlara yol açabilecek çevresel zararlara karşı özellikle hassastır. B hücrelerinde yaşa bağlı oluşan değişiklikler içinde azalan antikör üretimini de yer alır. T hücresi immün yetmezliğini gösteren önemli belirteçlerden biri, antijene yanıt olarak proliferasyonun azalmasıdır. Yaşlanma ile, antijene yanıt veren T hücrelerinin sayısındaki genişleme tamamen durmaz, bu da çoğu hücrenin tamamen "yaşlı" olmadığını veya popülasyonun heterojen olduğunu ve hem çalışan hem de yaşlanan hücrelerden oluştuğunu gösterir(4). Bağışıklığın yeniden düzenlenmesi için hangi hücrelerin yenilenmesi gerektiğine yönelik çalışmalar arttırılmalıdır.

Dişi üreme sisteminde bulunan $\gamma\delta$ T lenfositlerin yaşlanma ile ne ölçüde değişikliğe uğradığı bilinmemektedir. Bu durum kadınlarda genital sistem immünesini korumak ve cinsel yolla bulaşan hastalıkları, jinekolojik kanserleri önlemek ve tedavi etmekteki bilgilerimizin yeterli olmadığını göstermektedir.

Biz de bu çalışmada premenopozal ve postmenopozal dönemlerde sağlıklı insan uterin serviksindeki intraepitelyal $\gamma\delta$ T hücre popülasyonlarının fenotipik özelliklerinin, sayısal ve fonksiyonel durumunun değerlendirilmesini amaçladık. İlerleyen yaşlarda kadınların hayatlarını tehdit eden koşulları tersine çevirmek, bağışıklık korumasını yeniden düzenlemek için yeni terapötik müdahalelerin geliştirilmesi ve daha ileri çalışmalar gereklidir, çalışmamızda bu duruma katkı sağlamayı hedeflemekteyiz.

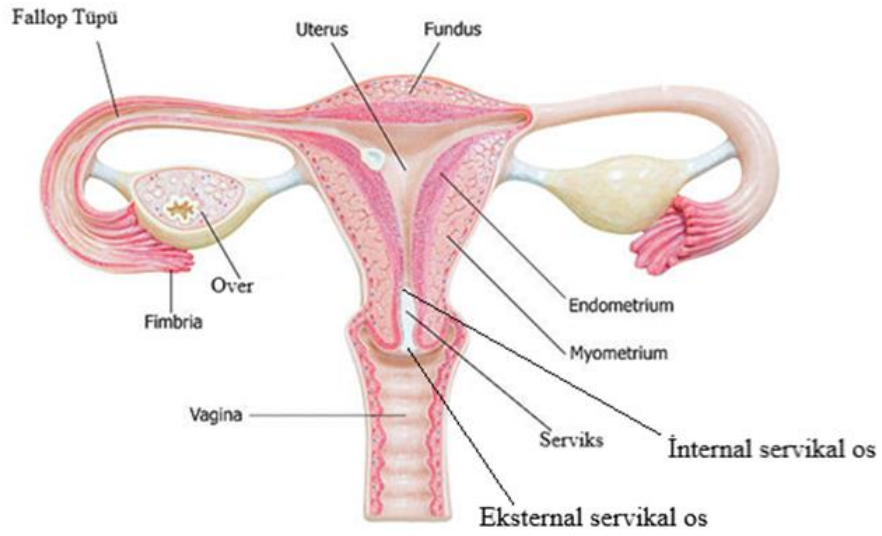
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Serviks Anatomisi

Kadın genital sistemi vulva, vajen, serviks, uterin korpus, fallop tüpleri ve overlerden oluşmaktadır. Uterus, uterin korpus ve serviks kısımlarından oluşur.

Latince serviks boyun anlamına gelmektedir. Serviks, yetişkin bir kadında uterusun alt kısmının 1/3 'lük bölümüdür. Serviks; uterusun isthmusunun ucundan başlar ve ortalama 3-5 cm uzunluğundadır. %90 fibröz dokudan, %10 düz kas dokusundan oluşmaktadır. Kadınların yaşına, hormonal durumuna ve doğum sayısına göre serviksin büyüklüğü ve şekli değişebilir (5). Serviks ön kısımda mesane ve yanlarda parametrium ile komşudur. Serviksi arka kısımdan örten periton, rektumu örter ve Douglas boşluğu' nu oluşturur. Serviksin vajene açılan dış açıklığına “eksternal os” denilmektedir. Gebelikte dokulardaki proliferasyon ve vasküler konjesyon sebebiyle serviksin boyutlarında artış görülmektedir. Multipar kadınlarda normal doğumdan kaynaklı olarak eksternal os enlemesine yarık şeklinde iken (emmet yırtığı), nullipar kadınlarda küçük ve yuvarlak görünümündedir. Eksternal os uterusu doğru “endoservikal kanal” ile devamlılık gösterir ve proksimalde “internal os” ile endometrial kaviteyle bağlantılıdır (6).

Kadın genital sistem anatomisini gösteren şekil aşağıda incelenebilir. (**Şekil 2.1.)**



Şekil 2.1. Kadın Genital Sistem Anatomisi

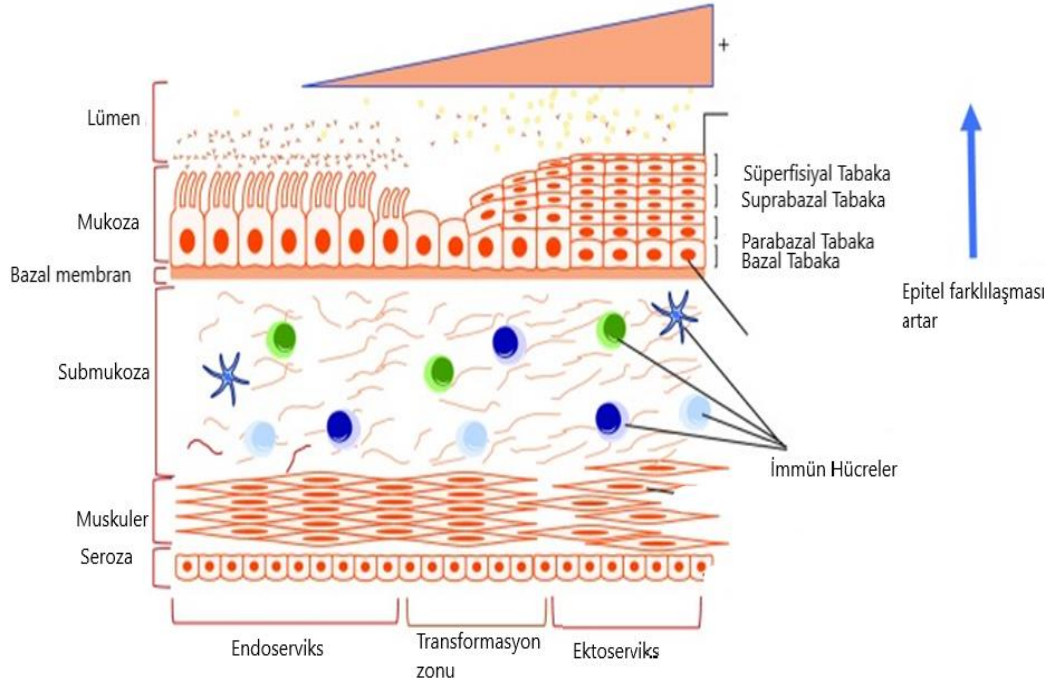
2.2. Serviks Embriyolojisi

Kadınlarda genital kanal iki embriyolojik oluşumdan köken alır: Çöломik mezodermden meydana gelen Müller Kanalları ve embriyonik kloakanın ventral bölümünü meydana getiren ürogenital sinüs (7). Müllerian kanallar ilk olarak 6-7 haftalık embriyoda izlenmektedir. Müllerian kanallar daha sonra orta hatta bir araya gelir. Müller kanallarından oluşan yapılar tuba, uterus ve vajen 1/3 üst bölümüdür. Ürogenital sinüs kısmından üretra, vestibulum, vajina ve Bartholin bezleri oluşmaktadır. Gebeliğin 16. haftasında gelişimini tamamlamamış bir serviks ultrasonda görülebilir (6).

2.3. Serviks Histolojisi

Endoservikal kanal glandüler epitelden oluşmaktadır. Menarştan sonra vajinada bulunan asidik ortama maruz kalınması nedeniyle ektoservikste skuamöz epitele dönüşür. Epitelin glandülerden skuamöze dönüştüğü bu bölge transformasyon zonu olarak bilinir (8). Transformasyon zonu serviksin displazi ve

malign transformasyona en yatkın bölgesidir (9, 10). Serviks histolojisini gösteren şekil aşağıda incelenebilir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Serviks histolojisinin mikroskopik çizimi (11).

2.4. Uterus İmmünitesi ve Mikrobiyota

Dişi üreme sistemi vajina, uterus ve fallop tüplerinden oluşmaktadır ve bu bölümlerin hepsi farklı mikrobiyal toplulukları barındırır. Dişi üreme sisteminin mukozası, üst ve alt yollar arasında farklılık gösterir. Üst üreme sistemindeki fallop tüpleri, uterus ve endoserviks tek katmanlı bir kolumnar epitelden oluşur. Alt üreme yolu ektoserviks ve vajinadan oluşur, kolumnar epitelden daha koruyucu tek katlı, skuamöz, keratinize olmayan epitel tabakası ile kaplıdır (12).

Mukozal bariyerler, patojenler de dahil zararlı çevresel ajanlara karşı savunmada rol alır ve aynı zamanda bazı mikroplarla simbiyozu için izin vermek için tasarlanmış ilk bağışıklık savunma hattıdır. Mikrobiyotanın, mikrobiyota ile simbiyotik ilişkideki konakçı immün sisteminin işlevini etkileyebildiği gösterilmiştir. Mikroorganizmaların hem lokal hem de sistemik olarak

immünolojik yanıtı modüle etme yeteneği, onların algılanmasını, ardından immün sistemin doğuştan gelen ve adaptif bileşenleri arasında kompleks bir mekanizma gerektirir (12). Örneğin, serviks epiteli de dahil dişi üreme sistemi epiteli, çeşitli doğal ve adaptif bağışıklık fonksiyonlarını gösterme yeteneğine sahiptir. Servikal epitel hücreleri, patojenlerin üst dişi üreme sistemine yükselişini engellemek için birkaç bağışıklık yeteneğine sahiptir. Bunlar arasında fiziksel bağışıklık bariyeri oluşturmak (13), antimikrobiyal, sitokin ve kemokin faktörleri salgılamak ve antijen sunumu gibi daha özel doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık fonksiyonlarından bazılarını sergilemek yer alır (14).

Dişi üreme sistemi mukozasında üretilen antimikrobiyal moleküller östrojenden büyük ölçüde etkilenir. Yüksek östrojen seviyeleri antimikrobiyal yanıtı artırır. Ayrıca yüksek östrojen miktarı bazı proinflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılamaktadır (12).

Uterusun bağışıklık hücreleri, adet döngüsü sırasında değişen ortama göre uyarlanmıştır. Örneğin, endometrial/desidual NK hücreleri ve makrofajlar, menstrüasyon, plasantasyon ve fetal tolerans için optimize edilmiş karışık inflamatuvar, düzenleyici ve pro-modeling fonksiyonlarına sahiptir(15).

İnsan ektoserviksinde, tüm CD45 + mononükleer hücrelerinin yaklaşık üçte biri T hücreleridir ve ektoservikte sık gözlenen lenfoid agregatları oluşturma yeteneğine sahiptirler. Servikal T hücrelerinin yaklaşık %40'ı, çoğunluğu bir efektör hafıza veya efektör fenotip sergileyen CD4 + T hücreleridir, diğer %60'ı CD8 + T hücreleridir. Çoğu, serviksin hücre aracılı bağışıklık için bir efektör bölge olması ve servikal CD4+ ve CD8 + T hücrelerinin doku yerleşimi ile tutarlı olan bir efektör fenotipi ifade eden T hücreleridir. NK ve B hücreleri de bulunmuştur, ancak T hücrelerinden çok daha az sayıda izlenmiştir(15).

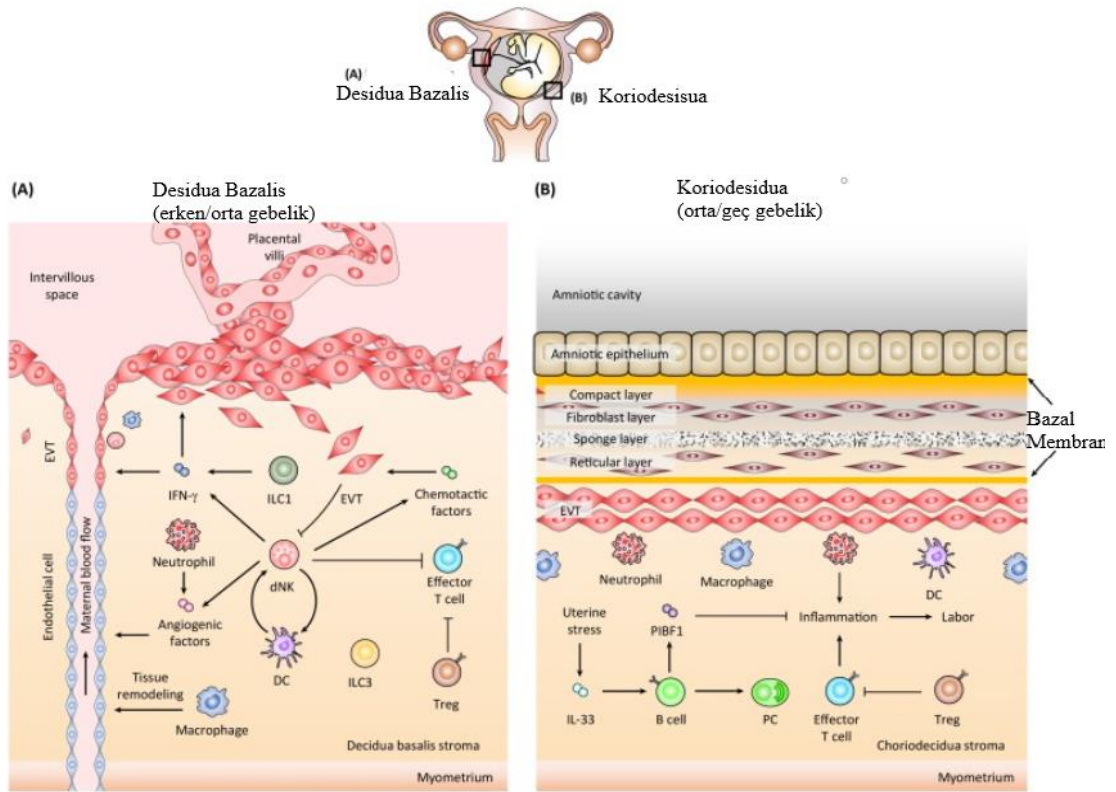
İnsan endometriyumu, menstrüel siklusun sekretuar fazına özel oluşan lenfoid agregatlar içerir, bu lenfoid agregatlar makrofajlar ve CD8+ T lenfosit ile çevirili B hücre çekirdeği içerir. Endometriumdaki lenfoid agregatlar, kriptoyamalar olarak da bilinen izole lenfoid foliküller ve bağırsak mukozasındaki Peyer yamaları ile organizasyonel benzerliği paylaşıyor da biyolojik

işlevleri ve B hücrelerinin, CD8 + T hücrelerinin ve makrofajların fenotipleri belirsizliğini korumaktadır. Örneğin, uterus lenfoid kümelerindeki CD8 + T hücreleri vajinal mukozadaki CD8 + T hücrelerinin aksine, in vitro aktivasyondan sonra sitotoksik değildirler. Bu hücrelerin, endometriyum bozulduğunda ve konakçı enfeksiyona duyarlı olduğunda menstrüasyon sırasında patojenleri temizleyerek ve sistemik yayılmalarını sınırlayarak bağışıklık koruması sağladığını düşündürmektedir. Lenfoid agregattaki CD8 + T hücrelerinin salgı fazında sitotoksik fonksiyonunun olmaması, muhtemelen üreme hormonları tarafından kontrol edilmektedir ve blastokist reddini önlemede bir rolü olabilir. Lenfoid kümelere ek olarak, insan endometriyumu makrofajlar, nötrofiller ve NK hücreleri içerir. Bu lökosit alt kümelerinin her biri, adet döngüsü sırasında aktif niceliksel ve niteliksel değişimlere maruz kalır; bu, uterus bağışıklık savunmasının yanı sıra endometrial remodeling ile ilgili özel görevleri olduğunu düşündürür. NK hücreleri, adet döngüsünün salgılama fazı sırasında proliferasyon ve granülasyona uğrar. Döllenme meydana gelirse çoğalmaya devam ederler; aksi takdirde menstrüasyondan önce ölürler ve mens kanaması ile dökülürler(16). Bu bulgular, uterus NK hücrelerinin menstrüel siklusa doku remodelingi ve trofoblast için önemli bir anjiyojenik ve kemotaktik faktör kaynağı olmasıyla tutarlıdır(15). Yapılan bazı çalışmalar, uterus NK hücrelerinin yoğunluğunun ve uterus NK hücreleri ile makrofajlar arasındaki kümelenme seviyesinin, IVF-Embrio transferi sonrası başarılı implantasyon için umut verici bir belirleyici olabileceğini ileri sürmüştür(17). Periferik NK veya uterin NK hücrelerinin sayısının veya aktivitesinin sonraki gebeliği ve sonucu tahmin edip edemeyeceğini değerlendirmek için yapılan sistematik bir derlemenin sonucunda periferik ve uterin NK hücrelerini ölçmenin prognostik değeri belirsizliğini korumaktadır. Bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır(18).

Sağlıklı bir gebelik, maternal immünitinin yeterli adaptasyonuna bağlıdır. Abortus, preeklampsi ve intrauterin gelişme geriliği, immün faktörlerin gebelik sürecindeki önemini gösteren kanıtlanmış durumlardır(19, 20). Dendritik hücreler, düzenleyici T lenfositler (T_{reg}) ve immün sisteme ait bazı faktörler, fetüse karşı maternal toleransın gelişiminde oldukça önemlidir(21). Periferik DC'lerin eksik aktivasyonu, normal gebelikte bu hücrelerin en önemli özelliği gibi

görülmektedir. Eksik aktivasyonun belirteçleri, hamileliğin gelişmesiyle artar. İnsan lökosit antijen-DR (HLA-DR) ekspresyonunda artış olmamasına karşın, yardımcı uyarıcı moleküllerin ve olgunlaşma belirteçlerinin artan ekspresyonunu içerir. HLA-DR'nin aşırı ekspresyonunun olmaması, fetüse karşı toleransın sürdürülmesi için oldukça önemlidir. Maternal-fetal arayüzdeki dendritik hücreler, çeşitli mekanizmalarla maternal toleransın desteklenmesine katkıda bulunur. En önemlisi, maternal efektör T hücrelerini baskılayabilen düzenleyici T hücrelerin indüksiyonu gibi görülmektedir. Sitokinler tarafından yaratılan çevre, dendritik hücrelerin fenotipinin belirlenmesinde ve düzenleyici T hücrelerine gönderilen yoğunluk sinyallerinin düzenlenmesinde anahtar rol oynuyor gibi görülmektedir(22). Dendritik hücrelerin hem periferik kanda hem de desiduada yoğun aktivitesi, gebelik sürecini olumsuz etkileyebilecek bir inflamatuvar yanıtı açabilir(23).

Ovulasyon, başarılı döllenme ve implantasyondan sonra uterus endometriyumu hipertrofik ve vasküler değişime uğrayarak desiduya dönüşür. Maternal dokuların ve fetal trofoblastların fiziksel olarak birbirine yaklaştığı arayüz oluşur. İnsan desiduası:desidua basalis, desidua kapsülaris ve desidua parietalis tabakalarından oluşur. Son iki katman, koriodesiduayı oluşturmak üzere gebeliğin ortasında birleşir(15). İnsan orta ve geç gebelik koriodesiduasında bulunan T hücreleri, makrofajlar ve nötrofillere ek olarak, bu dokuda yakın zamanda bulunan B hücreleri, IL-33 gibi doku stres sinyallerine yanıt verebilir ve yanıt olarak progesteron salgılar. Desidual inflamasyonu baskılamak ve ardından gelen erken doğum tetiklenmesine karşı koruma sağlamak için indüklenmiş engelleme faktörü 1'i (PIBF1) salgılar. Treg'ler koryodesiduada da bulunur ve inflamasyonu önleyebilir ve fetal toleransı artırabilir(15). Geç gebelikte daha düşük serum PIBF1 düzeyi, insanlarda artmış erken doğum riski ile ilişkilendirilmiştir(24). Gebelikte desidua basalis ve koriodesidua immünolojisi **Şekil 2.3**'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Gebelikte desidua bazalis ve koriodesidua immünolojisi(15).

Plasenta, gebelik sırasında fetüsü besleyen organdır ve geleneksel bilgiler ışığında steril kabul edilir. Yakın zamandaki çalışmalar, plasantanın mikrobiyal toplulukları barındırdığını ileri sürmüştür, ancak bu mikropların yeri ve olası işlevleri henüz doğrulanmayı ve daha iyi kanıtlanmış şekilde açıklanmayı beklemektedir. Plasental mikrobiyom çalışmalarının anne, fetüs ve/veya yenidoğan sağlığını ve fizyolojisini önemli ölçüde etkileyeceği düşünülmektedir(25, 26).

Winger ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, normal ve düşükle sonuçlanmış gebelikler arasında yalnızca dolaşımdaki T_{reg} hücre yüzdesinin istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p = 0.005$) elde ettiğini göstermiştir(27). Çalışmada, ilk trimesterde T_{reg} yüzdesi %0,7' nin altında olan kadınların, T_{reg} yüzdesi %0,7' nin üzerinde olan kadınlara göre (sırasıyla %44' e karşı %80) gebelik kaybı riskinin önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Aynı zamanda,

sonraki analizlerde T_{reg} hücre yüzdesinde bir artış, normal gebeliklere kıyasla düşükle sonuçlananlarda iki kat daha az sıklıkta gözlemlendi.

Menopoz döneminde seks hormonlarının dalgalanması azalır, düşük ve sabit seviyede kalır. Hormonal değişiklikler, özellikle enfeksiyonlara ve malignitelere karşı artan duyarlılığa, genel inflamasyona yol açar. Ayrıca yine hormonal değişiklikler aşılama karşı azalan yanıtlara yol açarak bağışıklık sisteminin progresif düzensizliğine sebep olmaktadır. Menopoz sonrası kadınların immünolojik avantajlarını kaybettikleri görülmektedir, çünkü yaşlandıkça enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale gelirler ve enflamatuvar durumların sıklığı artar. Bağışıklık sistemindeki spesifik değişiklikler içinde, azalmış bir CD4⁺/CD8⁺ hücre oranı, farklılaşmış efektör ve bellek T hücrelerinin sayısında artış, saf T hücrelerinin tükenmesi ve B hücrelerinin sıklığında azalma bulunmaktadır. Viral patojenlere ve tümörlere karşı savaşan doğal öldürücü (NK) hücreleri yaşla birlikte sayıca artar. Ancak, NK hücrelerinin sitotoksisitede ve sitokin üretme yeteneklerinde azalma izlenmektedir. Yaşlanmayla proinflatuvar sitokinlerin seviyelerinde artış meydana gelir ve sonuç olarak artmış bir inflamatuvar durum ortaya çıkar. Menopoz sonrası kadınlarda, monosit kemoatraktan protein 1 (MCP 1), tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) gibi daha yüksek serum proinflatuvar sitokin seviyeleri vardır. IL-6 ve serbest radikallerin seviyesi de artar. Diğer yandan, CD4⁺ T ve B lenfositleri ve NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesi tipik olarak azalır. Östrojene bağlı çok sayıda bağışıklık faktörü menopoz sırasında aşağı yönlü hareket eder. Bunlar, toll benzeri reseptör (TLR) fonksiyonunun kaybını, azalmış antimikrobiyal bileşenleri, servikal mukus üretiminin eksikliğini, kommensal laktobasillerdeki değişiklikleri, vajinal mikroçevrenin asit düzeyini ve bağışıklık hücrelerinin yaşlanmasını içerir. Bağışıklık hücrelerinin yaşlanması ile ilişkili servikste spesifik değişiklikler, dendritik hücrelerin ve yerleşik bellek T hücrelerinin kaybını içerir.

Yan ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, yaşlanmanın insan lenfosit alt grupları üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda yaşla birlikte naif T hücrelerinin ve CD8(+) T hücrelerinin yüzdesinde önemli bir düşüş ve efektör

bellek hücrelerinin ve NK hücrelerinin yüzdesinde bir artış olduğunu bulunmuştur(28).

Postmenopozal kadının serviksteki immün yanıtını değerlendirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (11). Menopoz sonrası servikal bağışıklık etkenlerindeki değişimin özeti aşağıdaki tabloda gösterilmektedir (**Tablo 2.1.**).

Tablo 2.1. Menopoz Sonrası Servikal Bağışıklık Etkenlerindeki Değişim

Artanlar	Azalanlar
• Genel inflamasyon	• İmmün yanıt
• Proinflamatuvar sitokinler, IL6, TNF- α	• TLR ekspresyonu
• NK sayısı	• NK hücrelerinin sitotoksitesi
• Enfeksiyona yatkınlık	• CD4/CD8 oranı
• Maligniteye yatkınlık	• Yerleşik bellek T hücreleri
	• Serviks DC hücreleri
	• B hücrelerinin sıklığı
	• Aşılamaya yanıt
	• Servikal mukus

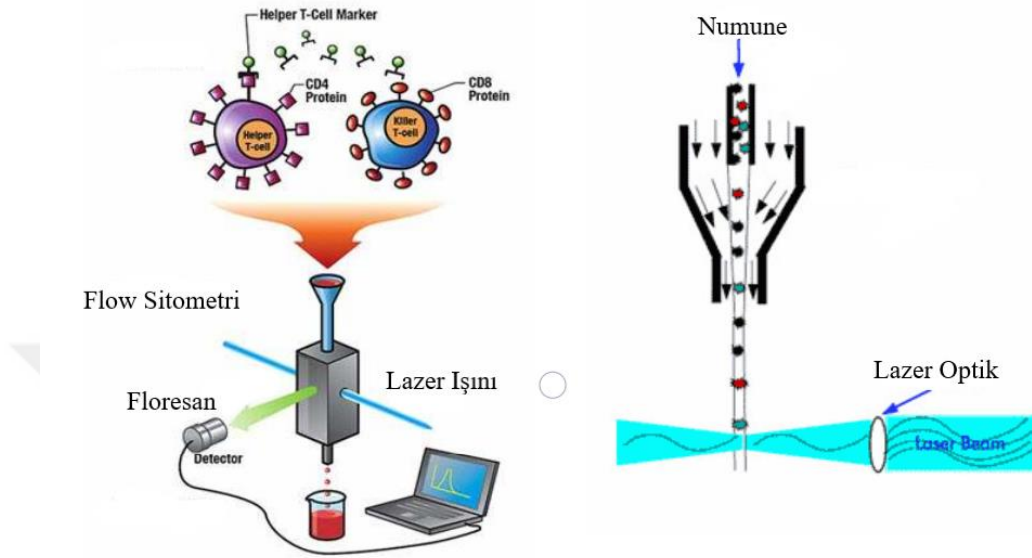
2.5. Dişı Üreme Sistemi Bağışıklık Hücreleri ve Flow Sitometri

Dişı üreme sistemindeki lökositler, epitel tabakasında, lamina propriada ve stromada kümelenmiş veya dağılmış bir biçimde bulunurlar. Dişı üreme sisteminde baskın bağışıklık hücreleri T hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler, langerhans hücreleri, NK hücreleri, nötrofiller ve mast hücreleridir. B hücreleri dişı üreme sisteminde nadir bulunmaktadır (14). Makrofajlar, NK hücreler, dendritik hücreler ve nötrofiller doğal bağışıklık hücreleridir. Adaptif immünite ise patojene maruz kalınması sonrası T hücrelere antijen sunumu ve T hücrelerin aktivasyonu ile gelişen immünitedir. CD4⁺ T helper hücreler B hücrelerin olgunlaşması, immünglobulin üretimi gibi mekanizmaları tetikleyerek humoral immünitede rol oynar.

İmmün yanıt oluşumunda sitokinler aracı rol oynar. Sitolin ve kemokinler dişı genital sisteminde endometrial proliferasyon, menstruasyon ve implantasyon süreçlerine katılan kimyasal habercilerdir. Birçok doğal immünite fonksiyonunda yer alırlar. Kemokinler, immün hücreleri dokuya doğru çekerken aynı zamanda bu hücreleri farklılaştırır ve aktive eder. Sitolinler monositlerden türetilmişse monokin, lenfositlerden türetilmişlerse lenfokin; etkilerini lökositler üzerinde uygularlarsa interlökin, antiviral etkileri varsa interferonlar (IFN) olarak adlandırılır (29).

Geçmişte hücrelerin biyokimyasal ve fiziksel özellikleri sadece mikroskop kullanılarak saptanmaya çalışılmıştır, günümüzde ise gelişen teknoloji ile flow sitometri tekniğı kullanılmaktadır. Flow sitometri, süspansiyon halindeki hücrelerin bir akış kanalı boyunca tek tek geçmesi ve bu sırada hücre büyüklüğü ve granülaritesine göre sınıflandırılması esasına dayanan bir teknik ve cihazdır. Bu teknik hücrenin yüzey ve iç proteinleri ile diğer bileşenlerinin analiz ve ayrımını, lazer ve elektronik teknolojisi kullanılarak büyüklük, granülarite ve floresans emisyonu esasına göre gerçekleştirmektedir. Fırsatçı enfeksiyonu, ciddi veya kalıcı lenfopenisi olan hastalarda lenfosit alt popülasyonlarının değerlendirilmesinde akış sitometrisi oldukça değerlidir (30). Multicolor akış sitometrisi, daha önce karakterize edilmemiş dokulardaki hücre alt kümelerinin fenotiplerini ve

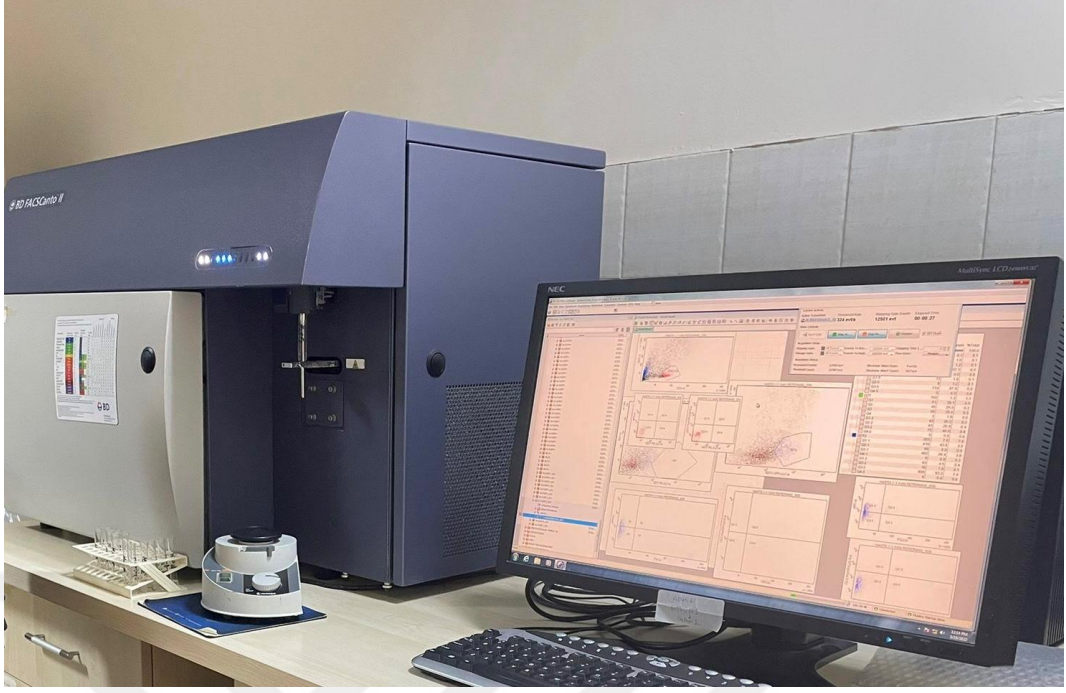
fonksiyonlarını incelemek için güçlü bir cihazdır (31). Hücrelerin flow sitometri analizindeki şematik gösterimi **şekil 2.4.**' te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Flow sitometrik analiz şeması

Flow sitometrinin birçok klinik kullanım alanı mevcuttur. En büyük kullanım alanı lösemi ve lenfomaların tanısı ve incelenmesidir. Ayrıca hematopoetik ve lenfoid kök hücrelerin fenotiplendirilmesi ve fonksiyonel karakterizasyonunda kullanılmaktadır. Flow sitometri ayrıca HIV enfeksiyonunun tanısında, kemik iliği transplantasyonunda periferik ve kemik iliği kaynaklı CD34+ kök hücrelerin belirlenmesinde de önemli görevler üstlenmiştir(32).

İnsan endoservikal sitobrush örneğinden immün fenotiplendirmenin yapılması, lenfosit /monosit popülasyonlarının doğru ve güvenilir ölçümü için birçok çalışma ve protokol belirtilmiştir. Servikal hücre fırçaları ile endoserviksin epitelinden ve muhtemelen transformasyon zonu bölgesinden türetilen hücreleri toplayacak şekilde servikal ostan numune alınır. Numuneler protokollerde belirtilen aşamalardan geçilerek flow sitometri ile analiz edilir(31).



Şekil 2.5. BD FACS Canto II akım sitometri cihazında yaptığımız flow sitometri analizi örneği

Strobo ve arkadaşlarının çalışmasında, HIV ile enfekte kadınlarda intraepitelyal endoservikal gamma delta 1 T hücrelerinin kaybı incelenmiştir. Bu çalışmada seçilen çalışma gruplarının endoservikal sitobrush örneğinin hazırlık prosedürüne ve flow sitometri analizi sonuçlarına yer verilmiştir(3). Juno ve arkadaşlarının çalışmalarında da insan endoservikal örneklerinin toplanması, izolasyonu ve flow sitometrik analizinden bahsedilmiştir(31). Her iki çalışmada da endoservikal sitobrush ile numune alımının servikal biyopsiye göre daha az invaziv ve rahatsız edici olduğu, biyopsiye göre daha az hücre elde edileceği için örnek alırken ardışık 2 adet fırça kullanılması gerektiği, gözle görünür kan içeren numunelerin çalışmaya dahil edilmediği ve alınan örneklerin vakit kaybetmeden hızlı bir şekilde çalışılmaya başlandığı vurgulanmıştır.

2.6. Lenfosit Gelişimi

Tüm beyaz kan hücreleri hematopoetik kök hücrelerden gelişmektedir. Lenfosit gelişimi, lenfoid organlarda gelişen bir takım karmaşık olaylar zinciri sonucu oluşmaktadır. Kan hücreleri ilk olarak gebeliğin 16. günü civarında yolk kesesinde ortaya çıkar, ancak yolk kesesi hematopoezi ilkel kırmızı hücreler, trombositler ve monosit/makrofaj benzeri progenitörlerin üretimi ile sınırlıdır. Kalıcı hematopoetik kök hücreler gebeliğin üçüncü haftasının sonunda dorsal aortta ortaya çıkar. Bu hücreler aortik endotel hücrelerinden klonal olarak farklıdır ve gebeliğin 6.haftasından sonra hematopoezin ana bölgesi haline gelen karaciğer ve plasentaya göç ediyor diye bilinmektedir(33). Kemik iliği hematopoezi, gebeliğin yaklaşık beşinci ayında başlar ve doğumdan sonra hematopoetik hücrelerin birincil kaynağıdır. Vücutta lenfosit oluşumundan sorumlu olan birincil dokular kemik iliği ve timüstür. İlk oluşum sonrası lenfositlerde farklılaşmalara yol açan dalak, lenf düğümleri, gastrointestinal sistem ve solunum yollarında bulunan lenfoid doku kümeleri ikincil lenfoid dokulardır. Lenfosit gelişiminde hematopoetik kök hücreden köken alan lenfoid kök hücreler, B lenfosit, T lenfosit ve NK hücreleri oluşturmaktadır. T ve B lenfositler adaptif bağışıklıkta rol alırken NK hücreleri doğuştan gelen bağışıklıkta rol alırlar (34).

2.6.1. B Hücre Gelişimi

B hücre üretimi ilk olarak intrauterin dönemde karaciğerde daha sonra diğer lenfositler gibi kemik iliğinde gerçekleşmektedir. Hümorale bağışıklıkta oldukça önemli role sahiptirler çünkü B hücreler viral ajanları nötralize ve opsonize eden humoral yanıtı sorumludur. Humoral immünite, antijen sunan hücreler ve T helper 2 sitokin pateni tarafından stimüle edilmektedir. B hücrelerin maturasyonu ve sonucunda antikör üretmesi CD4⁺ T helper hücrelerin asistansına bağlıdır. Fonksiyonunu sürdürebilmesi yüzey immünglobulinlerin ekspresyonuna bağlıdır. İlk olarak B progenitor hücre (pre-pro B hücresi) oluşur. Zamanla farklılaşarak pro B hücresi, pre B hücresi, olgunlaşmamış ve olgun B hücresi, plazma hücresi ve bellek B hücresine dönüşebilir (34).

2.6.2. T Hücre Gelişimi

Hematopoetik kök hücreden köken almaktadırlar. T hücrelerinin büyük bir kısmı timüste gelişirken, intestinal lamina propriada ayrı bir popülasyon geliştiği bilinmektedir. Dolaşımdaki T hücrelerinin büyük kısmı (>%95) alfa ve beta (TCR α/β) olarak adlandırılan zincirleri içeren T hücre reseptörünü (CD3) ifade eder. Geri kalan kısım ise gamma ve delta (TCR gamma-delta veya TCR γ/δ) olarak bilinen homolog zincirlerdir. Akış sitometride T hücrelerini tanımlamakta kullanılan en yaygın işaretçiler CD3, CD4 ve CD8 biyomarkerlarıdır. Timüs içerisinde gelişimin erken aşamalarında alfa beta ve gamma-delta T lenfositleri ayrılmaktadır ve immün sistemde farklı rollerde görev almaktadırlar (34).

T hücresi reseptörü (TCR) alfa-beta veya gamma-delta heterodimeri, hücre zarı üzerindeki CD3 kompleksi ile kovalent olmayan bir şekilde ilişkilidir. CD3 kompleksi, tüm T hücrelerinde eksprese edilir. Kompleks, lenfosit zarı boyunca TCR bağlantı sinyalinin iletilmesinde önemli bir role sahiptir (35).

CD4 ve CD8, T hücresi gelişimi, antijen tanıma ve olgun T hücrelerinin aktivasyonu için büyük öneme sahiptir. CD4⁺ hücreleri, MHC sınıf II tarafından sunulan antijeni tanıırken CD8⁺ hücreleri, MHC sınıf I tarafından sunulan antijeni tanırlar (35). CD3⁺ neredeyse tüm T hücrelerinde bulunur. Toplam T hücresi sayısı, CD3⁺ moleküllerinin sayısı ölçülerek de hesaplanabilir. Aktive CD4⁺ T hücreleri, çeşitli sitokinler salgılar ve diğer enflamatuvar hücrelerin aktivitesinin koordinasyonunda görev alır. CD8⁺ T hücreleri, enfekte veya hasarlı hücreleri yok edebilen ancak aynı zamanda perforin, granzim B ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) salgılayarak alveolar epitel hücrelerinin bozulmasına ve apoptozuna neden olan bir T hücresi alt grubudur (36).

Timüsten çıktıktan sonra, saf T hücreleri vücutta hem kan hem de lenf sıvısında dolaşırlar. Dalak, lenf düğümleri ve bağırsaktaki Peyer yamaları gibi ikincil lenfoid dokularda dolaşan naif T hücreleri, antijen sunmak amacıyla benzer şekilde bu dokulara göç etmiş dendritik hücrelerle (DC'ler) karşılaşır. Saf T hücreleri, DC'ler tarafından sunulan antijenleri inceler. Uygun afiniteye sahip bir

antijen-MHC kompleksi tanımlandığında, naif T hücreleri aktive olur (37). Naif T hücreleri vücutta sürekli olarak kan, dalak, lenf, lenf düğümleri ve diğer dokularda dolaşımında olduklarından, çok çeşitli farklı anatomik bölgelerden türetilen antijenleri örnekleyebilirler (38). Uygun tamamlayıcı kompleksin devreye girmesi ile aktive edilmiş T hücreleri çoğalır. Aktive edilmiş T hücreleri ayrıca, B hücreden zengin alanlar ile teması kolaylaştırmak için ikincil lenfoid organlardaki T hücreden zengin kısımların çevresine doğru göç eder. Bu durum, antijene özgü B hücreleri ile etkileşime olanak sağlar, böylece antikor üretimi için T hücresi yardımı sağlar(35).

Bellek T hücrelerinin bazı uygun işaretleri, CD45 ve CCR7'dir. CD45RA izoformu, naif T hücrelerinde eksprese edilir. CD45RO izoformu, aktive edilmiş veya hafıza T hücrelerinde eksprese edilir. CD45RA tek başına çoğu durumda saf CD4 hücrelerini etkili bir şekilde ayırt ederken, CD8 hücreleri için o kadar yararlı değildir, çünkü bellek CD8 hücrelerinin önemli bir kısmı CD45RA ekspresyonuna geri dönebilir (35).

İnsan yaşlanma çalışmalarında, CD27, CD45RA ve CD57 gibi çeşitli fenotipik belirteçlerdeki farklılaşma incelenir. Farklılaşmanın dört aşaması vardır: Saf CD45RA+CD27+, Merkezi bellek CD45RA-CD27+, Efektör bellek CD45RA-CD27- ve son olarak, Terminal efektörü CD45RA+CD27- T hücreleri, terminal efektörü genellikle yaşlanma işaretçisini ifade eder(39).

CD69, zara bağlı, tip II bir C-lektin reseptörüdür. Stimülasyondan sonra plazma membran yüzeyinde hızlıca ortaya çıkması nedeniyle lenfosit aktivasyonunun klasik bir erken belirtecidir. CD69, yerleşik bellek T (TRM) hücreleri ve gamma-delta ($\gamma\delta$) T hücreleri dahil olmak üzere dokuda yerleşik bağışıklık hücrelerinin bazı alt grupları tarafından ifade edilir ve bu nedenle doku tutulmasının bir belirteci olarak kabul edilir. Son veriler, CD69'un seçilen T-hücresi alt kümelerinin bazı spesifik fonksiyonlarını düzenlediğini, migrasyon-tutma oranını ve ayrıca efektör veya düzenleyici fenotiplerin edinimini belirlediğini ortaya koymuştur. CD69'un spesifik olarak, düzenleyici T (Treg) hücrelerinin farklılaşmasını ve IFN- γ , IL-17 ve IL-22'nin salgılanmasını düzenlediği bilinmektedir (40).

Majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC), hayvanlarda ve insanlarda çeşitli hücre yüzeyi belirteçlerini, antijen sunan molekülleri ve bağışıklık fonksiyonunda yer alan diğer proteinleri kodlayan bir grup geni tanımlamak için kullanılan bir terimdir. İnsan lökosit antijeni (HLA) kompleksi, insan MHC'si terimleri, kromozom 6 üzerinde, çeşitli hücre yüzeyi belirteçlerini, antijen sunan molekülleri ve diğer proteinleri kodlayan bir grup geni tanımlar; birçoğu bağışıklık işleviyle ilgilidir (41).

İnsanlardaki majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC), insan lökosit antijeni (HLA) genleri dahil olmak üzere yüzlerce gen içeren bir genetik bölgeyi ifade eder. Bu nedenle, insan MHC bölgesi, HLA bölgesi olarak da adlandırılır. HLA genleri, gen ürünlerini beyaz kan hücrelerinin yüzeyinde ifade eder (bu nedenle "insan lökosit antijeni" adı verilir) (41).

HLA bölgesi 3 sınıftan oluşmaktadır. Sınıf I bölgesi, "klasik" HLA antijenlerini kodlayan genleri içerir: HLA-A, B ve C. Sınıf I antijenler, eritrositler ve trofoblastlar dışında vücudun hemen hemen tüm hücrelerinde değişen oranlarda eksprese edilir. Sınıf II bölgesi, HLA sınıf II moleküllerini, HLA-DP, DQ ve DR'yi kodlayan genleri içerir. Sınıf II moleküller, antijen sunan hücreler (APC; örneğin, dendritik hücreler, makrofajlar veya B hücreleri) üzerinde yapısal olarak eksprese edilir ve normalde çok az ekspresyonu olan veya hiç ekspresyonu olmayan diğer birçok hücre tipinde inflamasyon sırasında indüklenebilir. Sınıf I ve sınıf II arasındaki bölge, sınıf III bölgesi olarak bilinir. Bu bölge HLA genlerinden hiçbirini içermemesine rağmen, immün yanıtta önemli birçok gen içerir (41).

HLA-DR kompleksi, genellikle 9 ila 30 amino asit uzunluğundaki peptit yapıdadır ve T-hücresi reseptörü için bir ligand oluşturur. Organ naklinde oldukça önemli olan ve greft kaybından en çok sorumlu antijenler HLA-DR (ilk altı ay), HLA-B (ilk iki yıl) ve HLA-A'dır (uzun süreli sağkalım)(42). Bu antijenlerin konakçı ve donör arasında iyi eşleşmesi, dokunun canlı kalmasını sağlamak için çok önemlidir. HLA-DR'nin birincil işlevi, T-helper hücre aktivasyonu ve potansiyel olarak yabancı olan peptit antijenlerini bağışıklık sistemine sunmaktır. Antijen sunan hücreler (makrofajlar, B hücreleri ve dendritik hücreler), HLA-DR'nin tipik olarak bulunduğu hücrelerdir. Hücre yüzeyinde artan HLA-DR,

genellikle stimölasyona yanıt olarak ortaya oluşur ve bu nedenle HLA-DR, aynı zamanda immün stimölasyon için bir belirteçtir(43).

2.6.2.1. Gamma-Delta ($\gamma\delta$) T Hücreleri

γ ve δ zincirlerinden oluşan $\gamma\delta$ T hücreleri, mukozal epitel dokuları için yabancı patojen ajanlara karşı ilk savunma hattında görev alır. $\gamma\delta$ T hücreleri, fetal timik ontogenez sırasında timüste erken dönemde ortaya çıkar (44).

$\gamma\delta$ T hücreleri periferik dolaşımda bulunan T hücrelerinin %1-10 oranında oldukça az bir kısmını oluşturmaktadır. Periferik kanda %10 üzerine çıkan artmış $\gamma\delta$ T lenfosit düzeyi araştırılması gereken enfeksiyon, otoimmün hastalık, kanser ve immün yetmezlik durumunun öncülü olabilir (45).

$\gamma\delta$ T hücreleri, tümör hücrelerini T hücresi reseptörü (TCR) veya doğal öldürücü hücre reseptörleri (NKR'ler) aracılığıyla tanıyabilir; en önemlisi, genellikle transformasyon üzerine indüklenen veya aşırı eksprese edilen ligandlara bağlanan NKG2D'dir (46). $\gamma\delta$ T hücreleri, patojenle uyarılmış hücreler tarafından MHC kısıtlamasız bir şekilde yukarı yönde regüle edilen korunmuş peptit ve peptit olmayan antijenleri hızlı şekilde tanır ve bu onları $\alpha\beta$ T hücrelerinden ayırır. Aktif $\gamma\delta$ T hücreleri, enfekte olmuş veya stresli hücrelerin parçalanması, sitokin ve kemokin üretimi, B hücrelerine yardım ve IgE üretimi, antijen sunumu yoluyla $\alpha\beta$ T hücrelerinin hazırlanması, dendritik hücrelerin olgunlaşması ve stromal hücre fonksiyonunun düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli görevleri bulunur (44).

TCR' nin gamma-delta formunu ifade eden T hücreleri, fizyolojik rolü henüz anlaşılmayan ayrı bir fonksiyonel sınıftır. Normal bireylerde, dolaşımdaki T hücrelerinin yaklaşık yüzde 1 ila 5'i TCR $\gamma\delta$ +'dır, bu hücrelerin büyük çoğunluğu "çift negatiftir" (CD4-CD8-) (47). Kanda olduğu gibi sekonder lenfoid dokularda TCR $\gamma\delta$ /TCR α/β oranı yaklaşık 50'de 1'dir. Ancak bağırsak epiteli gibi diğer yerlerde oran 5'te 1'dir (35).

$\gamma\delta$ T hücrelerinin viral, fungal, bakteriyel patojenlere karşı birinci basamak savunmada rol aldığı bilinmektedir. $\gamma\delta$ T hücrelerinin 2 ana alt grubu

bulunmaktadır: periferik kanda dolaşan $\gamma\delta 2$ T lenfositleri ve mukoza ilişkili lenfoid dokuda yerleşmiş olan $\gamma\delta 1$ T lenfositleri. Sağlıklı bireyler tipik olarak yalnızca periferik kanda 50-500 milyon $\gamma\delta 2$ alt kümesi olan $V\gamma 9V\delta 2$ T hücresi barındırır (insanlarda periferik kandaki $\gamma\delta$ T hücrelerinin %80-90'ını oluşturur) (48). $\gamma\delta 1$ T lenfositleri mukozalardaki $\gamma\delta$ T hücrelerinin %10-40'ını oluştururlar. Stresle indüklenen MHC ile ilişkili molekülleri tanırlar, listeria monocytogenes ve sitomegalovirüslere karşı bağışıklıkta rol aldığı bilinmektedir. $\gamma\delta 2$ T lenfositleri ise mikobakteriyel enfeksiyonlar, HSV tip 2, koksaki virüs B3 gibi etkenlere yanıtta rol oynamaktadır (49).

Vücut savunmasında önemli rolü olan IL-17 sitokini, hücre içi patojenlerin ve mantarların savunmasında rol almaktadır. Son yıllarda fareler üzerinde yapılan çalışmalarda $\gamma\delta$ T hücrelerinin, escherichia coli ve mycobacterium tuberculosis enfeksiyonları sırasında IL-17 ürettiği gösterilmiştir (49).

Gamma-delta T hücreleri, gebelik esnasında uterusu bildirilmiştir (50, 51). Roller belirsizdir, ancak immünosupresif gamma-delta T hücreleri, maternal-fetal arayüzü agresif immün yanıtlardan korumak için maternal immün sistemin düzenlenmesinde rol oynayabilir. Gamma-delta T hücrelerinin sayısındaki artışın gebelik kaybı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (52).

Gamma-delta T lenfositleri bağırsakta oldukça fazla sayıda bulunmaktadır. Sindirim sistemi allerjisi ve Çölyak Hastalığı gibi bağırsak aşırı duyarlılığının söz konusu olduğu durumlarda intraepitelyal gamma-delta hücrelerinin sayısında artış görülmektedir. Diğer önemli intraepitelyal gamma-delta T lenfosit grubu solunum sistemi mukozasındadır. Normal havayolu fonksiyonunun korunmasında rol alırken ayrıca alerjik rinit, astım gibi havayolu hastalıklarında da proinflamatuvar fonksiyonları ile rol aldıkları bilinmektedir(53). Akciğer kanseri, akut myeloid lösemi, renal hücreli kanser ve özellikle kolon kanseri olmak üzere gastrointestinal sistem kanserlerinde gamma-delta T lenfositlerinin antitümör özelliklerinin tedavide kullanımına yönelik birçok çalışma bulunmaktadır ve çalışmalar devam etmektedir(54, 55, 56).

$\gamma\delta$ T hücresi alt kümelerinin, özellikle GDT2+ alt kümesinin frekansları, 30 yaşından sonra yaşla birlikte azalır. Ayrıca, GDT2+ T hücrelerinin, $\alpha\beta$ T hücreleri ve diğer $\gamma\delta$ T hücreleri alt kümelerine kıyasla hücrel yaşlanmaya ve çevresel strese karşı daha dirençli olduğu öne sürülmüştür. Yaşlanma sırasında, CD57 yaşlanma belirtecinin GDT2- T hücrelerinde daha yaygın olarak ifade edildiği ancak GDT2+ hücrelerinde ifade edilmediği de gösterilmiştir. Yaşlanmanın GDT1+ ve GDT2+ üzerindeki farklı etkisi, stimülasyondan sonraki farklı tepkilerinden kaynaklanıyor olabilir(57). Xu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da genç ve yaşlı donörlerin periferik kanı, çeşitli GDT hücresi alt kümelerinin fenotipini, fonksiyonel kapasitesini, proliferasyon kapasitesini ve gen ekspresyonunu değerlendirmek için kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda GDT2 hücrelerinin hücre yaşlanmasına karşı dirençli oluşu vurgulanmıştır(58).

Min Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise kronik hepatit B enfeksiyonunda $\gamma\delta$ T hücrelerinin işlevlerine dikkat çekilmiş. Bu çalışmada pegile INF- α tedavisi alan kronik hepatit B hastalarında periferik $\gamma\delta$ T hücrelerinin fenotip ve işlevindeki dinamik değişiklikleri araştırmayı hedeflemişler. Sonuç olarak ortaya, IFN- α tedavisinin $\gamma\delta$ T hücrelerinin sitokin üretimini veya sitotoksite potansiyelini artırabileceği ve tedavinin etkisine katkıda bulunabileceği ortaya çıkmıştır (59).

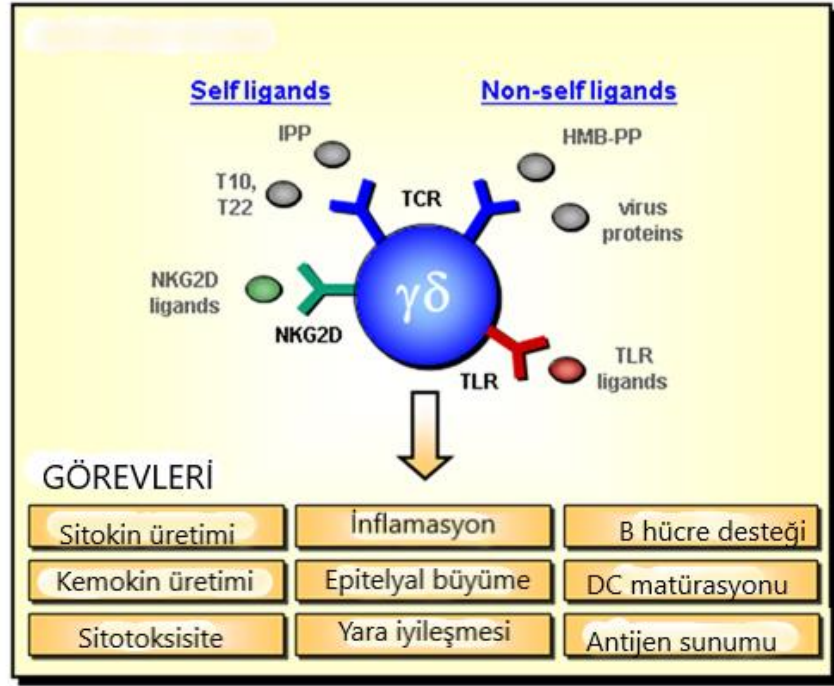
Iskra Tuero ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise $\gamma\delta$ T hücrelerinin Sıman İmmün Yetmezlik Virüsü (SIV)'nün kontrolüne olan etkisi araştırılmıştır. SIV ile enfekte makaklarda yapılan incelemede $\gamma\delta 1$ ve $\gamma\delta 2$ T hücrelerinin sıklığının, fenotipinin ve işlevselliğinin değerlendirilmesi sonucunda CD8⁺ ve CD4⁺ CD8⁺ $\gamma\delta 1$ T hücreleri, sitotoksik işlevi düşündüren NKG2D, CD107a ve granzim B'nin yukarı yönlü regülasyonu izlendi. Buna karşılık, $\gamma\delta 2$ T hücreleri, enflamatuar sitokin IFN- γ 'yı üretme kabiliyetinde azalma göstermiştir. Endoservikal $\gamma\delta 2$ T hücreleri, diğer bölgelerden daha yüksek inflammatuar profiller göstermiştir. Sonuç olarak kanda güçlü bir $\gamma\delta 1$ ve $\gamma\delta 2$ T hücresi yanıtının, SIV ile enfekte makakların dişi üreme sisteminde vireminin kontrolüne katkıda bulunduğunu göstermektedir (60).

Cimini ve arkadaşları yaptıkları çalışmada primer ve kronik HIV enfeksiyonunun dolaşımdaki ve bağırsaklardaki etkilerini incelemişlerdir. Eftör GDT1 hücrelerinin sıklığında hem dolaşımda hem de mukozal kompartmanlarda bir artış gözlemlemişlerdir. Çalışma sonuçlarında, GDT2 hücreleri tarafından kendiliğinden oluşan IFN-y üretiminin kronik HIV enfeksiyonunda kaybolduğı görölmüşür. Kronik HIV enfeksiyonunda mukozal GDT1 ve GDT2 hücrelerinin fonksiyonel kabiliyetlerinin primer enfeksiyona göre kaybolduğı ve sürekli antijenik stimölasyonun indüklediğı tükenme mekanizmalarının ortaya çıktığını belirtmişlerdir (61).

Strobo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, HIV ile enfekte olan ve olmayan kadınlarda endoservikal GDT hücrelerini karşılaştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda HIV ile enfekte kadınların endoservikal mukozal bağısıklığında enfekte olmayanlara kıyasla GDT1 hücrelerin sıklığında önemli bir azalma olduğı saptanmıştır. Ayrıca HIV ile enfekte kadınların kanında GDT2 hücrelerinin tükendiğı saptanmıştır(3).

Birçok çalışma, $\gamma\delta$ T hücrelerinin, çeşitli malign tümörlerin bağısıklık tepkisinde yaygın olarak yer aldığını ve en etkili erken antitümör eftör hücrelerden biri olduğunu kanıtlamıştır. Tümörü hedef alan $\gamma\delta$ T hücrelerinin, bazı tümörlerde olumlu prognozun en önemli belirleyicisi olduğı gösterilmiştir (44). $\gamma\delta$ T hücrelerinin görevleri şekilde özetlenmiştir (**şekil 2.6.**).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, insanda kronik enfeksiyon ve kanser sürecinde sürekli antijen stimölasyonunun $\gamma\delta$ T hücrelerin fonksiyonlarında tükenme belirtileri ortaya çıkardığını göstermiştir. $\gamma\delta$ T hücrelerinin bağısıklık kontrol noktalarındaki görevlerinden yola çıkarak bu tükenme sürecinin engellenmesine yönelik bazal immünoterapiyi iyileştirme stratejileri geliştirilmektedir (44).



Şekil 2.6. $\gamma\delta$ T hücrelerinin görevleri

2.6.3. NK Hücreleri

NK hücreleri (doğal öldürücü hücreler) kemik iliğinden köken alan hücrelerdir, doğuştan gelen bağışıklığın bir bölümünü oluştururlar. Periferik lenfositlerin %15 'ini oluşturur. NK hücreleri, önemli istisnalar olmasına rağmen, çoğu durumda organlardaki lenfositlerin bir azınlığını oluşturur. NK hücreleri, tümör hücreleri ve çeşitli patojenlere karşı sitotoksik aktivite gösterir. Son çalışmalar, dolaşımdaki NK hücrelerinin, farklı sitokin profilleri ile efektör NK hücre alt tiplerine farklılaşabildiğini ve çeşitli inflamatuvar özellikler kazanabildiğini göstermektedir. NK hücreler özellikle viral enfeksiyonlara verilen yanıtta ve tümöral doku büyümesinin kontrolünde önemli bir role sahiptir (62).

NK hücrelerinin sitotoksitesi hızlı bir süreçtir. Akut bir viral enfeksiyon sırasında birkaç gün içerisinde artan NK hücre sitotoksitesi belirgindir(63, 64).

Fakat T hücreleri başta sitotoksiste özelliğine sahip değildir. Enfeksiyona maruz kalma sonrası bir kez aktive edildikten sonra sitotoksiste göstermeye başlarlar.

NK hücreleri, önemli istisnalar olmasına rağmen, çoğu durumda organlardaki lenfositlerin azınlık grubunu oluştururlar. Gebelik sırasında duodenal epitelde ve uterus desiduasında, NK hücreleri sırasıyla lenfositlerin yüzde 45'ini ve yüzde 70'ini oluşturur (65, 66). NK hücrelerinin sitotoksiste fonksiyonları için geliştirilen testler bulunmaktadır. Test sonucu anormal ise, sonucun güvenilirliğini tehlikeye atabilecek birçok değişken olduğundan (ör. numunelerin taşınması sırasındaki hasar, aktif hastalık, ilaçlar) en az bir ay arayla üç ayrı tetkik ile sonuç doğrulanmalıdır (67).

NK hücreleri, tetiklendikten sonra sitolitik mekanizmayı devreye sokan aktivasyon reseptörlerini ifade ederler. Uyarı üzerine NK hücre aktivasyonu ve daha etkili sitoliz ile sonuçlanan doğal sitotoksiste reseptörleri tanımlanmıştır. En iyi karakterize edilen aktivasyon reseptörü, NKG2D olarak adlandırılan bir moleküldür. NKG2D ligandları, viral enfeksiyon ve transformasyon dahil olmak üzere hücresel stres ile düzenlenir. Sitotoksik CD8+ T lenfositleri ve doğal öldürücü hücreler üzerinde aktive edici bir reseptör olan NKG2D'yi bağlar(68).

Çalışmalar, CD107a'nın (LAMP-1), NK ve aktive edilmiş CD8+ T hücrelerinin degranülasyonu için bir belirteç olabileceğini göstermektedir (69). CD107a, NK hücre litik granüllerinin içinde bulunur ve litik granüller salındıkça NK hücre yüzeyinde artış gösterir. Bu nedenle, CD107a tahlili, çoğu durumda sitotoksistenin iyi bir göstergesi olan NK hücre degranülasyonunun bir ölçüsüdür (70).

2.7. Dendritik Hücreler

Dendritik hücreler (DC), saf T hücre proliferasyonunu uyarmak için antijenleri çapraz sunabilen ve işlenmiş antijeni lenf düğümlerine taşıyabilen profesyonel APC'lerdir. DC'ler, geleneksel DC'ler, plazmositoid DC'ler, monosit türevli DC'ler ve LC'ler (Langerhans hücreleri) gibi işlevsel olarak benzersiz alt gruplara sahip çeşitli bir APC grubudur (71). DC'ler ağırlıklı olarak bazal ve

suprabazal bölgelerde görülmüştür ve dendritik yapıları, ektoserviksın çok katlı skuamöz epitelinin ve serviks transformasyon zonunun bazal katmanlarında daha belirgindir (11). Reseptör aracılı endositoz, hücre yüzey molekülleri ve DC'ler tarafından gerçekleştirilir. DC tarafından elde edilen bilgi daha sonraki T hücre aracılı T helper 1, T helper 2 ya da Treg hücre yönündeki farklılaşmayı şekillendirmektedir(72).

2.7.1. Langerhans Hücreleri

Langerhans hücreleri (LC) tümü myeloid kökenden gelen özel dendritik hücrelerdir. Epidermis, özefagus, oral kavite, vajen epiteli, dalak, timüs, lenf nodu gibi organ ve dokularda bulunur. T lenfositlere antijen sunumunda görev alırlar ve epiteli hedef alan virüslere karşı savunmada rol oynarlar. İntraepitelyal tabakada bulunur ve antijen sunumu, CD4/CD8 lenfositlerini uyarma yeteneğine sahiptir (73).

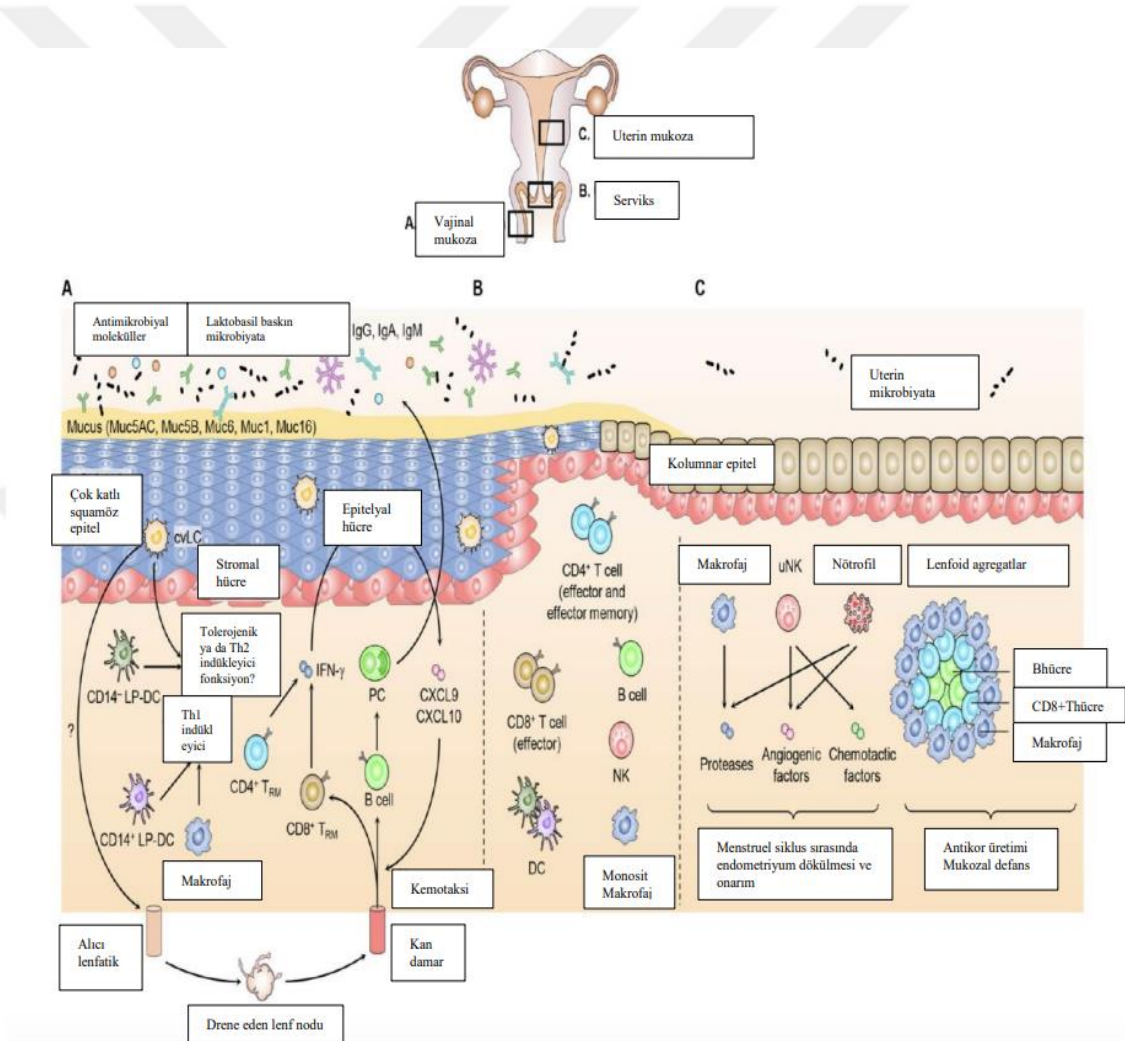
Serviksın skuamöz epiteli esas olarak HPV'nin birincil hedefi olan keratinositlerden ve skuamöz epitelin immün gözetimi için önemli olan bir tür olgunlaşmamış dendritik hücre (DC), Langerhans hücrelerinden (LC) oluşur. Bu nedenle, hedef hücreler (keratinositler) ve antijen sunan hücreler (LC) arasındaki HPV enfeksiyonu bölgesindeki yakın temas, LC'nin fonksiyonel aktivasyonu, farklılaşması ve kemotaksisi için potansiyel olarak önemlidir. Giannini ve arkadaşlarının bir çalışmasında, transformasyon zonunun servikal intraepitelyal neoplazi gelişimi açısından yüksek riskli bölge olmasının nedenlerinden biri, transformasyon zonu epiteli içindeki immün gözetimin, kemokinlerin/sitokinlerin değişen ekspresyonu ve buna eşlik eden azalmış LC yoğunluğu olduğu belirtilmiştir(74).

2.8. Monositler ve Makrofajlar

Monositler çeşitli sitokin ve kemokinleri salgılayan immün efektör hücrelerdir. Profesyonel fagositler olan makrofajlar, patojenin tanınması, ölü hücrelerin uzaklaştırılması, immün sistemin sitokin ve kemokinlerle indirekt

stimülasyonu ve inflammatuar yanıtın gelişmesini sağlamaktadır. Makrofajlar, endometrium boyunca dağılmıştır ve özellikle endometrial bezlerin çevresinde bulunurlar. Doku makrofajları, çevresel etkenlere karşı proinflammatuar ve antienflamatuar yanıtlar arasında değişen farklı fonksiyonel fenotipler kazanır. Yapılan çalışmalar, vajinanın makrofaj sayısının sıklıktan etkilenmediğini ancak menstrüasyon döneminde endometrial makrofajların sayısında, lökosit popülasyonunun yaklaşık %15' ini temsil eden ilerleyici bir artış olduğunu göstermiştir (75).

Kadın genital sistem immünitesinde yer alan yapıların özeti **şekil 2.7.**'te gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Kadın genital sistem immünitesinde yer alan yapılar(15).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi ve Yeri, Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarlarında, 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 (Ek-1).

3.2. Araştırmaya Alınma Kriterleri

Çalışma tasarlanırken belirlenen çalışma grubuna sağlıklı premenopoz ve postmenopoz hastalar dahil edilmiştir. Çalışma grubuna dahil olma kriterleri; 30-65 yaş aralığında kadın olmak, jinekolojik açıdan asemptomatik olmak, son 5 yıl içerisinde smear ve HPV negatif test sonucunun olması, daha önce tanı almış servikal prekanseröz lezyon veya HPV/smear testi anormal sonuç öyküsü olmaması olarak belirlendi.

3.3. Araştırmanın Yeri ve Örnek Alma Prosedürleri

Çalışmanın işleyişi 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. 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 şikâyeti 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 kaydedildi. Hastaların son 5 yıl içerisindeki güncel HPV ve smear 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 transformasyon zonu ve endoservikal kanaldan fırça 360 derece döndürülmek suretiyle örnek toplandı. Bu sırada gözle 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. Örnekler buzlu taşıma ünitesinde en geç bir saat içinde laboratuvara ulaştırıldı ve analizlere hemen başlandı.

3.4. Laboratuvar Aşamaları

Laboratuvara ulaştırılan örnekler çeşitli aşamalardan geçilerek hazırlandı ve analiz edildi. Bütün işlemler biosafety level 2 düzeyindeki laminar akım kabinlerinde gerçekleştirildi. Endoservikal örnekleri taşıyan tüp önce 45 saniye boyunca içindeki iki adet fırça ile vortexlendi. 100 mikrometrelik süzgeçten geçirildi. Ardından tüp 2000 rpm devirde 10dk boyunca fırçalar tüpün içindeyken santrifüj edildi (**Şekil 3.1**). Ardından pellet bozulmadan nazikçe fırçalar çıkarıldı. Süpernatant pipet ile pellete zarar vermeden alındı ve atıldı. Ardından fırçalar 50ml'lik falkon tüpün içine yıkandı. Santrifüj edilerek fırçalar ve süpernatant atıldı. İki pellet mikropipetle toplandı ve birleştirildi. 600 mikrolitre cell wash ile yıkanan pelletlerden, 100 mikrolitre alınarak boyama yapılacak olan flow tüplerine aktarıldı.

Endoservikal örnekler için daha önceden oluşturduğumuz monoklonal antikor panelleri, panel 1, panel 2, panel3, panel4, panel 5 şeklindeydi. Panel 1 TCR gamma-delta (PE/Cyanine7-Biolegend clone B1), TCR gamma-delta2 (APC/Fire 750-Biolegend clone B6), CD3-4-8(PE/Cy5-PE-FITC-Biolegend clone UCHT1 ; RPA-T4 ; RPA-T8) şeklinde tasarlandı. Panel 2 TCR gamma-delta (PE/Cyanine7-Biolegend clone B1), TCR gamma-delta2 (APC/Fire 750-Biolegend clone B6), CD45RA (FITC-Biolegend clone HI100), CD27 (PerCP-Biolegend

clone M-T271) şeklinde tasarlandı. Panel 3 TCR gamma-delta (PE/Cyanine7-Biolegend clone B1), TCR gamma-delta2 (APC/Fire 750-Biolegend clone B6), HLA DR (PE/Cyanine 5- Biolegend clone L243), NKG2D (APC- Biolegend clone 1D11) şeklinde tasarlandı. Panel 4 TCR gamma-delta (PE/Cyanine7-Biolegend clone B1), TCR gamma-delta2 (APC/Fire 750-Biolegend clone B6), CD107a (PerCP- Biolegend clone H4A3) şeklinde tasarlandı. Panel 5 TCR gamma-delta (PE/Cyanine7-Biolegend clone B1), CD69 (APC/Cyanine7- Biolegend clone FN50) şeklinde tasarlandı.



Şekil 3.1. 50 ml falkon tüpte RPMI solüsyonu içerisinde santrifüj edilen fırçalar

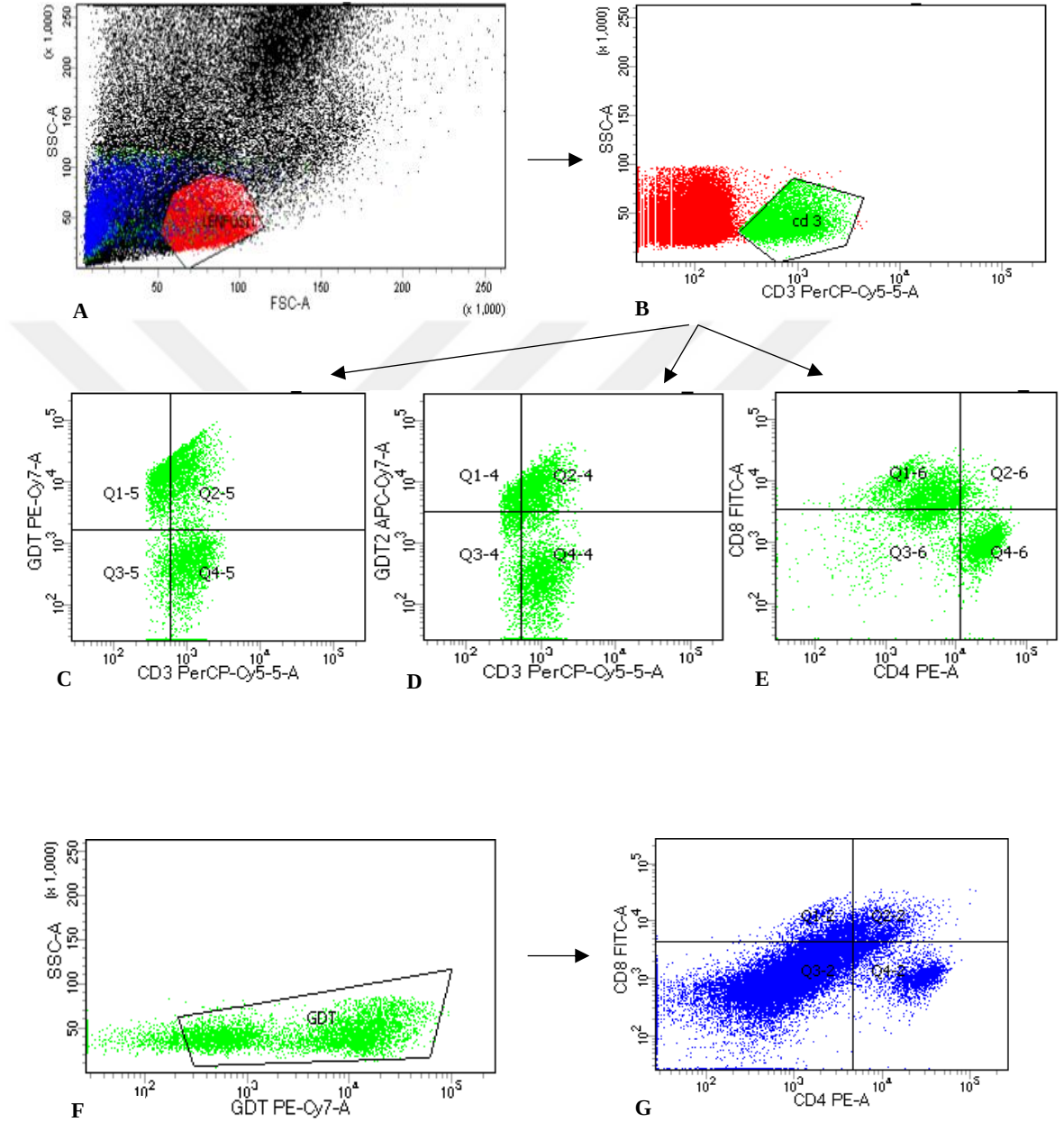
Boyama işlemi için 100 mikrolitre örnek içeren flow tüplerine her monoklonal antikordan 5 mikrolitre olacak şekilde paylaştırıldı ve karanlık alanda,

oda ısısında 30 dakika bekletildi. Ardından tüpler dengeli bir şekilde 2500 rpm devirde 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve pellet 200 mikrolitre cell wash ile dilüe edildi. Tekrar son kez 2500 rpm devirde 7 dakika santrifüj edilerek süpernatantı döküldü ve 600 ml cell wash ile dilüe edilerek akım sitometri cihazında okumaya hazır hale getirildi.

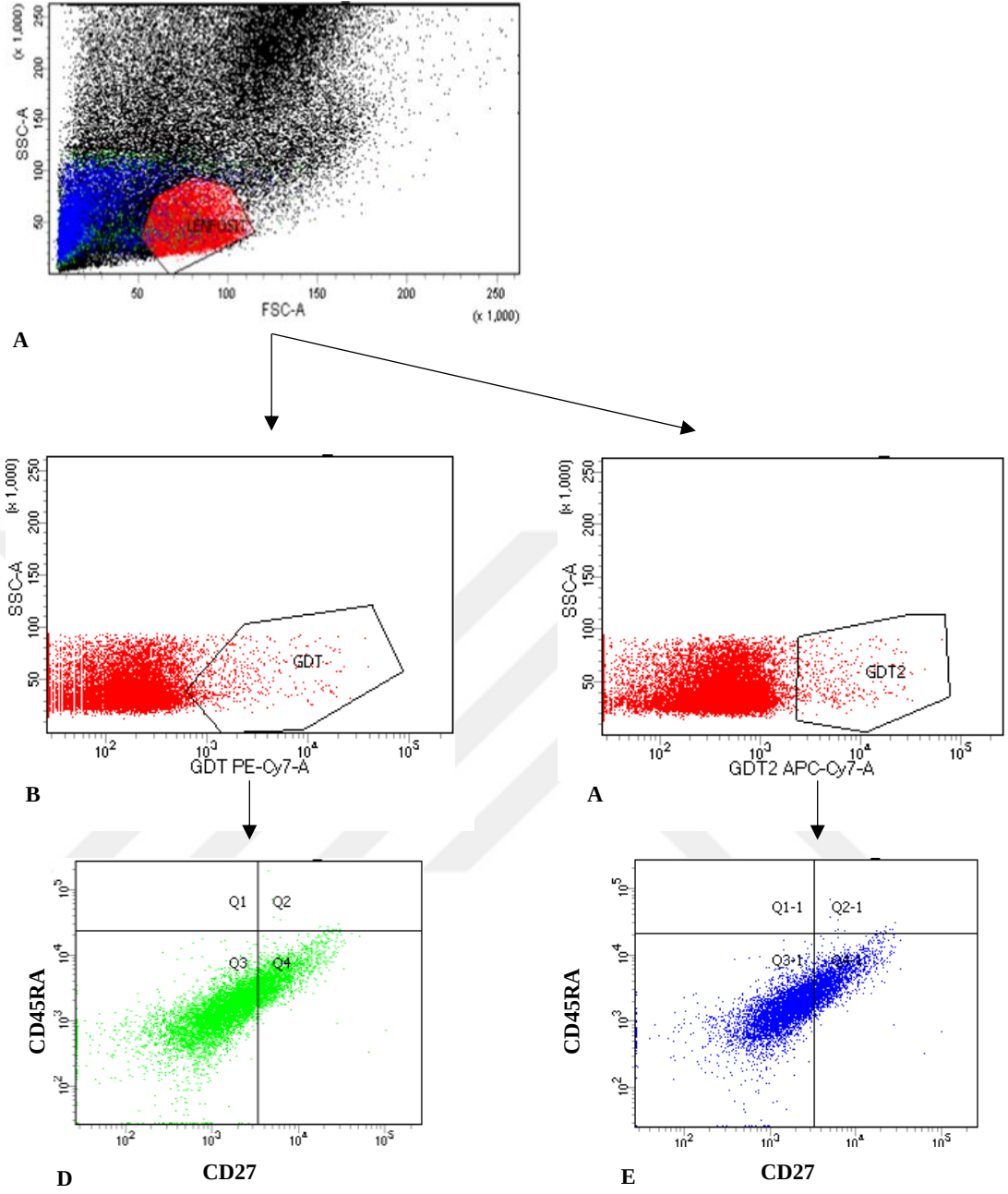
3.5. Araştırmanın Analizi

Tüplerin okumaları BD FACS Canto II akım sitometri cihazında gerçekleştirildi. Analizler ise BD FACS Diva software ile gerçekleştirildi. Analiz sırasında endoservikal sitobrush örneklerinde; hücre sayısı, T lenfosit (CD3+) yüzdesi, CD4 T lenfosit (CD3+CD4+) yüzdesi, CD8 T lenfosit (CD3+CD8+) yüzdesi, CD4 ve CD8 olan T lenfosit (CD3+CD4+CD8+) yüzdesi, CD4 ve CD8 olmayan T lenfosit (CD3+CD4-CD8-) yüzdesi, total gamma-delta hücre yüzdesi, gamma-delta 1 hücre yüzdesi, gamma-delta 2 hücre yüzdesi, gamma-delta 1/2 hücre oranı, GDT içerisinde CD4 hücre (GDT+CD4+CD8-) yüzdesi, GDT içerisinde CD8 hücre (GDT+CD8+CD4-) yüzdesi, GDT içerisinde CD4 ve CD8 olan hücre (GDT+CD4+CD8+) yüzdesi, GDT içerisinde CD 4 ve CD8 olmayan hücre (GDT+CD4-CD8-) yüzdesi, GDT içerisinde CD45RA hücre (GDT+CD45RA+CD27-) yüzdesi, GDT içerisinde CD27 hücre (GDT+CD27+CD45RA-) yüzdesi, GDT içerisinde CD45RA ve CD27 olan hücre (GDT+CD45RA+CD27+) yüzdesi, GDT içerisinde CD45RA ve CD27 olmayan hücre (GDT+CD45RA-CD27-) yüzdesi, GDT 2 içerisinde CD45RA hücre (GDT2+CD45RA+CD27-) yüzdesi, GDT 2 içerisinde CD27 hücre (GDT2+CD27+CD45RA-) yüzdesi, GDT 2 içerisinde CD45RA ve CD27 olan hücre (GDT2+CD45RA+CD27+) yüzdesi, GDT 2 içerisinde CD45RA ve CD27 olmayan hücre (GDT2+CD45RA-CD27-) yüzdesi, GDT içerisinde HLADR hücre (GDT+HLADR+) yüzdesi, GDT içerisinde NKG2D hücre (GDT+NKG2D+) yüzdesi, GDT 2 içerisinde HLADR hücre (GDT2+HLADR+) yüzdesi, GDT 2 içerisinde NKG2D hücre (GDT2+NKG2D+) yüzdesi, GDT içerisinde CD107a hücre (GDT+CD107a+) yüzdesi, GDT 2 içerisinde CD107a hücre (GDT2+CD107a+) yüzdesi, GDT içerisinde CD69 hücre (GDT+CD69+) yüzdesi

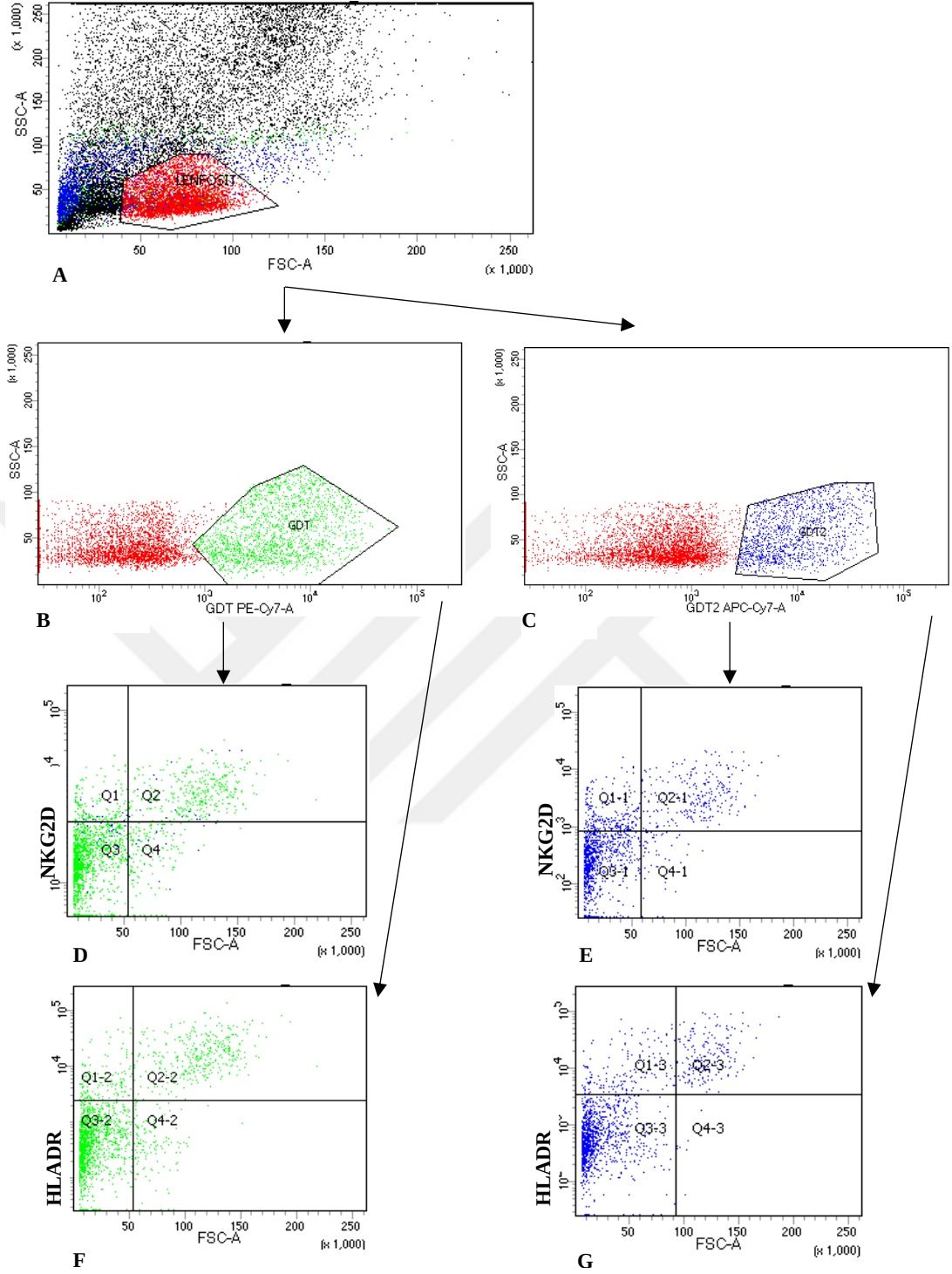
verileri toplandı ve kayıt edildi. Akım sitometri çalışmaları sırasında kullanılan kapılama stratejileri aşağıda verilmiştir.



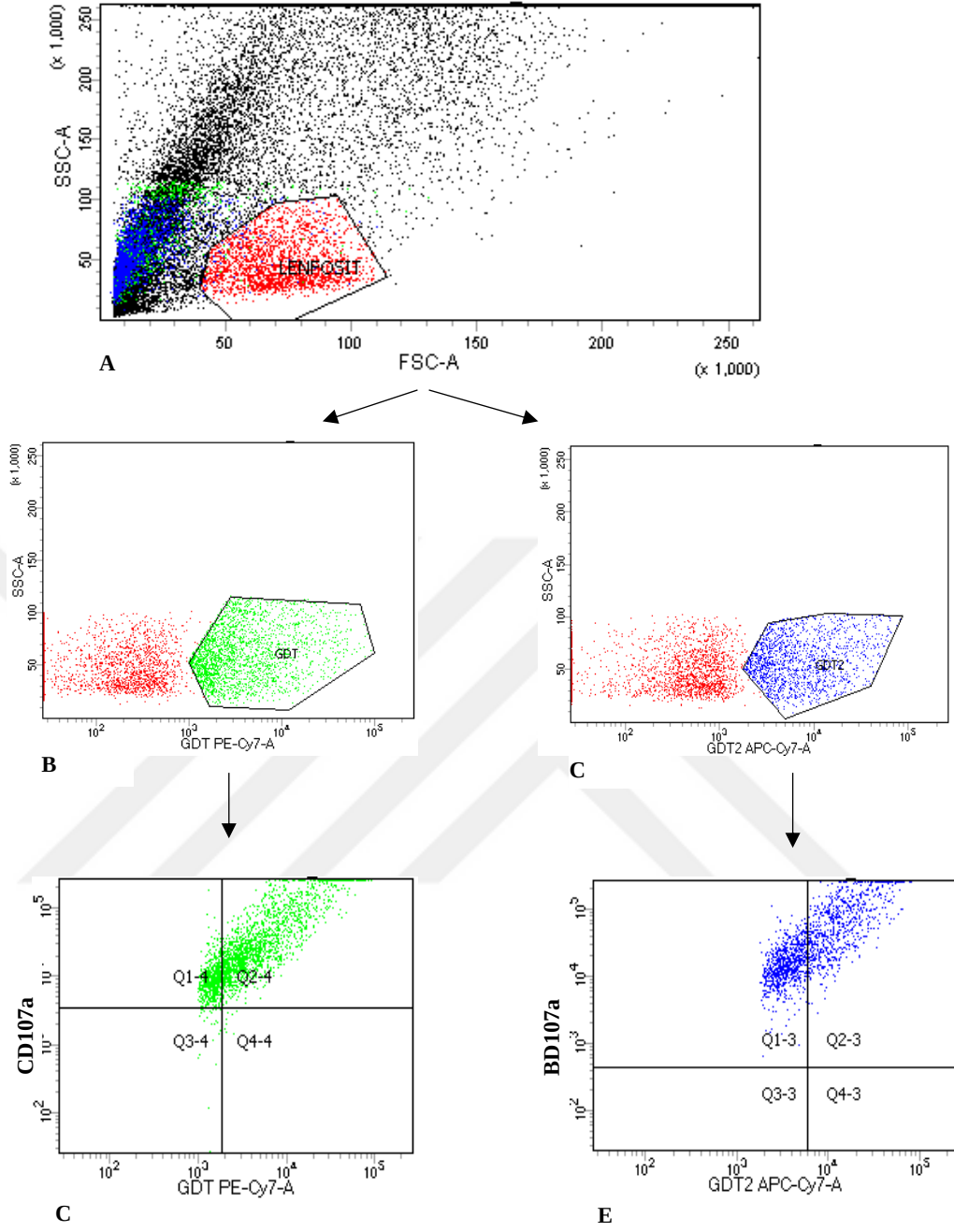
Şekil 3.2. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri; A) Morfolojik lenfosit kapılama, B) Lenfositlerde CD3+ kapılama, C) CD3+ hücrelerde GDT ekspresyonu, D) CD3+ hücrelerde GDT2 ekspresyonu, E) CD3+ hücrelerde CD4 ve CD8 ekspresyonu, F) Lenfositlerde GDT kapılama, G) GDT+ hücrelerde CD4 ve CD8 ekspresyonu



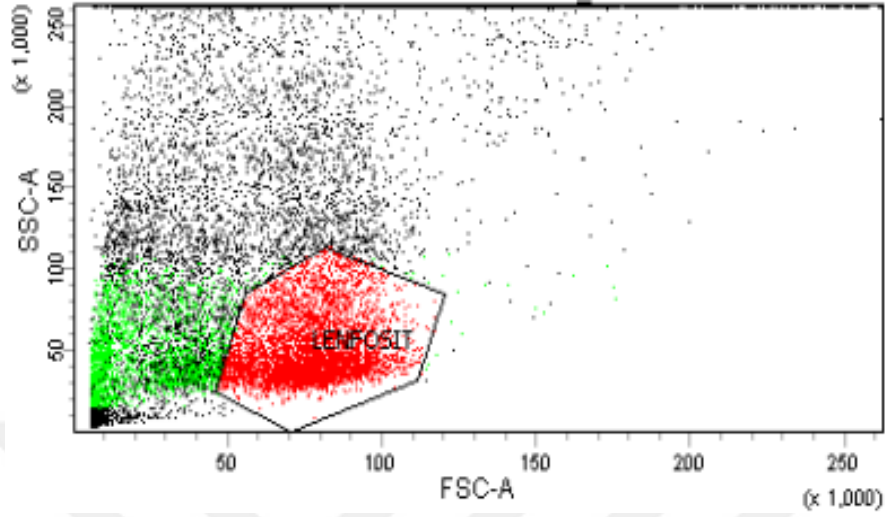
Şekil 3.3. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı); A) Morfolojik lenfosit kapılama, B) Lenfosit kapısındaki hücrelerde GDT kapılama, C) Lenfosit kapısındaki hücrelerde GDT2 kapılama, D) GDT kapısı içerisinde CD45RA ve CD27 ekspresyonları, E) GDT2 kapısı içerisinde CD45RA ve CD27 ekspresyonları



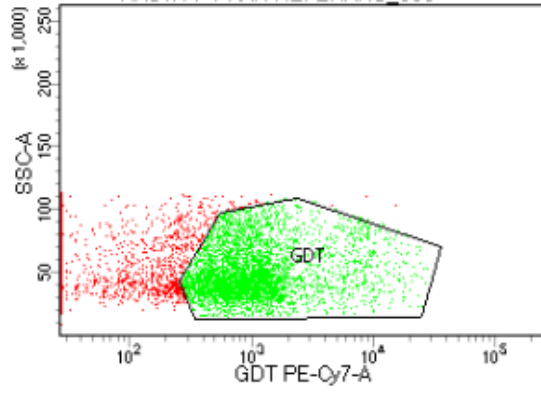
Şekil 3.4. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı); A) Morfolojik lenfosit kapılama, B) Lenfosit kapısındaki hücrelerde GDT kapılama, C) Lenfosit kapısındaki hücrelerde GDT2 kapılama, D) GDT içerisinde NKG2D ekspresyonu, E) GDT2 içerisinde NKG2D ekspresyonu, F) GDT içerisinde HLADR ekspresyonu, G) GDT2 içerisinde HLADR ekspresyonu



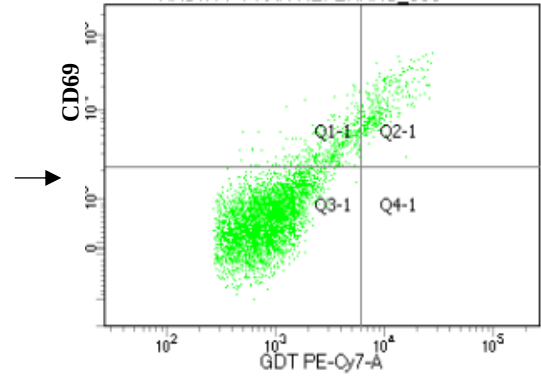
Şekil 3.5. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı); A) Morfolojik lenfosit kapılama, B) Lenfosit kapısındaki hücrelerde GDT kapılama, C) Lenfosit kapısındaki hücrelerde GDT2 kapılama, D) GDT ve CD107a ekspresyonu, E) GDT2 ve CD107a ekspresyonu



A



B



C

Şekil 3.6. Endoservikal sitobrush akım sitometri analizi kapılama stratejileri (devamı);) A) Morfolojik lenfosit kapılama, B) Lenfosit kapısındaki hücrelerde GDT kapılama, C) GDT ve CD 69 ekspresyonu

3.6. İstatistiksel Analiz

Veriler IBM SPSS Statistics 18 © Copyright SPSS Inc. 1989, 2010 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmanın örneklem kütlesi 30'un altında olduğu için normallik testi yapılmamıştır. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkilerin analizinde Pearson ki-kare testi, Fisher's Exact Test kullanılmıştır. Bağımsız iki grup sürekli değişkenlerinin karşılaştırmasında ise Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Çalışmada istatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

Menopoz durumuna göre hastalar postmenopoz ve premenopoz gruplarına ayrılmıştır. Bu grupların yaş ve parite değişkenleri çerçevesinde birbirinden istatistiki açıdan anlamlı farklılıklar içerdiği görülmüştür ($p<0,05$). Postmenopoz grubundaki hastaların ortalama yaş değerleri 49 (47-54) yaş, premenopoz grubundaki hastaların ortalama yaş değerleri ise 41 (37,5-42,5) yaş olarak hesaplanmıştır. Buna göre, bu iki grup arasında anlamlı farklılık vardır ($p<0,001$). Parite değişkenine ilişkin dağılımlar incelendiğinde postmenopoz grubunda 3 (2-3) olarak görülen ortalama değer premenopoz grubunda 2 (1-2) olarak hesaplandığı anlaşılmaktadır. Söz konusu farklılık istatistiki açıdan anlamlıdır ($p=0,011$). **Tablo 4.1.**'de görülen gravida, sigara kullanımı, alkol kullanımı ve ek hastalık değişkenlerinde ise iki grup benzer dağılımlar göstermiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.1. Menopoz durumlarına göre hasta özellikleri I

Değişkenler	Menopoz Durumu		<i>p</i>
	Postmenopoz (n=13)	Premenopoz (n=16)	
Yaş (Yıl)	49(47-54)	41(37,5-42,5)	<0,001^u
Gravida	3(2-3)	2(1-3)	0,103 ^u
Parite	3(2-3)	2(1-2)	0,011^u
Sigara Kullanımı			0,697*
Var	3(23,1)	5(31,2)	
Yok	10(76,9)	11(68,8)	
Alkol Kullanımı			0,667*
Var	4(30,8)	3(18,8)	
Yok	9(69,2)	13(81,2)	
Ek hastalık			0,698*
Var	5(38,5)	4(25)	
Yok	8(61,5)	12(75)	

^uMann Whitney U test, *Med(IQR)*

*Pearson Ki-kare, Fisher exact test, *n(%)*

Tablo 4.2.'de iki grup arasında ırk, eğitim düzeyi, aktif cinsel hayat ve partner sayısı değişkenleri çerçevesinde yapılan analizlerin sonuçları yer almaktadır. Bu değişkenler postmenopoz ve premenopoz grupları benzer dağılım sergilemiştir.

Tablo 4.2. Menopoz durumlarına göre hasta özellikleri II

Değişkenler	Menopoz Durumu		<i>p</i> *
	Postmenopoz (n=13)	Premenopoz (n=16)	
İrk			na
Beyaz	13(100)	16(100)	
Diğer	0(0)	0(0)	
Eğitim Düzeyi			0,474
Lise ve altı	9(69,2)	9(56,2)	
Üniversite mezunu	4(30,8)	7(43,8)	
Aktif Cinsel Hayat			na
Var	13(100)	16(100)	
Yok	0(0)	0(0)	
Partner Sayısı			na
1	13(100)	16(100)	
1'den fazla	0(0)	0(0)	
Medeni Durum			na
Evli	13(100)	16(100)	
Bekar	0(0)	0(0)	

*Pearson Ki-kare, *n*(%)

na=not applicable

Tablo 4.3.'te postmenopoz ve premenopoz gruplarının endoservikal sitobrushlar ile alınan örnekleri akım sitometri cihazında lenfosit alt popülasyonları açısından incelenmiş ve sonuçlar % cinsinden belirtilmiştir. Gruplar arası farklılık gösterip göstermediklerine ilişkin yapılan analizlerin sonuçlarına bakıldığında, bu gruptaki değişkenlerin tamamı iki grup açısından benzer değerler almıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.3. Menopoz durumuna göre laboratuvar bulguları I

Değişkenler	Menopoz Durumu		p^u
	Postmenopoz (n=13)	Premenopoz (n=16)	
CD3+ yüzdesi	1(0,5-2,2)	1,65(0,6-3,25)	0,323
CD3+CD4+ T Lenfosit Yüzdesi	36,4(12,6-45,7)	27,1(12,4-43,05)	0,792
CD3+CD8+ T Lenfosit Yüzdesi	19,6(15-23,8)	21,35(16,3-32,5)	0,456
CD3+CD4+CD8+ T Lenfosit Yüzdesi	22,8(14,2-36,5)	20,8(5,6-29,75)	0,236
CD3+CD4-CD8- T Lenfosit Yüzdesi	12(8,7-25,2)	16,8(12,7-31,05)	0,196
GDT Yüzdesi	11,8(6,8-14,2)	14,9(8,75-25,3)	0,254
GDT1 Yüzdesi	8,90(4,90-12,60)	9,90(5,30-15,65)	0,256
GDT2 Yüzdesi	1,8(0,8-3)	3,4(1,35-6,15)	0,263
GDT1/2 Oranı	4,94(1,98-7,26)	2,78(1,5-9,73)	0,629
GDT+CD4+ Yüzdesi	5,5(5,2-7,4)	7,35(3,9-11,65)	0,392
GDT+CD8+ Yüzdesi	1,9(0,9-5)	2,85(1,85-4,85)	0,335
GDT+CD4+CD8+ Yüzdesi	6,8(3,2-10,9)	8(4,45-14,15)	0,693
GDT+ CD4-CD8- Yüzdesi	84,8(78,3-88,5)	77,85(72,2-90,75)	0,369

^uMann Whitney U test, *Med(IQR)*

Tablo 4.4.'te yer alan analiz sonuçlarına göre postmenopoz grubundaki hastalar ile premenopoz grubundaki hastalar arasında GDT, CD45RA, CD27 değişkenleri çerçevesinde istatistiki açıdan anlamlı herhangi bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Buna göre söz konusu iki grup bu değişkenler çerçevesinde benzerdir.

Tablo 4.4. Menopoz durumuna göre laboratuvar bulguları II

Değişkenler	Menopoz Durumu		p^u
	Postmenopoz (n=13)	Premenopoz (n=16)	
GDT+CD45RA+CD27-	0,1(0-0,1)	0,15(0-0,35)	0,423
GDT+CD27+CD45RA-	18,1(7,1-25,9)	19(7-47,35)	0,524
GDT+CD45RA+CD27+	0,3(0-0,5)	0,2(0-0,45)	0,503
GDT+CD45RA-CD27-	81,9(73,8-92,6)	80,3(51-92,5)	0,569
GDT2+CD45RA+CD27-	0(0-0,1)	0,05(0-0,3)	0,580
GDT2+CD27+CD45RA-	17,6(10-26,8)	25,15(15,65-53,15)	0,188
GDT2+CD45RA+CD27+	0,4(0,1-0,8)	0,25(0,05-0,65)	0,465
GDT2+CD45RA-CD27-	82,4(56,6-88,9)	74,6(46,45-83,65)	0,228

^uMann Whitney U test, *Med(IQR)*

Tablo 4.5.'te GDT+HLADR+, GDT+NKG2D+, GDT+CD107a+ ve GDT2+CD107a+ değişkenlerine ilişkin ortalanca değerler postmenopoz ve premenopoz grupları arasında anlamlı farklılıklar göstermektedir. GDT+HLADR+ değişkeni için, postmenopoz grubunda 30,3 (12,1-38,1) olarak hesaplanan ortalanca değer, premenopoz grubunda 14,65 (4,05-21,65)'dir. Bu değerlere göre iki grup arasındaki farklılık anlamlıdır ($p=0,023$). Postmenopoz grubundaki ortalanca değeri (47,5 (28,4-51,8)), premenopoz grubuna (22,1 (18,5-34,7)) göre daha yüksek olan

GDT+NKG2D+ değişkenindeki bu farklılık da anlamlıdır ($p=0,019$). Anlamlı farklılığın görüldüğü diğer bir değişken olan GDT+CD107a+ ($p=0,020$) incelendiğinde, premenopoz grubundaki ortalanca değerin postmenopoz grubuna göre yüksek olduğu anlaşılmıştır. Benzer şekilde, GDT2+CD107a+ değişkeninde de premenopoz grubundaki hastaların ortalanca değerleri postmenopoz grubundaki hastaların değerlerine göre daha yüksektir. Söz konusu farklılık istatistiki açıdan anlamlıdır ($p=0,020$). **Tablo 4.5.**'te yer alan diğer değişkenler kapsamında iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.5. Menopoz durumuna göre laboratuvar bulguları III

Değişkenler	Menopoz Durumu		p^u
	Postmenopoz (n=13)	Premenopoz (n=16)	
GDT+HLADR+	30,3(12,1-38,1)	14,65(4,05-21,65)	0,023
GDT+NKG2D+	47,5(28,4-51,8)	22,1(18,5-34,7)	0,019
GDT2+HLADR+	18,9(7,2-27)	12,65(3,35-24,95)	0,456
GDT2+ NKG2D+	64(43,3-71,4)	41,95(32,45-56,2)	0,072
GDT+CD107a+	59,1(38,3-71,3)	79,1(60,7-87,1)	0,020
GDT2+CD107a+	28,8(23,1-40,2)	43,4(35,1-61,25)	0,020
GDT+CD69+	5,5(1,8-19)	7,65(2,35-19,65)	0,629

^uMann Whitney U test, *Med(IQR)*

5. TARTIŞMA

Biz bu çalışmamızda, sağlıklı kadınlarda menopoş öncesi dönem ile menopoş sonrası dönem arasında endoservikal kanal immünitesinde görev alan özellikle GDT hücrelerinin fenotipik dağılımında ve aktivite ile ilişkili yüzey markerlarında farklılık bulmayı amaçladık. Hastalarımız gruplara; gravida, vücut kitle indeksi, sigara-alkol kullanımı, ek hastalık, eğitim düzeyi, ırk, medeni durum ve partner sayısı açısından eşit dağılım göstermiştir.

Çalışmamızda, karşılaştırma gruplarının yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark (41 vs 49) ($p. <0,001^u$) bulunmuş olsa da gruplar arasında belirgin yaş farkı olmayışı ve çalışmadaki hasta sayısının az oluşu nedeniyle bazı bulgularda literatürle uyumlu sonuçlar olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Mukozal dokularda GDT1 hücrelerin periferik kanda ise GDT2 hücrelerin baskın olduğu bilinmektedir (76). Tuero ve arkadaşlarının SIV ile enfekte olan ve olmayan makaklar ile GDT hücreleri üzerine yaptıkları çalışmada, endoservikal kanal dokusunda enfekte makaklarda GDT1/2 oranında anlamlı olmayan bir artış izlenmiştir(60). HPV persistansında endoservikal immünitenin araştırıldığı bir çalışmada, persistans HPV grubunda GDT2 hücrelerinin arttığı ve GDT1 hücrelerinin azaldığı saptanmıştır. GDT1/2 oranı da GDT1 ve GDT2 hücrelerindeki fark nedeniyle beklendiği üzere HPV klerensi grubunda daha yüksek olmakla birlikte, iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır(77). Zhao ve arkadaşlarının çalışmasını(76) destekleyecek şekilde çalışmamızda, hastalardan alınan endoservikal kanal sitobrush incelemesinde premenopozal dönemde GDT1+ hücre yüzdesi, GDT2+ hücre yüzdesinden fazla bulunmuştur (%9,9 vs 3,4) ($p. 0,007$), postmenopoz döneminde de aynı şekilde GDT1+ hücre yüzdesi GDT2+ hücre yüzdesinden fazla (%8,9 vs 1,8) ($p. 0,001$) bulunmuştur, sonuçlarımız istatistiki olarak anlamlı ve literatürle uyumlu gelmiştir. Premenopozal dönemde GDT 1/2 oranı 2,78, postmenopozal dönemde GDT 1/2 oranı 4,94 bulunmuştur ($p.0,629$),

istatistiki olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. GDT1 VE GDT2 hücre yüzdeleri postmenopozal dönemde literatürle uyumlu olarak azalmıştır. Ayrıca postmenopozal dönem GDT 2 hücre yüzdesindeki belirgin azalma sebebiyle bu dönemde GDT1/2 oranında artış izlendiği düşünülmüştür.

JC Andreu-Ballester ve arkadaşlarının, insan patolojisindeki çalışmalar için geçerli referans değerleri elde etmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, sağlıklı deneklerden oluşan bir popülasyonda periferik kan $\alpha\beta$ ve $\gamma\delta$ toplam T lenfositlerini ve bunların alt kümelerini farklı yaşlar için karşılaştırmışlardır. Yaşlı deneklerde CD3+, CD3+CD4+ ve CD3+ $\gamma\delta$ T hücrelerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir (78). Bizim çalışmamızda endoservikal kanalda aynı hücreler karşılaştırılmış ve postmenopozal dönemde premenopozal döneme göre sayısal olarak CD3+ hücre yüzdesinde azalma (1 vs 1,65) (p . 0.323), CD3+GDT+ hücre yüzdesinde azalma (23,7 vs 30,4) (p . 0,254) izlenirken, CD3+CD4+ hücre yüzdesinde ise bir miktar artma (36,4 vs 27,1) (p . 0,792) izlenmiştir. Ancak anlamlı farklılık saptanmamıştır, istatistiki olarak bu veriler her iki grupta benzer bulunmuştur.

Iskra Tuero ve arkadaşlarının rhesus makaklarının kan, rektum ve dişi üreme sistemi üzerinde yaptığı çalışmada, GDT hücrelerinin SIV enfeksiyonunun kontrolüne katkıda bulunup bulunmadığı araştırılmıştır(60). SIV ile enfekte olan ve olmayan örneklerin karşılaştırıldığı çalışmanın sonuçlarında; dişi üreme sisteminde endoservikal kanalda GDT1 hücreleri GDT2 hücrelerinden fazla bulunmuştur, GDT1 ve GDT2 CD8+ ve CD4- CD8-T hücresi alt gruplarının frekansları mukozal dokularda benzer ve az sayıda CD4⁺ ve CD4⁺ CD8⁺ hücresi gözlemlenmiştir. SIV ile enfekte grupta enfekte olmayan gruba göre GDT1+CD8+ ve GDT2+CD8+ hücrelerinde artış gözlenmiştir. Ayrıca CD69'un ve aktive edici NK reseptörü NKG2D'nin ekspresyonunu inceleyerek aktivasyon durumunu araştırdıkları ve sonuçlarda GDT1+ NKG2D+ hücrelerin SIV ile enfekte grupta enfekte olmayan gruba göre daha fazla olduğu, GDT+CD69+ hücrelerin yine SIV ile enfekte grupta enfekte olmayan gruba göre daha fazla olduğu izlenmiştir. SIV ile enfekte gruptaki hücrelerde GDT+CD107a+ ve GDT2+CD107a+ hücreler enfekte olmayan gruba

göre daha yüksek yüzdede izlenmiştir. Ayrıca yine bu çalışmada kronik viral enfeksiyon sürecinde; kanda GDT yüzdesi, GDT1+CD4+, GDT2+CD8+, GDT2+NKG2D+ hücre yüzdelерinin azaldığı ve endoservikal kanalda GDT2+ ve GDT2+CD8+ hücrelerinin azaldığı saptanmıştır (60). Bizim çalışmamızda daha önce de belirttiğimiz gibi endoservikal kanalda premenopozal ve postmenopozal dönemlerde, literatürle uyumlu olarak GDT1 hücreleri GDT2 hücrelerinden fazla bulunmuştur. GDT+CD4+CD8- hücre yüzdesi, GDT+CD8+CD4- hücre yüzdesi ve GDT+CD4+CD8+ hücre yüzdesi premenopoz döneminde postmenopozla göre bir miktar daha yüksek bulunmuştur ancak her iki grup arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır, sonuçlar benzerdir. İstatistiksel olarak anlamlı sonuç alınamamasının nedeni daha önce belirttiğimiz gibi hasta sayısının az oluşu ve hasta yaşlarının birbirine yakın oluşu ile ilişkili olabilir. Literatürde de belirtildiği gibi (47), bizim çalışmamızın sonuçlarında da bu hücrelerin büyük çoğunluğunu her iki grupta da GDT+CD4-CD8- hücreleri oluşturmuştur ve iki grup arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Çalışmamızın bir başka sonucunda GDT+CD69+ hücre yüzdesinin postmenopoz döneminde azalma eğiliminde olduğu (7,65 vs 5,5) ($p = 0,629$) izlenmiştir ancak istatistiki olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

CD107a, NK hücrelerinin litik granüllerinin içinde bulunur ve litik granüller salındıkça NK hücre yüzeyinde artış gösterir. Bu nedenle, CD107a tahlili, çoğu durumda sitotoksitenin iyi bir göstergesi olan NK hücre degranülasyonunun bir ölçüsüdür(70). Çalışmamızın sonuçlarında GDT+CD107a+ ve GDT2+CD107a+ hücre yüzdelерinde postmenopoz döneminde anlamlı azalma (sırayla (79,1 vs 59,1) ($p = 0,020$), (43,4 vs 28,8) ($p = 0,020$)) izlenmiştir. Bu anlamlı istatistiksel sonuç yaşla birlikte endoservikal kanal immünotesinde rol alan hücrelerin sitotoksiste özelliğinin azaldığını göstermiştir. Servikal immünotesindeki bu değişim, yaşlanma ile artan kronik enfeksiyon ve kanser riskinin sebeplerinden biri sayılabilir.

GDT hücreleri, bir efektör hafıza (T_{EM}) veya terminal olarak farklılaşmış efektör hafıza (T_{EMRA}) durumuna doğru farklılaştıklarında tükenmeye yatkındır. T

hücreleri, tümörün tanınması dahil aktivasyon sinyallerine ve stimülasyona yanıt olarak daha fazla T_{EM} ve T_{EMRA} durumuna ilerler. GDT hücrelerinin bellek durumları CD45RA ve CD27'nin yanı sıra birkaç lenf nodu reseptörünün ekspresyonu ile tanımlanmıştır. Stimülasyondan sonra, naif $\gamma\delta$ T hücreleri çoğunlukla periferik kanda bulunan bir CD45RA-CD27+ merkezi bellek (TCM) durumuna ilerler. İnsan yaşlanma çalışmalarında, CD27, CD45RA ve CD57 gibi çeşitli fenotipik belirteçlerdeki farklılaşma incelenir. Farklılaşmanın dört aşaması vardır: Saf CD45RA+CD27+, Merkezi bellek CD45RA-CD27+, Efektör bellek CD45RA-CD27- (T_{EM}) ve son olarak, Terminal efektörü CD45RA+CD27- T hücreleri (T_{EMRA}). Terminal efektörü genellikle yaşlanma işaretçisini ifade eder(39). Tümör nekroz faktörü reseptörü aile üyesi CD27, bir T hücresi uyarıcı molekülü olarak bilinir. CD27'yi kodlayan genin silinmesinin etkileri, gecikmeli yanıt kinetiği ve T hücre belleği üzerinde oldukça etkili sonuçlara neden olmuştur (79). T_{EMRA} GDT hücreleri, tümör hücrelerine karşı güçlü sitotoksikite gösterse de tümör antijenleri tarafından aşırı derecede yeniden uyarıldıklarında kısa sürede tükenirler (80, 81, 82). Tükenmiş T hücreleri, yalnızca çoğalma ve kendini yenileme yeteneğini kaybetmekle kalmaz, aynı zamanda anti-tümör fonksiyonlarını da zayıflatır (83) Bizim çalışmamızın sonucu göstermiştir ki endoservikal dokuda GDT+CD45RA+CD27-, GDT2+CD45RA+CD27- hücrelerin yüzdesi oldukça az sayıdadır ve premenopoz/postmenopoz dönemler arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. GDT2+CD27+CD45RA- (merkezi bellek) hücrelerin yüzdesinde postmenopoz döneminde bir miktar azalma (25,15 vs 17,6) (p . 0,188) izlenmiştir ancak istatistiki olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Ayrıca karşılaştırılan her iki grupta da GDT ve GDT2 hücrelerin endoservikal kanalda büyük çoğunluğu CD45RA-CD27- (T_{EM}) izlenmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda her iki grupta CD45RA+ CD27- (T_{EMRA}) hücre yüzdesi oldukça azdır fakat CD45-CD27- (T_{EM}) hücre yüzdesi postmenopozal dönemde bir miktar istatistiksel olarak anlamlı olmayan artış göstermekte ve oldukça fazla sayıdadır. Bu sonuçlar T hücrelerinin yaşla birlikte tükenme eğiliminin arttığını göstermiştir.

Gamma-delta T hücreleri antitümör bağışıklığında önemli görevler alırlar. D. Lee ve arkadaşlarının, insan GDT hücrelerinin, farklı alt kümelerinin benzersiz özelliklerini ve antitümör özelliklerini özetlediği makalede; GDT2 hücrelerinin, NKG2D hücrelerini eksprese ettiği ve doğrudan sitotoksitesini arttırdığı belirtilmiştir. GDT hücreleri TLR sinyali yoluyla DC'leri aktive ederken birlikte aktive olurlar, bu da CD25 ve CD69 ekspresyonunun yanı sıra inflamatuvar sitokinlerin üretiminin artmasına yol açar. GDT2+ hücreleri, GDT1+ hücrelerinden daha fazla ve güçlü IFN- γ üretimine sahiptir (84). Tümörle ilişkili antijenlerin $\gamma\delta$ TCR tarafından tanınması, NKG2D reseptörünün de aralarında bulunduğu yardımcı uyarıcı reseptörlerin ekspresyonunu güçlendirmiştir(85). NKG2D ilişkili aktivasyon, V γ 9V δ 2 T hücrelerinde gösterilmiştir(86). NKG2DL genellikle sağlıklı dokularda ifade edilmez ve bununla birlikte DNA hasarı, enfeksiyon ve hücre transformasyonu üzerine yukarı regüle edilebilir, bu nedenle karsinomlarda yaygın olarak saptanır ve antikanser tedavi stratejilerinde önemli bir görev alır(87, 88, 89). 2020'de Ang ve arkadaşları V γ 9V δ 2 T hücrelerini Zometa/IL-2 ile ekspanse etti ve hücreleri mRNA elektroporasyonu kullanarak NKG2D'nin hücre dışı alanına dayalı bir CAR (kimerik antijen reseptörü) ile tasarladı. Bu çalışmada, NKG2DL CAR- $\gamma\delta$ T hücrelerinin, Zometa tedavisine dirençli olanlar da dahil olmak üzere çok sayıda solid tümör hücre dizisini in vitro olarak öldürme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, daha önce kolon tümörleri veya over tümörlerinin intraperitoneal olarak enjekte edildiği farelerde klinik öncesi çalışmalar yürütülmüş ve NKG2DL CAR- $\gamma\delta$ T hücrelerinin farelerde tümör gerilemesine neden olduğunu ve her iki tümör modelinde de hayatta kalma sürelerini uzattığını göstermişlerdir (90). Bizim çalışmamızın sonucunda GDT+ NKG2D+ hücrelerin yüzdesi postmenopoz hastalarda premenopoz hastalara göre anlamlı artış (47,5 vs 22,1) (p . 0,019) göstermiştir. Daha önce NK hücreleri anlatırken de belirttiğimiz gibi menopozla birlikte NK hücre sayısında artış görülür fakat sitotoksite özellikleri azalmıştır. Yaşla birlikte azalan sitotoksitenin immün sistem kaynaklı artan servikal hastalıkların sebeplerinden biri olduğu bilinmektedir (11). Bizim çalışmamızın sonucunda GDT+NKG2D+ hücre yüzdesi postmenopozal grupta

artış göstermiştir ancak bu durumu artan sitotoksite olarak yorumlayamayacağımız için artmış GDT+NKG2D+ hücre yüzdesinin immüniteye etkisi ileri incelemelerle araştırılmalıdır.

GDT hücrelerinin ve TCR'lerin bağışıklık yanıtındaki doğal ve adaptif rolleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. $\gamma\delta$ TCR dinamikleri üzerine yapılan son araştırmalar, viral enfeksiyon sırasında bireysel GDT1 + hücre klonlarının büyük ölçüde genişlediğini göstermiştir. Bu tür bir genişlemenin rastgele mi yoksa gerçekten TCR'ye bağlı adaptif bağışıklık tepkilerini mi temsil ettiğini anlamak için, bunların aynı kökenli TCR ligandları hakkında bilgi gereklidir. TCR'nin MHC II kompleksinin hedef hücreyi tanınması için HLA-DR ile doğrudan etkileşimi olduğu gösterilmiştir. MHC II, interferon- γ tarafından güçlü bir şekilde up regüle edildiğinden, bu sonuçlar, GDT hücrelerinin enflamasyonun neden olduğu MHC'ye bağımlı bir bağışıklık tepkisi olduğunu düşündürmüştür (91). Yapılan başka bir çalışmada yaşla birlikte timik kitle kaybı oluşumunun meydana geldiği ve CD3+ HLADR+ fenotipli aktive T lenfositlerin sayısı artış gösterdiği belirtilmiştir (92). Hücre yüzeyinde artan HLA-DR'nin, genellikle stimülasyona yanıt olarak ortaya çıktığı ve bu nedenle HLA-DR'nin, aynı zamanda immün stimülasyon için bir belirteç olduğu gösterilmiştir(43). Bizim çalışmamızın sonucunda da GDT+HLADR+ hücrelerinin yüzdesi postmenopozal dönemde premenopaz grubuna göre anlamlı artış (30,3 vs 14,65) ($p = 0,023$) göstermiştir. Bu sonuç yaşla birlikte servikte artmış immün stimülasyonu göstermektedir. Transplantasyon öncesinde alıcı ve verici arasında HLA doku gruplarının belirlenmesi, antijenik yapılarının karşılaştırılmasında kullanılır. Çalışmamız, yaşla birlikte HLA-DR hücre yüzdesindeki bu değişimin gelişen aşı, kanser tedavisi ve organ nakli uygulamalarında dikkate alınması gereken oldukça önemli bir sonuç olduğunu göstermiştir.

Cimini ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, kronik HIV enfeksiyonunda primer enfeksiyona göre mukozal GDT1 ve GDT2 hücrelerinin fonksiyonel kabiliyetlerinin kaybolduğu ve sürekli antijenik stimülasyonun indüklediği

tükenme mekanizmalarının ortaya çıktığını belirtmişlerdir (61). Bizim çalışmamızın sonucunda postmenopozal dönemde GDT1 ve GDT2 hücre yüzdesi azalmıştır. Bu sonuç servikal mukozal bağışıklıkta yaşla birlikte azalma olabileceğini ve kişilerin enfeksiyon, kanser gibi durumların gelişimine yatkınlığının artabileceğini göstermiştir.

Tüm bu sonuçlar ele alındığında, teknolojik araştırmalar ve tedavi gelişim süreçlerinde, gruplar arasında değişen hücre sayılarının yanında postmenopoz hastalarda yıllar içinde geçirilen kronik enfeksiyon gibi süreçlerin daha fazla oranda olmuş olabileceği ve buna bağlı olarak hücrelerin fonksiyonel kabiliyetlerinin de azalmış olabileceği akılda bulundurulmalıdır. Çalışmamızda, karşılaştırma gruplarının yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olsa da gruplar arasında belirgin yaş farkı olmayışı ve gruplardaki hasta sayısının az oluşu nedeniyle bazı bulgularda literatürle uyumlu sonuçlar olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bu durum bize, aynı çalışmanın daha geniş bir hasta popülasyonunda uygulanmış olsa istatistiksel olarak anlamlı sonuçların daha fazla olacağını düşündürmüştür.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızın ışığında, serviks kanseri ve servikal hastalıklara yol açabilecek durumların 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 kadın genital sistem enfeksiyonları ve serviks kanseri gibi hastalıkların kimlerde daha fazla görülebileceği, hangi hastaların servikal immünitesi değerlendirildiğinde hastalığa yakalanma açısından daha yüksek riskli olacağı tespit edilebilecek, daha yakın tarama ve takip ile bu kişiler enfeksiyonlardan ve kanserden korunabileceklerdir. Gelişen teknolojilerle ve çalışmalarla birlikte yaş, kronik enfeksiyonlar gibi nedenlerle oluşan GDT hücre kaybı yerine konularak tedavi yapılabilecektir. Bu çalışma, özellikle servikal immünitesi zayıf hastaları öngörmede bazı immün markerların önemli olabileceğini göstermesi açısından da önem arz etmektedir.

7. ÖZET

Amaç: Bu çalışmada premenopoz ve postmenopoz dönemdeki sağlıklı iki grup arasında endoservikal intraepitelyal gamma-delta T lenfosit popülasyonlarının ve ilişkili biyomarkerların akım sitometri analizlerinde farklılık olup olmadığı araştırılmak istenmiştir.

Yöntem: Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, kadın hastalıkları ve doğum polikliniğine başvuran 30-65 yaş aralığında, son 5 yıl içerisinde HPV ve smear taraması normal olan, daha önce servikal prekanseröz lezyon öyküsü olmayan, vücudunun başka bir bölümünde tespit edilen malignite öyküsü olmayan 16 premenopoz ve 13 postmenopoz toplam 29 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastalardan alınan endoservikal sitobrush örnekleri akım sitometri cihazında immünfenotiplendirme analizine tabi tutulduktan sonra lenfosit yüzdeleri, fenotipleri ve ilişkili biyomarkerlar karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Endoservikal kanal sitobrush incelemesinde premenopozal dönemde GDT1+ hücre yüzdesi GDT2+ hücre yüzdesinden daha fazla bulunmuştur (%9,9 vs 3,4) ($p = 0,07$), postmenopoz döneminde de aynı şekilde GDT1+ hücre yüzdesi GDT2+ hücre yüzdesinden daha fazla (%8,9 vs 1,8) ($p = 0,01$) bulunmuştur. GDT+CD107a+ ve GDT2+CD107a+ hücre yüzdelерinde postmenopoz döneminde anlamlı azalma (sırayla (79,1 vs 59,1) ($p = 0,020$), (43,4 vs 28,8) ($p = 0,020$) izlenmiştir. GDT+NKG2D+ hücrelerin yüzdesi postmenopoz hastalarda premenopoz hastalara göre anlamlı artış (47,5 vs 22,1) ($p = 0,019$) göstermektedir. GDT+HLADR+ hücrelerin yüzdesi postmenopozal dönemde premenopaz grubuna göre anlamlı artış (30,3 vs 14,65) ($p = 0,023$) göstermektedir.

Sonuç: Menopoz öncesi ve sonrası dönemde servikal immünitede farklılıklar vardır. Endoservikal mukozada GDT hücreleri arasında GDT1 hücrelerin baskın olduğu ve CD107a, NKG2D, HLADR alt gruplarında menopoz sonrası artış olduğu izlenmektedir.

Anahtar Kelimeler: T lenfosit, servikal karsinogenez, gamma-delta t hücresi

8.ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to investigate whether there is a difference in flow cytometry analyzes of endocervical intraepithelial gamma delta T lymphocyte populations and related biomarkers between two healthy premenopausal and postmenopausal groups.

Method: 16 premenopausal and 13 postmenopausal women who applied to Akdeniz University Faculty of Medicine, obstetrics and gynecology outpatient clinic, aged 30-65, had normal HPV and smear scan in the last 5 years, had no previous history of cervical precancerous lesions, had no history of malignancy detected in another part of the body. A total of 29 patients were included in the study. After the endocervical cytobrush samples taken from these patients were subjected to immunophenotyping analysis in a flow cytometry device, lymphocyte percentages and phenotypes and related biomarkers were compared.

Results: In the endocervical canal cytobrush examination, the percentage of GDT1+ cells in the premenopausal period was found to be higher than the percentage of GDT2+ cells (9.9 vs 3.4%) (p. 0.07), and in the postmenopausal period, the percentage of GDT1+ cells was found to be higher than the percentage of GDT2+ cells (8.9 vs 1.8%) (p. 0.01). GDT+CD107a+ and GDT2+CD107a+ cell percentages decreased significantly during postmenopause (respectively (79.1 vs 59.1) (p. 0.020), (43.4 vs 28.8) (p. 0.020). The percentage of GDT+NKG2D+ cells in postmenopausal patients shows a significant increase (47.5 vs 22.1) compared to premenopausal patients (p. 0.019). The percentage of GDT+HLADR+ cells shows a significant increase (30.3 vs 14.65) in the postmenopausal period compared to the premenopase group (p. 0.023).

Conclusion: There are differences in cervical immunity in the period before and after menopause. It is observed that GDT1 cells predominate among GDT cells in the endocervical mucosa and there is a postmenopausal increase in CD107a, NKG2D, HLADR subgroups.

Key words: T lymphocyte, cervical carcinogenesis, gamma delta t cell

9.KAYNAKLAR

1. Rodriguez-Garcia M, Patel MV, Shen Z, Wira CR. The impact of aging on innate and adaptive immunity in the human female genital tract. *Aging Cell*. 2021;20(5):e13361.
2. Rodriguez-Garcia M, Shen Z, Fortier JM, Wira CR. Differential Cytotoxic Function of Resident and Non-resident CD8+ T Cells in the Human Female Reproductive Tract Before and After Menopause. *Front Immunol*. 2020;11:1096.
3. Strbo N, Alcaide ML, Romero L, Bolivar H, Jones D, Podack ER, et al. Loss of Intra-Epithelial Endocervical Gamma Delta (GD) 1 T Cells in HIV-Infected Women. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(2):134-45.
4. Dorshkind K, Swain S. Age-associated declines in immune system development and function: causes, consequences, and reversal. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(4):404-7.
5. Jones HWaJAR. Te Linde's operative gynecology2015.
6. Mayeaux EJatJC. Modern colposcopy textbook and atlas. Lippincott Williams & Wilkins2011.
7. Baggish MS. Colposcopy of the cervix, vagina, and vulva comprehensive textbook. . 2003.
8. Hoffman BL, et al. Williams gynecology2020.
9. Lindeque BG. Management of cervical premalignant lesions. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2005;19(4):545-61.
10. Basu P, Taghavi K, Hu SY, Mogri S, Joshi S. Management of cervical premalignant lesions. *Curr Probl Cancer*. 2018;42(2):129-36.
11. Barrios De Tomasi J, Opata MM, Mowa CN. Immunity in the Cervix: Interphase between Immune and Cervical Epithelial Cells. *J Immunol Res*. 2019;2019:7693183.
12. Agostinis C, Mangogna A, Bossi F, Ricci G, Kishore U, Bulla R. Uterine Immunity and Microbiota: A Shifting Paradigm. *Front Immunol*. 2019;10:2387.

13. Bekhtereva IA, Dorosevich AE. [Histophysiology of epithelial and connective tissue components of the vaginal portion of the uterine cervix]. *Morfologija*. 2009;136(5):90-6.
14. Lee SK, Kim CJ, Kim DJ, Kang JH. Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Netw*. 2015;15(1):16-26.
15. Zhou JZ, Way SS, Chen K. Immunology of the Uterine and Vaginal Mucosae. *Trends Immunol*. 2018;39(4):302-14.
16. Male V, Sharkey A, Masters L, Kennedy PR, Farrell LE, Moffett A. The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire. *Eur J Immunol*. 2011;41(10):3017-27.
17. Zhao Y, Man GCW, Wang J, Liu Y, Kwong J, Zhang T, et al. The identification of endometrial immune cell densities and clustering analysis in the mid-luteal phase as predictor for pregnancy outcomes after IVF-ET treatment. *J Reprod Immunol*. 2021;148:103431.
18. Tang AW, Alfievic Z, Quenby S. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review. *Hum Reprod*. 2011;26(8):1971-80.
19. Darmochwal-Kolarz DA, Kludka-Sternik M, Chmielewski T, Kolarz B, Rolinski J, Leszczynska-Gorzela B, et al. The expressions of CD200 and CD200R molecules on myeloid and lymphoid dendritic cells in pre-eclampsia and normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2012;67(6):474-81.
20. Cappelletti M, Giannelli S, Martinelli A, Cetin I, Colombo E, Calcaterra F, et al. Lack of activation of peripheral blood dendritic cells in human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Placenta*. 2013;34(1):35-41.
21. Arruvito L, Sotelo AI, Billordo A, Fainboim L. A physiological role for inducible FOXP3(+) Treg cells. Lessons from women with reproductive failure. *Clin Immunol*. 2010;136(3):432-41.
22. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007;449(7161):419-26.
23. Della Bella S, Giannelli S, Cozzi V, Signorelli V, Cappelletti M, Cetin I, et al. Incomplete activation of peripheral blood dendritic cells during healthy human pregnancy. *Clin Exp Immunol*. 2011;164(2):180-92.
24. Hudić I, Stray-Pedersen B, Szekeres-Bartho J, Fatušić Z, Dizdarević-Hudić L, Tomić V, et al. Maternal serum progesterone-induced blocking factor (PIBF) in the prediction of preterm birth. *J Reprod Immunol*. 2015;109:36-40.

25. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014;6(237):237ra65.
26. Parnell LA, Briggs CM, Cao B, Delannoy-Bruno O, Schrieffer AE, Mysorekar IU. Microbial communities in placentas from term normal pregnancy exhibit spatially variable profiles. *Sci Rep*. 2017;7(1):11200.
27. Winger EE, Reed JL. Low circulating CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) T regulatory cell levels predict miscarriage risk in newly pregnant women with a history of failure. *Am J Reprod Immunol*. 2011;66(4):320-8.
28. Yan J, Greer JM, Hull R, O'Sullivan JD, Henderson RD, Read SJ, et al. The effect of ageing on human lymphocyte subsets: comparison of males and females. *Immun Ageing*. 2010;7:4.
29. Berek JS. cytokines, lymphokines and immune mediators. 2022.
30. Abraham RS, Aubert G. Flow Cytometry, a Versatile Tool for Diagnosis and Monitoring of Primary Immunodeficiencies. *Clin Vaccine Immunol*. 2016;23(4):254-71.
31. Juno JA, Boily-Larouche G, Lajoie J, Fowke KR. Collection, isolation, and flow cytometric analysis of human endocervical samples. *J Vis Exp*. 2014(89).
32. DENİZ G. FLOW CYTOMETRY AND CLINICAL APPLICATIONS. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci*. 2007.
33. Bertrand JY, Chi NC, Santoso B, Teng S, Stainier DY, Traver D. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature*. 2010;464(7285):108-11.
34. Jon C Aster M, PhD. Normal B and T lymphocyte development 2022.
35. Jennifer Heimall M. The adaptive cellular immune response: T cells and cytokines 2020.
36. Li W, Li G, Zhou W, Wang H, Zheng Y. Effect of Autoimmune Cell Therapy on Immune Cell Content in Patients with COPD: A Randomized Controlled Trial. *Comput Math Methods Med*. 2022;2022:8361665.
37. Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, et al. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:23-45.
38. Ley K, Kansas GS. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(5):325-35.
39. Xu W, Lau ZWX, Fulop T, Larbi A. The Aging of $\gamma\delta$ T Cells. *Cells*. 2020;9(5).

40. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*. 2017;47(6):946-53.
41. Sebastien Viatte M, PhD. Human leukocyte antigens (HLA): A roadmap2022.
42. Solomon S, Pitossi F, Rao MS. Banking on iPSC--is it doable and is it worthwhile. *Stem Cell Rev Rep*. 2015;11(1):1-10.
43. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*. 2010;75(4):291-455.
44. Chen D, Guo Y, Jiang J, Wu P, Zhang T, Wei Q, et al. $\gamma\delta$ T cell exhaustion: Opportunities for intervention. *J Leukoc Biol*. 2022;112(6):1669-76.
45. Garcillán B, Marin AV, Jiménez-Reinoso A, Briones AC, Muñoz-Ruiz M, García-León MJ, et al. $\gamma\delta$ T Lymphocytes in the Diagnosis of Human T Cell Receptor Immunodeficiencies. *Front Immunol*. 2015;6:20.
46. Silva-Santos B, Serre K, Norell H. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(11):683-91.
47. Hayday AC. $[\gamma][\delta]$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:975-1026.
48. Saura-Esteller J, de Jong M, King LA, Ensing E, Winograd B, de Gruijl TD, et al. Gamma Delta T-Cell Based Cancer Immunotherapy: Past-Present-Future. *Front Immunol*. 2022;13:915837.
49. Poggi A, Catellani S, Musso A, Zocchi MR. Gammadelta T lymphocytes producing IFN γ and IL-17 in response to *Candida albicans* or mycobacterial antigens: possible implications for acute and chronic inflammation. *Curr Med Chem*. 2009;16(35):4743-9.
50. Heyborne KD, Cranfill RL, Carding SR, Born WK, O'Brien RL. Characterization of gamma delta T lymphocytes at the maternal-fetal interface. *J Immunol*. 1992;149(9):2872-8.
51. Ito K, Karasawa M, Kawano T, Akasaka T, Koseki H, Akutsu Y, et al. Involvement of decidual Valpha14 NKT cells in abortion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(2):740-4.
52. Huang C, Zeng Y, Tu W. The role of $\gamma\delta$ -T cells during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2017;78(2).

53. Villarrubia N, León F, Bootello A. [T gamma-delta lymphocytes and their role in hypersensitivity processes in the digestive and respiratory mucosa]. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2002;30(5):273-82.
54. Corsale AM, Di Simone M, Lo Presti E, Dieli F, Meraviglia S. $\gamma\delta$ T cells and their clinical application in colon cancer. *Front Immunol*. 2023;14:1098847.
55. Yoshida Y, Nakajima J, Wada H, Kakimi K. $\gamma\delta$ T-cell immunotherapy for lung cancer. *Surg Today*. 2011;41(5):606-11.
56. Coffelt SB, Kabelitz D, Silva-Santos B, Kuball J, Born W, Bank I. Editorial: $\gamma\delta$ T Cells in Cancer. *Front Immunol*. 2020;11:602411.
57. Ryan PL, Sumaria N, Holland CJ, Bradford CM, Izotova N, Grandjean CL, et al. Heterogeneous yet stable V δ 2(+) T-cell profiles define distinct cytotoxic effector potentials in healthy human individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(50):14378-83.
58. Xu W, Monaco G, Wong EH, Tan WLW, Kared H, Simoni Y, et al. Mapping of γ/δ T cells reveals V δ 2+ T cells resistance to senescence. *EBioMedicine*. 2019;39:44-58.
59. Chen M, Hu P, Ling N, Peng H, Lei Y, Hu H, et al. Enhanced functions of peripheral $\gamma\delta$ T cells in chronic hepatitis B infection during interferon α treatment in vivo and in vitro. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120086.
60. Tuero I, Venzon D, Robert-Guroff M. Mucosal and Systemic $\gamma\delta$ + T Cells Associated with Control of Simian Immunodeficiency Virus Infection. *J Immunol*. 2016;197(12).
61. Cimini E, Agrati C, D'Offizi G, Vlassi C, Casetti R, Sacchi A, et al. Primary and Chronic HIV Infection Differently Modulates Mucosal V δ 1 and V δ 2 T-Cells Differentiation Profile and Effector Functions. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129771.
62. Deniz G. NK VE NKT HÜCRELERİ. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci*. 2007.
63. Cederbrant K, Marcusson-Ståhl M, Condevaux F, Descotes J. NK-cell activity in immunotoxicity drug evaluation. *Toxicology*. 2003;185(3):241-50.
64. Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, et al. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev*. 2001;181:203-14.
65. Eiras P, Roldán E, Camarero C, Olivares F, Bootello A, Roy G. Flow cytometry description of a novel CD3-/CD7+ intraepithelial lymphocyte

- subset in human duodenal biopsies: potential diagnostic value in coeliac disease. *Cytometry*. 1998;34(2):95-102.
66. Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(8):584-94.
 67. Lam MT, Mace EM, Orange JS. A research-driven approach to the identification of novel natural killer cell deficiencies affecting cytotoxic function. *Blood*. 2020;135(9):629-37.
 68. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(10):781-90.
 69. Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol*. 2009;254(2):149-54.
 70. Rubin TS, Zhang K, Gifford C, Lane A, Choo S, Bleesing JJ, et al. Perforin and CD107a testing is superior to NK cell function testing for screening patients for genetic HLH. *Blood*. 2017;129(22):2993-9.
 71. Bashaw AA, Leggatt GR, Chandra J, Tuong ZK, Frazer IH. Modulation of antigen presenting cell functions during chronic HPV infection. *Papillomavirus Res*. 2017;4:58-65.
 72. Kaliński P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today*. 1999;20(12):561-7.
 73. Dogan S, Terzioglu E, Ucar S. Innate immune response against HPV: Possible crosstalking with endocervical $\gamma\delta$ T cells. *J Reprod Immunol*. 2021;148:103435.
 74. Giannini SL, Hubert P, Doyen J, Boniver J, Delvenne P. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Int J Cancer*. 2002;97(5):654-9.
 75. Salamonsen LA, Woolley DE. Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. *J Reprod Immunol*. 1999;44(1-2):1-27.
 76. Zhao Y, Lin L, Xiao Z, Li M, Wu X, Li W, et al. Protective Role of $\gamma\delta$ T Cells in Different Pathogen Infections and Its Potential Clinical Application. *J Immunol Res*. 2018;2018:5081634.

77. Doğan S. HPV Persistansında Endoservikal İmmünitinin Rolü: Akdeniz Üniversitesi Prof. Dr. Tuncer Karpuzoğlu Organ Nakli Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı; 2021.
78. Andreu-Ballester JC, García-Ballesteros C, Benet-Campos C, Amigó V, Almela-Quilis A, Mayans J, et al. Values for $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-lymphocytes and CD4+, CD8+, and CD56+ subsets in healthy adult subjects: assessment by age and gender. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012;82(4):238-44.
79. Hendriks J, Gravestein LA, Tesselaar K, van Lier RA, Schumacher TN, Borst J. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol.* 2000;1(5):433-40.
80. Martin MD, Badovinac VP. Defining Memory CD8 T Cell. *Front Immunol.* 2018;9:2692.
81. Dieli F, Poccia F, Lipp M, Sireci G, Caccamo N, Di Sano C, et al. Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med.* 2003;198(3):391-7.
82. Battistini L, Caccamo N, Borsellino G, Meraviglia S, Angelini DF, Dieli F, et al. Homing and memory patterns of human gammadelta T cells in physiopathological situations. *Microbes Infect.* 2005;7(3):510-7.
83. Cui W, Kaech SM. Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev.* 2010;236:151-66.
84. Lee D, Rosenthal CJ, Penn NE, Dunn ZS, Zhou Y, Yang L. Human $\gamma\delta$ T Cell Subsets and Their Clinical Applications for Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2022;14(12).
85. Legut M, Cole DK, Sewell AK. The promise of $\gamma\delta$ T cells and the $\gamma\delta$ T cell receptor for cancer immunotherapy. *Cell Mol Immunol.* 2015;12(6):656-68.
86. Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A, Herrmann T. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J Immunol.* 2005;175(4):2144-51.
87. Spear P, Wu MR, Sentman ML, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immun.* 2013;13:8.
88. López-Soto A, Huergo-Zapico L, Acebes-Huerta A, Villa-Alvarez M, Gonzalez S. NKG2D signaling in cancer immunosurveillance. *Int J Cancer.* 2015;136(8):1741-50.

89. Demoulin B, Cook WJ, Murad J, Graber DJ, Sentman ML, Loney C, et al. Exploiting natural killer group 2D receptors for CAR T-cell therapy. *Future Oncol.* 2017;13(18):1593-605.
90. Ang WX, Ng YY, Xiao L, Chen C, Li Z, Chi Z, et al. Electroporation of NKG2D RNA CAR Improves V γ 9V δ 2 T Cell Responses against Human Solid Tumor Xenografts. *Mol Ther Oncolytics.* 2020;17:421-30.
91. Deseke M, Rampoldi F, Sandrock I, Borst E, Böning H, Ssebyatika GL, et al. A CMV-induced adaptive human V δ 1+ $\gamma\delta$ T cell clone recognizes HLA-DR. *J Exp Med.* 2022;219(9).
92. Tails CR FM. *Geriatric Medicine and Gerontology.* 6 ed 2003.



