



T.C.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**ANORMAL KOLPOSKOPİK BULGUSU OLAN HASTALARDA
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL CD-3, CD-4, CD-5, CD-8 ve PD-1
BOYAMANIN, SERVİKAL LEZYONLARIN HİSTOPATOLOJİK
TANISI İLE İLİŞKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

HAZIRLAYAN:

DR. AYHAN ATIGAN

DANIŞMAN:

DOÇ. DR. ÖMER TOLGA GÜLER

DENİZLİ 2020



T.C.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**ANORMAL KOLPOSKOPİK BULGUSU OLAN HASTALARDA
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL CD-3, CD-4, CD-5, CD-8 ve PD-1
BOYAMANIN, SERVİKAL LEZYONLARIN HİSTOPATOLOJİK
TANISI İLE İLİŞKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

HAZIRLAYAN:

DR. AYHAN ATIGAN

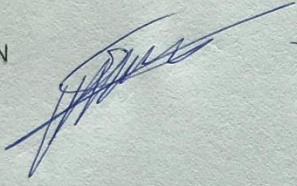
DANIŞMAN:

DOÇ. DR. ÖMER TOLGA GÜLER

DENİZLİ 2020

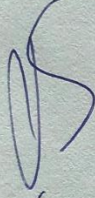
Doç. Dr. Ömer Tolga GÜLER danışmanlığında Dr. Ayhan ATIGAN tarafından yapılan "anormal kolposkopik bulgusu olan hastalarda immünohistokimyasal CD-3, CD-4, CD-5, CD-8 ve PD-1 boyamanın, servikal lezyonların histopatolojik tanısı ile ilişkisi" başlıklı tez çalışması 23.01.2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN



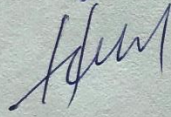
Doç. Dr. Ö. Tolga GÜLER

ÜYE



Prof. Dr. M. Babür KACELİ

ÜYE



Prof. Dr. Hasen YÜKSEL

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

30.01.2020

Prof. Dr. OSMAN ÇİFTÇİ

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimimde bilgi ve tecrübesiyle bana devamlı yol gösterici olan, uzmanlık tezimin planlanmasında, çalışmalarımın yapılmasında ve tezimin yazımı aşamasında bana sürekli destek olan kıymetli hocam Doç. Dr. Ömer Tolga GÜLER başta olmak üzere bu tezin hayat bulmasında benimle birlikte aynı heyecanı duyan Dr. Öğr. Gör. Yeliz Arman KARAKAYA ile birlikte çalıştığım, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Babür KALELİ, Prof. Dr. Erkan ALATAŞ, Prof. Dr. Veysel FENKÇİ, Doç. Dr. Özer ÖZTEKİN, Dr. Öğr. Gör. Cihan KABUKÇU, Dr. Öğr. Gör. Derya KILIÇ, Dr. Öğr. Gör. Özlem Koşar CAN, Dr. Öğr. Gör. Ümit ÇABUŞ, Dr. Öğr. Gör. Soner GÖK'e gönülden saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık sürem boyunca birlikte çalıştığım personel, ebe, hemşire ve hekim arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bunun yanısıra asistanlık eğitimim boyunca desteğini hep hissettiğim ve kilit noktalara ulaşmamı sağlayan Prof. Dr. Hülya ÇETİN, Doç. Dr. Aysun KARABULUT, Dr. Öğr. Gör. Ayşe Seçil ÖZBAN, Uzm. Dr. Suat GENCER, Uzm. Dr. Ersen ERAYDIN, Uzm. Dr. Murat Gökhan KİNAŞ, Uzm. Dr. Timuçin Kurtuluş MERMER, Uzm. Dr. Muhammet GÖÇMEN, Uzm. Dr. Yalçın ARICAN, Uzm. Dr. Erdal BİLEN, Uzm. Dr. Murat Levent DERELİ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sağduyumu borçlu olduğum annem ve kardeşim Ayşe'ye, cesaretimin kaynağı babama; bir ömür desteğine ihtiyacım olan motivasyon kaynağım ve hayat enerjim olan biricik eşim Dr. Alev ATIGAN'a en derin sevgilerimi sunar ve bütün başarılarımı atfederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜRLER	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLOLAR DİZİNİ.....	X
ÖZET.....	XII
İNGİLİZCE ÖZET	XIII
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	4
SERVİKS.....	4
HPV ve SERVİKAL KARSİNOGENEZ.....	12
SERVİKAL LEZYON TANI ve TARAMA YÖNTEMLERİ.....	21
KOLPOSKOPİ.....	27
GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
BULGULAR.....	51
TARTIŞMA.....	70
SONUÇ.....	79
KAYNAKLAR.....	81

KISALTMALAR

AB: Avrupa Birliđi

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ACIP: Amerikan Bağışıklama Uygulamaları Danışma Komitesi/The Advisory Committee on Immunization Practices

ACOG: Amerikan Jinekoloji ve Obstetri Akademisi/American College of Obstetricians and Gynecologists

ACS: Amerikan Kanser Derneği/ American Cancer Society

APC: Antijen sunan hücreler/ Antigen presenting cell

ASC: Atipik skuamoz hücreler

ASCCP: Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patolojiler Derneği/ The American Society for Colposcopy and Cervical Pathology

ASC-H: Atipik skuamoz hücreler- yüksek dereceli lezyonun dışlanamadığı

ASC-US: Atipik skuamoz hücreler- önemi belirlenemeyen

CC: Antijen ortaya çıkarma/Cell Conditioning

CD: İmmün hücre yüzey belirteci/Cluster of Differentiation

CIN: Servikal intraepitelyal neoplazi/Cervical Intraepithelial Neoplasia

CIS: Karsinoma insitu

CTL: Sitotoksik T hücreler

FDA: Food and Drug Administration

H&E: Hematoksilen&Eozin boyama

HGSIL: Yüksek dereceli intraepitelyal lezyon

HPV: Human Papilloma Virüs

HR-HPV: Yüksek riskli HPV/ High Risk HPV

HSV: Herpes Simpleks Virüs

IARC: Uluslararası Kanser Ajansı/ International Agency for Research on Cancer

IFCPC: Uluslararası Servikal Patoloji ve Kolposkopi Federasyonu/ The International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy

İHK: İmmünohistokimya boyama

KETEM: Kanser Erken Teşhis Tarama ve Eğitim Merkezi

LEEP: Loop diathermy excision (Loop Electrosurgical Excision Procedure)

LGSIL: Düşük dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon

MHC: Majör histokompatibilite kompleksi/Major histocompatibility complex

M.Ö.: Milattan Önce

NCI: Ulusal Kanser Enstitüsü/National Cancer Institute

ORF: Open reading frame

Pap test: Papanicolaou smear testi

PD: Programlanmış hücre ölümü/ Programmed Death

PD-L: Programmed Death-Ligand

SKB/ SCJ: Skuamokolumnar bileşke/Squamocolumnar junction

TCR: T hücre antijen reseptör/T-cell receptor

TIL: Tümör İnfiltrat Lenfosit

TLR: Toll benzeri reseptörler/ Toll-like receptors

USPSTF: Amerikan Koruyucu Hizmetler Çalışma Grubu/ United States Preventive Services Task Force

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Ektoserviks, endoservikal kanal ve açıklıkları.....	4
Şekil 2. Hipogastrik arter ve dalları; uterin arter, vajinal arter.....	5
Şekil 3. Ektoserviks	6
Şekil 4. Ara mezoderm.....	7
Şekil 5. SCJ: skuamokolumnar bileşke.....	9
Şekil 6. SJC ve kolumnar epitel.....	9
Şekil 7. SCJ yaş ve hormon durumuna göre değişimi.....	9
Şekil 8. Skuamöz epitel tabakaları, H&E, 40x.....	10
Şekil 9. Transformasyon zonu, SCJ ve Nabothi kistleri.....	11
Şekil 10. CIN 1, 2, 3 ve displazi karşılığı	14
Şekil 11. CIN 1, H&E, 100x.....	15
Şekil 12. CIN 3, H&E, 100x.....	15
Şekil 13. Genital HPV enfeksiyonunun sonucu.....	17
Şekil 14. Skuamöz hücreli karsinom H&E, 100x.....	18
Şekil 15. Adenokarsinoma insitu, H&E, 100x.....	18
Şekil 16. Kolposkopi için aletler	28
Şekil 17. Yeşil filtrede vasküler yapıların görülmesi.....	29
Şekil 18 . Asetik asit uygulanmasından sonra izlenen asetowhite epitel.....	30
Şekil 19. Schiller testi sonrası iodin negatif kolumnar epitelyum.....	31
Şekil 20. LEEP işlemi ve işlem sonrasında spesimen.....	31
Şekil 21. Yeşil filtrede atipik vasküler yapıların görünümü.....	35
Şekil 22. Mozaizm.....	36
Şekil 23. Mikroinvaziv karsinom olgusu.....	38
Şekil 24. İnvaziv karsinom: düzensiz yüzey konturu.....	39
Şekil 25. Kolposkopi Cihazı.....	43
Şekil 26, 27 ve 28 sırasıyla; Ventana Benchmark ULTRA™, Ventana Benchmark XT™ ve Nikon eclipse e200 mikroskop.....	47
Şekil 29. CD3 için pozitif kontrol, tonsil, 150x.....	48
Şekil 30 . CD4 için pozitif kontrol, tonsil, 150x.....	48
Şekil 31. CD5 için pozitif kontrol, tonsil, 150x.....	49
Şekil 32. CD8 için pozitif kontrol, tonsil, 200x.....	49
Şekil 33. PD1 için pozitif kontrol, tonsil, 200x.....	49

Şekil 34. CIN III alanında epitelde Ki67 için tam kat boyanma, İHK, 100x	51
Şekil 35. Epitelyal CD3 boyanması ile Ki-67 arasındaki ilişki.....	52
Şekil 36. Epitelyal CD4 boyanması ile Ki-67 arasındaki ilişki.....	53
Şekil 37. Epitelyal CD5 boyanması ile Ki-67 arasındaki ilişki.....	53
Şekil 38. Epitelyal CD8 boyanması ile Ki-67 arasındaki ilişki.....	54
Şekil 39. CIN II alanında stromada artmış CD3, İHK, 100x.....	55
Şekil 40. CIN III alanında epitelde yüksek oranda artmış CD3, İHK, 200x.....	56
Şekil 41. CIN III ve endoservikal gland tutulumu alanında stromada artmış CD3, İHK, 200x.....	56
Şekil 42. Lezyon stromasında CD4 artmış oranda izlenmektedir, İHK, 200x	58
Şekil 43. CIN I alanında CD4, İHK, 100x.....	58
Şekil 44. CIN III alanında stromada artmış CD4, İHK, 200x.....	59
Şekil 45. CIN II alanında stromada CD5, İHK, 100x.....	60
Şekil 46. CIN III alanında epitelde ve stromada CD5, İHK, 200x.....	61
Şekil 47. CIN III alanında stromada yüksek oranda artmış CD5, İHK, 100x.....	61
Şekil 48. CIN III ve endoservikal gland tutulumu alanında CD8, İHK, 200x.....	63
Şekil 49. CIN I alanında CD8, İHK, 200x.....	64
Şekil 50. CIN III ve endoservikal gland tutulumu alanlarında CD8, İHK, 200x.....	64
Şekil 51. PD1/PD-L1 ve MHC/TCR'nin etkileşimi	65
Şekil 52. CIN III alanında stromada artmış PD1, İHK, 200x.....	67

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Uluslararası kanser ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre kanser dağılımı.....	1
Tablo 2. HPV genom ve fonksiyonları.....	12
Tablo 3. Servikal kanser gelişim riskine göre HPV tiplerinin sınıflandırılması.....	13
Tablo 4. Servikal intraepitelyal lezyon progresyonu.....	14
Tablo5. Servikal sitoloji klasifikasyon sistemlerinin karşılaştırılması.....	16
Tablo 6. HPV aşısı etkinliği ve pozoloji	21
Tablo 7. ACS ve ACOG'un servikal tarama rehberleri karşılaştırması.....	24
Tablo 8. Kolposkopi için Uluslararası Servikal Patoloji ve Kolposkopi Federasyonu (IFCPC) sınıflandırması.....	42
Tablo 9. CONFIRM anti-CD3 (2GV6) antikoruna için Önerilen Boyama Protokolü.....	44
Tablo 10. CONFIRM anti-CD4 (SP35) için Önerilen Boyama Protokolü.....	45
Tablo 11. CONFIRM anti-CD5 (SP19) Tavşan Monoklonal Primer Antikoru için Önerilen Boyama Protokolleri.....	45
Tablo 12. CONFIRM anti-CD8 (SP57) antikoruna için Önerilen Boyama Protokolü...	46
Tablo 13. PD1 için önerilen boyama protokolü.....	47
Tablo 14. LGSIL ve HGSIL tanılarında epitel içerisinde CD3 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi.....	54
Tablo 15. LGSIL ve HGSIL tanılarında stroma içerisinde CD3 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi.....	55
Tablo 16. LGSIL ve HGSIL tanılarında epitel içerisinde CD4 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi.....	57
Tablo 17. LGSIL ve HGSIL tanılarında stroma içerisinde CD4 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi.....	57

Tablo 18. LGSIL ve HGSIL tanılarında epitel içerisinde CD5 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi.....	59
Tablo 19. LGSIL ve HGSIL tanılarında stroma içerisinde CD5 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi.....	60
Tablo 20. LGSIL ve HGSIL tanılarında epitel içerisinde CD8 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi.....	62
Tablo 21. LGSIL ve HGSIL tanılarında stroma içerisinde CD8 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi.....	63
Tablo 22. LGSIL ve HGSIL grubunda CD8 hakimiyet durumu	65
Tablo 23. LGSIL ve HGSIL tanılarında epitel içerisinde PD1 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi.....	66
Tablo 24. LGSIL ve HGSIL tanılarında stroma içerisinde PD1 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi.....	66
Tablo 25. Epitel içerisindeki CD3 immünohistokimya boyanması yüzdesinin düşük ve yüksek olmasının LGSIL-HGSIL ile ilişkisi.....	67
Tablo 26. Epitel içerisindeki CD4 immünohistokimya boyanması yüzdesinin düşük ve yüksek olmasının LGSIL-HGSIL ile ilişkisi.....	68
Tablo 27. Epitel içerisindeki CD5 immünohistokimya boyanması yüzdesinin düşük ve yüksek olmasının LGSIL-HGSIL ile ilişkisi.....	68
Tablo 28. Epitel içerisindeki CD8 immünohistokimya boyanması yüzdesinin düşük ve yüksek olmasının LGSIL-HGSIL ile ilişkisi.....	68
Tablo 29. Epitel içerisindeki PD1 immünohistokimya boyanması yüzdesinin düşük ve yüksek olmasının LGSIL-HGSIL ile ilişkisi.....	69

ÖZET

Anormal Kolposkopik Bulgusu Olan Hastalarda İmmünohistokimyasal CD-3, CD-4, CD-5, CD-8 ve PD-1 Boyamanın, Servikal Lezyonların Histopatolojik Tanısı ile İlişkisi

Dr.Ayhan ATIGAN

Serviks kanseri halen dünyada en sık görülen kanserlerden biridir. Erken tarama yapılır ve etkili bir şekilde yönetilirse, en önlenebilir ve en başarılı şekilde tedavi edilebilen kanserdir. Serviks üzerinde bazı spesifik lezyonların kolposkopi sayesinde tanımlanması ve bu lezyonların servikal preinvazif ya da invazif hastalıklar ile olan ilişkisi nedeniyle kolposkopi daha da önemli hale gelmiştir. Son yıllarda, human papilloma virüs (HPV)'nin neden olduğu servikal kanser için immünoterapi çalışmalarında büyük ilerlemeler gerçekleşmiştir. Bu çalışma; anormal kolposkopik bulgusu olan hastaların, immünolojik alt yapısını ve immün boyamalar ile histopatolojik tanı ilişkisini ele almayı hedeflemektedir.

Çalışma kapsamında 01 Ocak 2015 – 01 Kasım 2019 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğine başvuran ve kolposkopi yapılmış hastalar retrospektif olarak incelenmiştir. Anormal kolposkopik bulguya sahip ve biyopsi alınmış olan hastalar çalışmaya alınmıştır. Tüm hastaların histopatolojik tanıları mevcut idi. 30 tane düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LGSIL) ve 30 tane yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HGSIL) olmak üzere toplam 60 hasta çalışmaya dahil edildi. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Patoloji arşivindeki olgulara ait parafin bloklardan alınan yeni kesitlerde immünohistokimyasal CD3, CD4, CD5, CD8 ve PD1 ekspresyonları epitelde; tümörü infiltrate eden lenfositlerde (TIL) ve stromada değerlendirilmiştir.

Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LGSIL) ve yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HGSIL) tanısı konulmuş toplam 60 hastanın epitelyal ve stromal CD3, CD4, CD8, CD5 ve PD-1 immünohistokimya boyamaları yapılmıştır. Epiteldeki lezyon içerisinde tüm boyamaların ortalama boyanma endeksi HGSIL grubunda LGSIL grubundan fazla bulunmuştur; CD3 için 24,4 vs. 13,2 (**p<0,001**), CD4 için 10,57 vs. 5,37 (**p=0,002**), CD5 için 8,5 vs. 5,7 (**p=0,006**), CD8 için 13,87 vs. 7,67 (**p<0,001**), PD-1 için 1,83 vs. 0,27 (**p=0,046**). Stromada ise tüm diğer boyalar istatistiksel olarak HGSIL grubunda daha yüksek olmakla birlikte CD5 için

benzer bulunmuştur. Genel olarak CD3, CD4 ve CD8 boyanma endeksi de Ki-67 ile pozitif korelasyon göstermektedir (Pearson korelasyon katsayıları CD3 için 0,51 ($p<0,001$); CD4 için 0,45 ($p=0,002$); CD8 için 0,49 ($p<0,001$)).

CD3, CD4, CD5, CD8 ve PD-1 pozitif hücreler yüksek dereceli lezyonların epiteli içerisinde düşük dereceli lezyonlara kıyasla daha yüksek oranda bulunmaktadır. CD3, CD4 ve CD8 ise Ki-67 proliferasyon endeksi ile de pozitif korelasyon göstermektedir. Bu anlamda adı geçen markerların tanısal potansiyeli bulunmaktadır. Ancak bu ilişkinin prognoz açısından önemini değerlendirebilmek için daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: HPV, Servikal intraepitelyal lezyon, kolposkopi, immünohistokimya

SUMMARY

The Relationship Between Immunohistochemical CD-3, CD-4, CD-5, CD-8 and PD-1 Staining and Histopathological Diagnosis of Cervical Lesions in Patients with Abnormal Colposcopic Findings

Dr.Ayhan ATIGAN

Cervical cancer is still one of the most common cancers in the World. When cervical cancer is diagnosed early and managed effectively, which is one of the most preventable and successfully treated cancer types. Colposcopy has become even more important due to the identification of some specific lesions on the cervix by colposcopy and the relationship of these lesions with cervical preinvasive or invasive diseases. In recent years, great progress has been made in immunotherapy studies for cervical cancer caused by human papilloma virus (HPV). With this study, it aims to address the immunological background of patients with abnormal colposcopic findings and the relationship between immune staining and histopathological diagnosis.

Patients who applied to Pamukkale University Medical Faculty Hospital Gynecology and Obstetrics Clinic between January 01, 2015 and November 01, 2019 were retrospectively analyzed. Patients with abnormal colposcopic findings and biopsy were included in the study. All patients had histopathological diagnoses. A total of 60 patients, 30 low-grade squamous intraepithelial lesions (LGSIL) and 30 high-grade squamous intraepithelial lesions (HGSIL) were included in the study. Immunohistochemical CD3, CD4, CD5, CD8 and PD1 expressions were evaluated in tumor infiltrate lymphocytes (TIL) and stroma in new sections taken from paraffin blocks of cases kept in the archive of Pamukkale University Medical Faculty Hospital Medical Pathology.

A total of 60 patients diagnosed with low grade squamous intraepithelial lesion (LGSIL) and high grade squamous intraepithelial lesion (HGSIL) had epithelial and stromal CD3, CD4, CD8, CD5 and PD-1 immunohistochemistry staining. The average staining index of all staining within the lesion in the epithelium in the HGSIL group was higher than the LGSIL group; CD3; 24,4 vs. 13,2 (**p<0,001**), CD4; 10,57 vs. 5,37 (**p=0,002**), CD5; 8,5 vs. 5,7 (**p=0,006**), CD8; 13,87 vs. 7,67 (**p<0,001**), PD-

1; 1,83 vs. 0,27 (**p=0,046**). In stroma, all staining parameters were statistically higher in the HGSIL group, except CD5. In general, CD3, CD4 and CD8 staining index also correlated positively with Ki-67 (Pearson correlation coefficients 0.51 for CD3 (**p <0.001**); 0.45 (**p = 0.002**) for CD4; 0.49 for CD8 (**p <0.001**)).

Higher amount of positive cells for CD3, CD4, CD5, CD8 and PD-1 are found in the epithelium of high-grade lesions compared to low-grade lesions. CD3, CD4 and CD8 also show a positive correlation with the Ki-67 proliferation index. In this sense, the mentioned markers may have diagnostic potential. However, larger studies are needed to evaluate the importance of this relationship in terms of prognosis.

Keywords: Human Papiloma Virus (HPV), Cervical intraepithelial lesion, colposcopy, immunohistochemistry

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, tıp tarihi kadar köklü bir geçmişe sahiptir. İlk kez Hipokrat tarafından (M.Ö. 460-377) tariflenmiştir (1). Uterin servikal kanser, önceleri daha fazla görülen bir hastalık olarak kabul edilmiş olsa da, yakın geçmişte servikal kansere yönelik tarama testlerinin geliştirilmesi ile insidansının düştüğü belirtilmektedir (2). Ancak, tarama testlerine rağmen henüz eradike edilebilmiş değildir. Bu sebeple preinvaziv lezyonların ilerlemesiyle geliştiği düşünülen servikal kanserde tarama testleri erken teşhis ve tedavi için önem kazanmakta ve önerilen aralıklarla yapılması gereklidir.

Rahim ağzı kanseri, kadınlar için en yaygın ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Her yıl dünya genelinde 300.000'den fazla kadın rahim ağzı kanserinden ölmektedir. Rahim ağzı kanseri ölümlerinin yaklaşık % 90'ı düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelir (3). Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre serviks kanseri kadınlarda tüm kanserler arasında dördüncü sırada yer alırken, kadın genital organ kanserleri arasında en fazla görülenidir (Tablo 1) (4). 2014 yılı Türkiye kanser istatistiklerine göre serviks kanseri kadın kanserleri arasında onuncu sırada, kadın genital organ kanserleri içinde üçüncü sırada yer almaktadır. Bununla birlikte, serviks kanserinin büyük çoğunluğu erken evrede teşhis edilmektedir (5).

Tablo 1. Uluslararası kanser ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre kadınlarda en sık görülen ilk beş kanserin dağılımı (4)

	Türkiye*	Dünya	IARC'a üye 24 Ülke	AB (28 ülke)	ABD
1	Meme	Meme	Meme	Meme	Meme
2	Tiroid	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Akciğer
3	Kolorektal	Uterus serviksi	Akciğer	Akciğer	Kolorektal
4	Uterus korusu	Akciğer	Uterus serviksi	Uterus korusu	Tiroid
5	Akciğer	Uterus korusu	Uterus korusu	Uterus serviksi	Uterus

*Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014 (5).

Serviks kanseri ve servikal preinvaziv lezyonlarla ilgili başlangıçta etken faktör olarak Herpes Simpleks Virüs (HSV) tip-2 üzerinde yoğunlaşılsa da, anormal sitolojik bulguların nedeni olarak Human Papilloma Virüs (HPV)'nin etkili olduğu 1976'da Meisels ve Fortin tarafından vurgulanmıştır (6). Genel olarak öne sürülen risk faktörleri; oral kontraseptif kullanımı, sigara içimi, multiparite, multipartner öyküsü, erken yaşta ilk koit, ırk, immünsupresyon, seksüel geçişli hastalıklar, HPV enfeksiyonudur (7). 2008 yılında Harold Zur Hausen'nin Nobel Tıp Ödülü'nü almasını sağlayan 1970 yıllarında servikal kanserlerde muhtemel etkenin HPV olduğunu belirtmesidir (8,9).

Human Papilloma Virus (HPV) insanlara özgü, doku spesifik, 100'den fazla tipi bulunan bir DNA virüsüdür (10). Serviksin yüksek riskli (onkojenik) HPV DNA tipleri ile enfeksiyonu, özellikle persiste eden enfeksiyon ile serviks kanseri arasındaki ilişki kanıtlanmıştır (11,12).

Kanser tespiti her jinekolojik muayenenin ayrılmaz bir parçası olmalıdır (13). Serviks kanseri için rutin bir tarama testi olan Papanicolaou (Pap) smear testi George Papanicolaou tarafından 1928'de bildirilmiş ve etkinliği 1941'de kanıtlanmıştır (14) Pap smear testinin uygulanmaya başlamasından sonra serviks kanserinin insidansında ve mortalitesinde ciddi bir azalma olmasına rağmen tarama için günümüzde tek başına yeterli değildir (15). HPV DNA testi ile eş zamanlı pap smear testinin birlikte kullanımına co-test adı verilir ve servikal kanser tarama programı için güncel yaklaşımdır (16). ASCCP (Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patolojiler Derneği), ACS (Amerikan Kanser Derneği), ACOG (Amerikan Jinekoloji ve Obstetri Akademisi), USPSTF'nin (Amerikan Koruyucu Hizmetler Çalışma Grubu) tarafından 30 yaş üzeri kadınlara 5 yılda bir co-test taraması önerilmektedir (17). Servikal kanser taramasında gerçekleştirilen co-test sonucuna göre kolposkopik muayene aşamasına geçilir (18). Kolposkopi rehberliğinde alınan biyopsi örneği servikal intraepitelial lezyonların tanısında altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir (19).

Servikal kanser hastalarında immün hücre yüzey belirteci olarak (cluster of differentiation) CD4 ve CD8 lenfositler için periferik kanın prognostik öneme sahip olabileceğini ve servikal kanser dokularında CD4+ ve CD8+ oranının değiştiğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (20). Esas olarak CD4 ve CD8 T hücreler olmak üzere tümör infiltrate lenfositleri (TIL'ler), anti-tümör bağışıklığında kapsamlı bir şekilde tanımlanmıştır. Tümör büyümesinin kontrolünde CD4 ve CD8 T

lenfositlerinin etkileşimi mevcuttur (21,22). Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) 3'te artmış epitelyal ve stromal CD3 pozitif hücreler gözlenmiştir (23). CD3 lenfositlerinin hastalık ilerlemesinde belirlenemeyen bir rol oynadığını düşündürmektedir. Bedoya ve arkadaşları, CIN derecesine bakılmaksızın, hem stroma hem de epitelde CD8+ T hücrelerinin CD4+ ve Foxp3+ hücrelerinden daha bol olduğunu bildirmişlerdir, ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (24). Ghosh ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada çoğu vakada servikal tümör kitlesini infiltre eden CD8+ lenfosit sayısı, CD4+ lenfositlerden fazladır (25). Ayrıca, ciddi displastik vakalarda CD8+ tümör infiltre lenfosit (TIL)'lerin CD4+ TIL'lerden daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Lezyonun derecesi ilerledikçe T hücresi infiltratları belirginleşmiştir (26). CD5, T hücrelerinin yüzeyi ve B hücrelerinin bir alt kümesi üzerinde ekspres edilen bir transmembran proteinidir. CD5'in T hücre antijen reseptör (TCR) aracılı sinyal iletiminin negatif bir regülatörü olarak hareketi gösterilmiştir (27). Önceki çalışmalar programmed death-ligand (PD-L)-1 ve programmed death (PD)-1 ekspresyon seviyeleri ile CIN derecesi ve HPV pozitif oranı arasında doğrudan korelasyon olduğunu göstermiştir. Böylece, PD-1 / PD-L-1 yolunun yüksek riskli HPV (HR-HPV) ile ilişkili CIN'lerde servikal bağışıklığı bozabileceğini düşündürmektedir (28). CD8+ hücrelerde, PD-L-1 ekspresyonu viral enfeksiyon alanı ile kuvvetli ilişkilidir (29). Yukarıda bahsedilen çalışmalara dayanarak, T hücrelerinin ve T hücresi tepkilerinin düzenlenmesinde yer alan diğer moleküllerin sentezlenmesi ve bunların hastalık ilerlemesindeki etkileri üzerine daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Amacımız, sürekli gelişim ve değişim içerisinde olan HPV çalışmalarına katkı sağlamaktır. Yakın gelecekte invaziv bir işlem olan kolposkopik biyopsiye gerek duyulmadan standardize edilmiş bir test ile kesin tanının konulabileceğine inanıyoruz. Bunun için öncelikle alınan biyopsi örneklerinde anlamlı bulunacak olan bir belirteç, zaman içerisinde biyopsiye göre daha az invaziv girişim olan periferik kandan veya servikal sürüntü örneğinden belirlenebilir hale gelecektir. Ayrıca, çalıştığımız immünohistokimyasal boyamalar gelecekte yapılacak çalışmalar ile immün sistem üzerinden etki göstermesi hedeflenen ilaçların geliştirilmesi fikrini ortaya koyacaktır. Bu amaçla bazı çalışmalar yapılmış olsada hücrel immüniteyi birçok yönden hedef alması ve klinik özellikler ile birleştirilmesi neticesinde çalışmamız çok orijinal bir fikre dayanmaktadır.

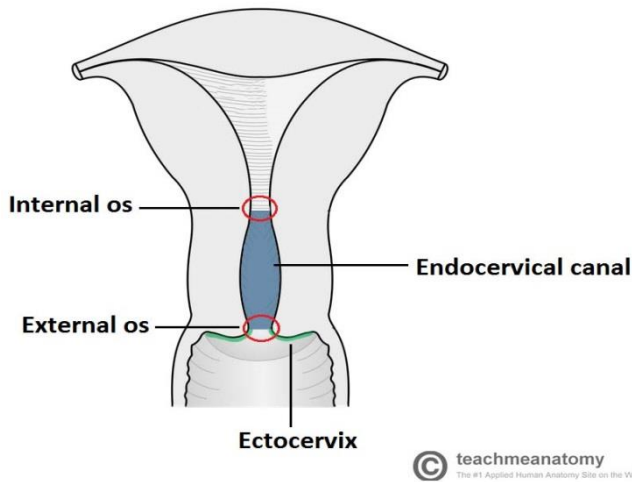
2.GENEL BİLGİLER

Kadın alt genital sistemi serviks, vajina ve vulvayı içerir.

2.1 SERVİKS

2.1.1 Serviks Anatomisi

Serviks, endometriyal kavite ile vajina arasında kanal görevi gören tübüler bir yapıdır. Üst kısım uterus ile devam eder. Ameliyat sırasında, uterus ile karşılaştırıldığında tübüler ve kabarık olan serviksin üst sınırı hissedilerek palpe edildiğinde uterus korpusu ile serviks arasındaki bağlantı bulunur. Serviksin altı kısmı vajinaya doğru çıkıntı yapar ve spekulum ile muayene sırasında görülen kısımdır. Vajina içersinde yer alan bölümü portio vajinalis, üst kısımda kalan bölümü ise portio supravajinalis olarak adlandırılır (30). Portio vajinalis cervicis ile vajina duvarı arasında çepeçevre olan çıkmaza vajinal forniks denir. Hangi vajen duvarıyla komşuluk yaptığına göre anterior, lateral ve posterior vajinal forniks olarak adlandırılır. Supravajinal bölümü çok sayıda lif ve düz kas içermektedir. Portio vajinalis bölümü çoğunlukla fibröz ve kollajen dokudan oluşmakla birlikte az miktarda düz kas içerir. Servikal kanal, **internal os** ile endometriyal boşluğa ve **eksternal os** sayesinde vajinaya açılır. Ektoserviks, serviksin vajinaya çıkıntı yapan yüzeyidir. Eksternal os nulliparlarda küçük ve konik iken, doğum yapmış kadınlarda dejenere görünümündedir. Bu iki bölüm arasındaki alan da **endoservikal kanal** (canalis cervicis uteri) olarak adlandırılır (Şekil 1). Endoservikal kanal içerisindeki katlantılara plica palmatae denilir.

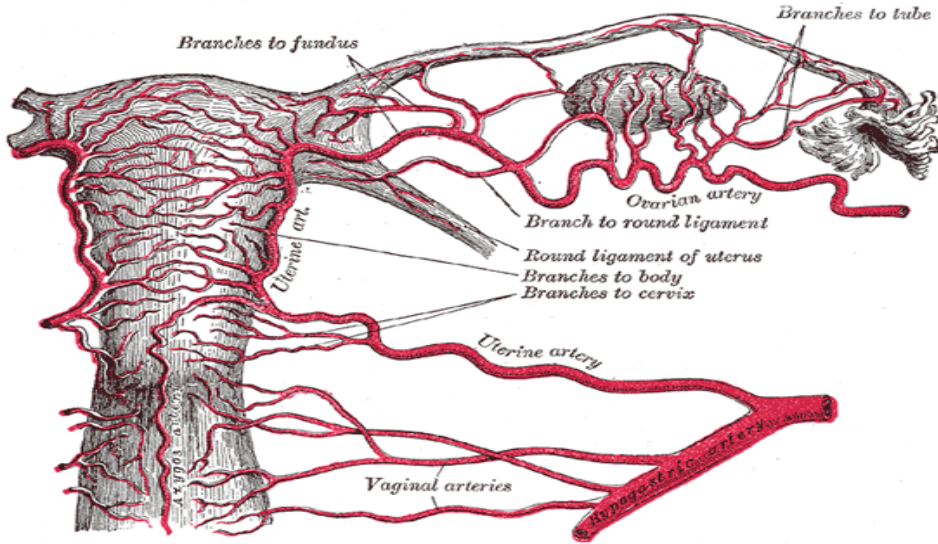


Şekil 1. Ektoserviks, endoservikal kanal ve açıklıkları

Nulliplarlarda silindirik görünümdeki serviks, toplam uterus hacminin yaklaşık yarısını oluşturur (31). 2-4 cm uzunluğunda ve yaklaşık 2 cm genişliğindedir. Orta hatta yerleşimli eksternal servikal os ya da endoservikal kanalın başlangıcı, yuvarlaktır ve 3-5 mm çapındadır.

Subseröz fasyanın yoğunlaşmasıyla oluşan kardinal ligament vajina orta-üst kısmı ile servikse destek sağlar. Kardinal ligament uterus damarlarını ve jinekolojik cerrahide dikkat edilmesi gereken üreteri içerir (32).

Serviksin stroması, içerisinde serviksin damar, sinir ve lenfatiklerinin geçtiği yoğun fibromusküler dokudan oluşur. Serviksin arterleri hipogastrik arterden köken alan uterin arterin servikal ve vajinal dallarıdır (Şekil 2) ve serviksin dış yüzünden saat 3 ve 9 pozisyonunda inerler. Venler arterlere paralel seyrederek ve hipogastrik venöz ağa drene olurlar. Serviksin lenfatikleri iki alandan kaynaklanır; mukoza altı ve bağ dokusu stromasının derin kısımları. Lenfatikleri; common, internal ve eksternal iliak, obturator ve parametrial nodlara drene olur. Sinirleri hipogastrik pleksustan köken alır (33,7). Endoservikste yoğun duyu uçları vardır, ancak ektoservikste pek bulunmaz (34).

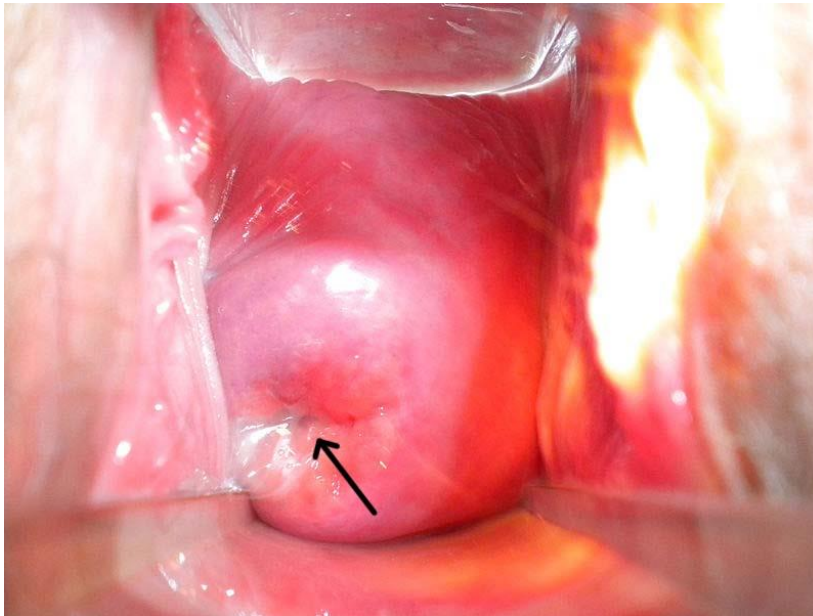


Şekil 2. Hipogastrik arter ve dalları; uterin arter, vajinal arter

2.1.2 Serviks Fizyolojisi

Serviks doğumun birinci evresinde olgunlaşıp açıklığı artan ve menstruasyon kanamasının da akışının sağlandığı kanaldır. Fertilitenin en önemli

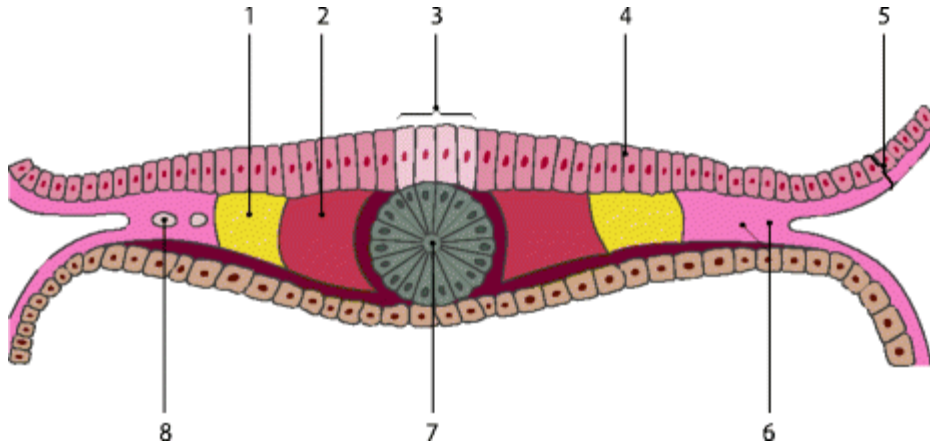
noktası olan, gebeliği destekleyen çok miktarda berrak mukusu serviks üretir. Spermin uterus boşluğuna geçişini kolaylaştırır. Servikal mukus, endoservikal bezlerden salgılanan berrak veya opak görünümlü gri beyaz renkli bir sekresyondur. Üst dişi üreme sisteminin sterilitesini korur. Bu ortam, endometriyumun sık sık dökülmesi, kalın servikal mukus ve dar eksternal os (Şekil 3) ile korunur. Servikal mukusun yoğunluğu adet döngüsü boyunca hormon seviyelerine bağlı olarak değişir. Adet sırasında, serviks adet akışının geçişine izin vermek için az miktarda açılır. Post-menstruel dönemde östrojenin etkisi ile bol miktarda sulu ve alkalendir. Bu dönemdeki yüksek sodyum klorür ve potasyum değerleri ferning oluşumundan sorumludur. Ferningin içeriği, östrojen seviyelerini gösterir. Siklusun sekizinci gününden ovulasyona kadar geçen sürede östrojenin yükselişi ile servikal mukus artar, viskozitesi düşer, böylece spermetazoa geçirgenliği artar (35). Ovulasyondan sonra servikal mukusun akışkanlığı düşük, miktarı az ve asidik pH'da olup, bol lökosit içerir. Hamilelik sırasında serviks tarafından üretilen mukus, servikal bir "tıkaç" oluşturmak için kalınlaşır. Böylece, büyüyen embriyoyu enfeksiyondan korur. Doğum yaklaştığında servikal tıkaç inceler ve atılır. Serviksin bir başka önemli işlevi, fetusun uterustan vajinaya geçişine izin vermek için serviks dilate olduğu, yani doğum sırasında ortaya çıkar.



Şekil 3. Ekτοςerviks: vajinaya yerleştirilen spekulum ile görülebilir. Eksternal os ok ile işaretli

2.1.3 Serviks Embriyolojisi

Ürogenital sistem, embriyonun dorsal vücut duvarından türetilen ara mezenkimden gelişir (Şekil 4) (36). Mesoderm türevi Mülleryan (paramezonefrik) kanallarından gelişir. Dişilerde, testiküler gelişimin olmaması nedeniyle mülleryan inhibitör faktör salgılanamaz ve mülleryan kanal gelişir. Mülleryan kanallarının kranyal ucu gelecekte fallop tüpleri haline gelir; kaudal ucu ise, Y şeklindeki kanalı (uterovajinal primordiyum) oluşturmak için orta hatta kaynaşır. Mülleryan tüberküle; uterovajinal primordiyum, ürogenital sinüsün endoderm uzantısı ile karşılaşır (himenal halkadaki vajinal ağız bölgesi). Uterovajinal primordiyum, korpus uteri ve serviks bez ve epitelini, vajinanın fibromusküler duvarını oluştururken, komşu mezenkimden endometriyum ve stroma gelişir.



Şekil 4. 1: ara (intermediate) mezenkim (mezoderm), 2: paraksiyel mezoderm, 3: nöral oluk, 4: embriyonik ektoderm, 5: amnion, 6: çölomik boşluk, 7: notokoard, 8: lateral mezoderm

Birinci trimesterin sonuna doğru çok katlı skuamöz hücreler, kısmen kolumnar hücreler ile yer değiştirmeye başlar ve 16. haftadan itibaren ilkel bir serviks tanınabilir (37). Kolumnar ve skuamöz hücrelerin bulunduğu nokta orijinal ya da doğal skuamokolumnar bileşkedir (SKB). Orijinal SKB'nin konumu fetal yaşam boyuca değişiklik gösterir. Gestasyonun 24.-32. haftaları arasında endoservikal kanal içindedir. Otuz ikinci haftadan sonra vajinaya doğru uzanır, term ile birlikte (40. gebelik haftası) tekrar kanal içine doğru regrese olur (38).

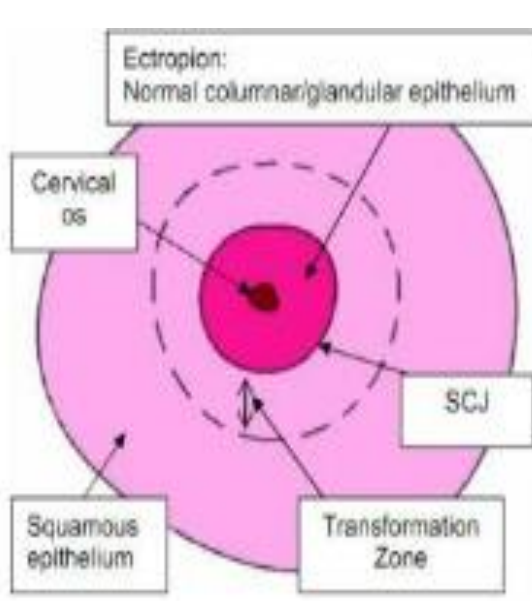
Mülleryan epitel hücreleri endoservikal rezerv hücreler ve endoservikal kolumnar hücreler için kök hücrelerdir. Rezerv hücreler ilk olarak yaklaşık 20 haftalık

gebelikte tanımlanır. İlk olarak gelişmekte olan endometriyal kaviteyi kaplayan mülleryan tip kolumnar hücreleri altında belirirler. Mülleryan epitel hücreleri, erken servikal gelişim sırasında endoservikte hem endoservikal kolumnar hem de skuamöz tip epitelyuma dönüşme kapasitesine sahiptirler (39).

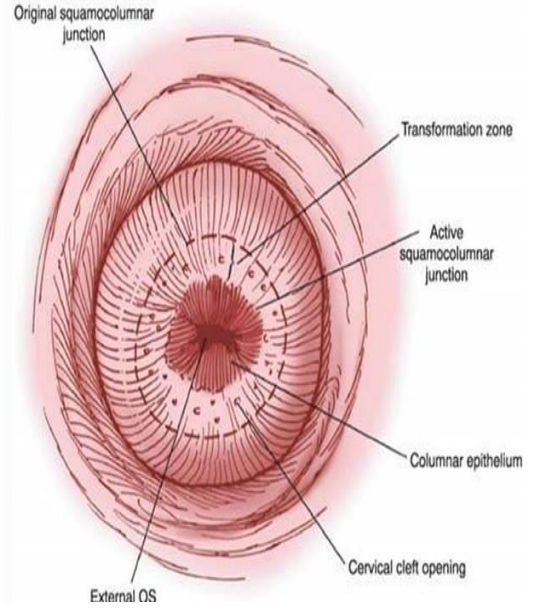
2.1.4 Serviksin Histopatolojisi

Servikal kanser, genellikle uterin servikal skuamöz kolumnar bağlantı noktasından kaynaklanır. Endometriümdan başlayıp endoservikal kanal boyunca devam eden kolumnar epitel, serviksin porsiyö vajinalis bölümüne geldiğinde yassı epitele dönüşür. Bu geçiş bölgesine **skuamokolumnar bileşke (SKB) (skuamocolumnar junction: SCJ)** adı verilir (Şekil 5 ve 6). Eksternal osa göre yeri yaş, hormonal durum, gebelik gibi çeşitli fizyolojik durumlara bağlı olarak değişir (Şekil 7). Çocuklukta ve perimenarşta, eksternal osta veya çok yakınındadır. Puberte sonrası ve reprodüktif dönemde, kadın genital organları östrojenin etkisi altında büyür. Böylece serviks büyür ve endoservikal kanal uzar. Bu olay, ektoserviksteki kolumnar epitelin, özellikle ön ve arka dudaklarda eversiyonuna yol açar ve ektropiyon ile sonuçlanır. Bu nedenle, reprodüktif çağda ve gebelikte skuamokolumnar bileşke ektoservikte ve eksternal osa uzak yerleşmiştir.

Kolumnar epitel; endoservikal kanalı döşeyen, çekirdekleri koyu boyanan tek tabaka hücrelerdir. İnspeksiyonda; tek katlı hücre tabakası, alttaki stromanın damarlı kırmızı renginin kolayca görünmesini sağlar. Servikal stromaya endoservikal kript oluşumu ile sonuçlanan çok sayıda invajinasyon olur (Şekil 6). Mukus salgılayan bu hücrelerin salgıları ovulasyon öncesi maksimum düzeydedir (40).

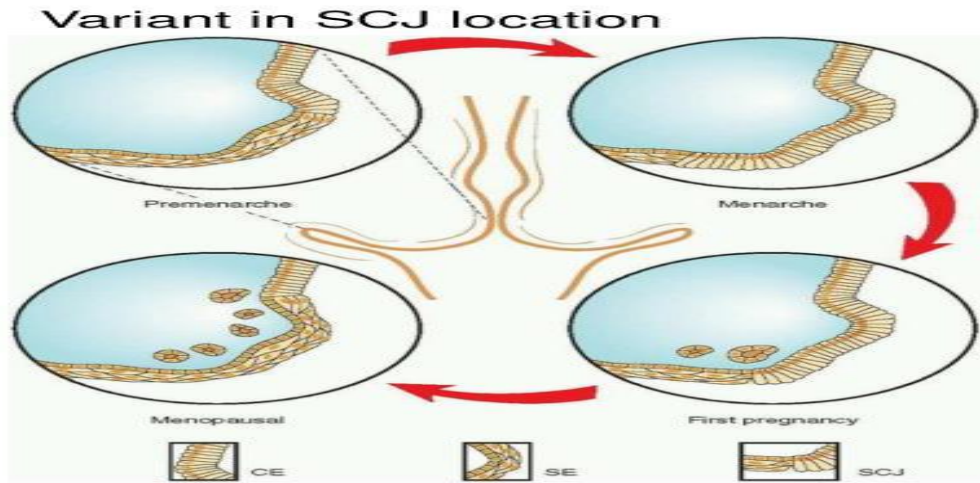


Şekil 5. SCJ: skuamokolumnar bileşke



Şekil 6. SJC ve kolumnar epitel

Berek and Novak's Gynecology 15th Ed



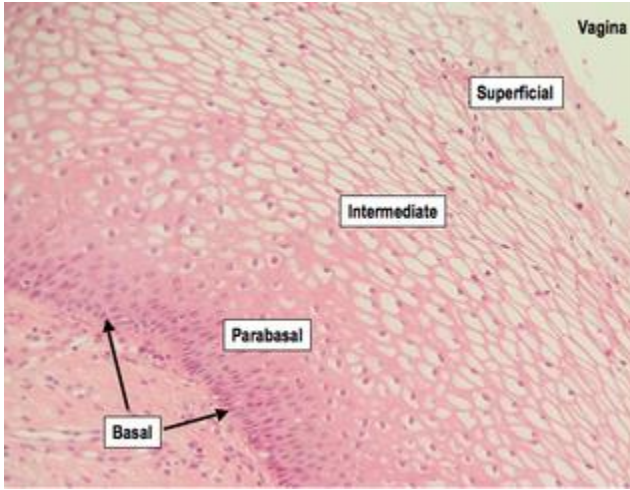
Şekil 7. SCJ yaş ve hormon durumuna göre değişimi

Skuamoz epitel (çok katlı yassı epitel): etkoserviksin geniş bir kısmını kaplayan, nonkeratinize, glikojen içeren, çok katlı hücre tabakasından oluşur. Bez içermez. Soluk pembe renkli görünür. Superfisyal, intermediate, parabazal ve bazal olmak üzere 4 tabakadan oluşmaktadır (Şekil 8):

- 1- Bazal tabaka: aktif mitoz gerçekleşerek, epitel rejenerasyonunu sağlayan immatür hücre dizilenmesidir. Tek sıralı alçak silindirik, iri çekirdekli ve az

miktarda stoplazmaya sahip hücrelerden oluşur. Bölünme ve farklılaşmaları sonucunda diğer tabakaları meydana getirirler.

- 2- Parabazal tabaka (sivri uçlu hücre tabakası): iri çekirdekli, çok sıralı polihedral hücrelerden oluşur. Keratin iplikler içerir.
- 3- İntermediate tabaka (naviküler hücre tabakası): geniş sitoplazmalı, görece küçük çekirdekli, glikojen içeriği fazla 4-6 adet hücre dizisidir.
- 4- Süperfisyel tabaka: Glikojenle dolu geniş bir stoplazma ve küçük piknotik çekirdeği olan, transparan 5-8 sıra yassılaştırmış hücreden oluşur. Hücrelerde yüzeyden ayrılmalar (dökülme) olur. Bu hücreler Papanicolaou (Pap) testinin temelini oluşturur (41).



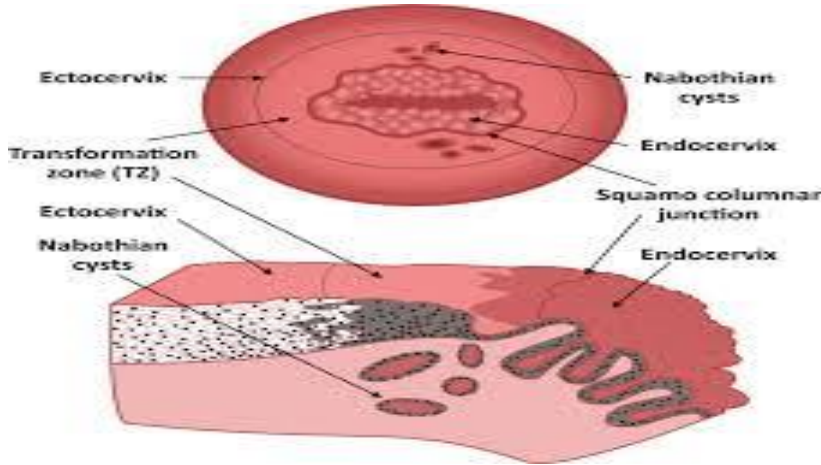
Şekil 8. Skuamöz epitel tabakaları, H&E, 40x

Bazal tabakadan süperfisyel tabakaya doğru ilerledikçe hücre sitoplazmalarında artış ve çekirdeklerinde küçülme, protein içeriklerinde azalma görülür. Kolposkopi sırasında asetik asit uygulandığında, asetik asit geri dönüşlü olarak hücresel proteinlerle presipite olur. Normal epitele asetik asit uygulandığında, süperfisyel tabakadaki hücrelerin düşük protein içeriğinden dolayı renk değişimi olmaz. İntermediate ve süperfisyel hücreler, anormal veya eksik maturasyon göstermiyorsa sitoplazmalarında bol glikojen içerdiklerinden lugolle boyanma sonrası kahverengi-siyah boyanır ve bu Schiller testinin temelini oluşturur. Ektoserviksteki skuamöz epitelin tabakalar halinde olmasından dolayı muayenede skuamöz epitel pembemsi görünür (42). Skuamöz epitelin kalınlığı ve glikojen içeriği östrojen stimülasyonunun derecesine bağlı olarak değişir. Östrojen yokluğunda

(menopoz) matürasyon, parabazal hücre seviyesinden sonra olmadığı için hücrelerde çok katlı tabakalanma ve glikojen vakuelleri gözlenmez (30).

Transformasyon zonu: Kolumnar ve skuamöz hücrelerin bulunduğu nokta orijinal ya da doğal skuamokolumnar bileşkedir (SKB). Reprodüktif yaşamdan perimenopozal yaş grubuna doğru ilerlerken metaplazinin gelişmesiyle beraber, skuamokolumnar bileşkenin yeri giderek yukarı doğru ilerler ve yeni skuamokolumnar bileşke oluşur.

Orjinal ve yeni skuamokolumnar bileşke arasında kalan serviks kısmına ise **transformasyon zonu** adı verilir ve bu bölge servikal neoplazilerin neredeyse tamamının orjin aldığı bölgedir. Kolposkopi sırasında bu bölgenin görüntülenmesi çok önemlidir. Çünkü bu bölgenin mitotik aktivitesi fazla olduğu için karsinojenik ve mutojenik etkilere çok duyarlıdır. Hemen hemen bütün servikal neoplaziler bu zonda, skuamokolumnar bileşke yakınında gelişir (34). Transformasyon zonundaki epitel maturasyon gösterdikçe hücreler glikojen depolar ve sonuçta kolposkopik ve histolojik olarak orijinal skuamöz epitele benzerler. Orijinal SKB'nin yerini tespit etmenin tek yolu silindirik epitelin varlığını gösteren Nabothi kistleri ve servikal kleft açılımlarına bakmaktır (Şekil 9) (43). Postmenopozal kadınlarda, yeni skuamokolumnar bileşke servikal kanal içine iyice regrese olduğundan muayenede gözle görülemez (44).



Şekil 9. Transformasyon zonu, SCJ ve Nabothi kistleri

2.2 HPV VE SERVİKAL KARSİNOGENEZ

2.2.1 Human Papilloma Virus (HPV)

Papilloma virüsler, konakçı türüne özgü çift sarmallı zarfsız 50-55 nm çapında parvovirüs ailesine ait DNA virüsleridir. 72 kapsomerden oluşmuş olup sferik yapıda kapsidi bulunur. HPV genetik benzerliklerine ve türe olan özgüllüklerine göre tiplere ve subtiplere ayrılır (45). Diğer birçok virüsün aksine HPV virüsleri, antijenik yapılarından çok DNA yapısına göre sınıflandırıldığından serotipler yerine genotipler olarak ve keşfedildikleri sıraya göre numaralandırılmaktadır (46). Viral DNA'nın 7 erken (Early; E1-E7) ve 2 geç (Late; L1- L2) açık okuma kısımları vardır (Open Reading Frames; ORFs) (Tablo 2). Erken genler (E1, E2, E4, E5, E6 ve E7) DNA bakımı, replikasyonu ve transkripsiyonunu yönetir. Geç genler (L1 ve L2) sırasıyla majör ve minör kapsid proteinlerini kodlar (47,48). İnsan keratinosit hücre kültürleri ve tümör hücre serileri, HPV E6 ve E7 proteinlerinin ölümsüzleştirme ve transformasyon işlemlerinde rol aldığını göstermiştir (49).

Tablo 2. HPV genom ve fonksiyonları (50)

Açık okuma kısımları (Open reading frame)		Fonksiyonu
Erken (Early)	E1	Viral replikasyon
	E2	Viral transkripsiyon ve replikasyon regülasyonu
	E4	Sitoskeletal proteinlerle etkileşim
	E5	MHC-I proteinlerinin down regülasyonu
	E6	Onkoprotein; tümör supresör protein p53'e bağlanır
	E7	Onkoprotein; tümör süpresör protein retinablastoma bağlanır
Geç (Late)	L1	Major viral kapsid protein
	L2	Minör viral kapsid protein

Kanser gelişiminde önemli olan E6 ve E7 proteinleri sırasıyla tümör supresör gen ürünleri olan p53 ve retinoblastoma (RB) proteinine bağlanıp bunların fonksiyonlarını inhibe ederek hücre proliferasyonunda artışa neden olur (51).

Şu ana kadar 100'den fazla HPV tipi tanımlanmıştır. Servikal epitel enfekte eden HPV'ler düşük veya yüksek riskli HPV'ler olarak sınıflandırılmıştır (Tablo 3) .

Genel popülasyonda en sık karşılaşılan HPV tipleri (HPV tip 16, 18, 31, 45) aynı zamanda servikal kanserlerde de sıklıkla görülür (52). HPV tipleri içinde en fazla karsinojen olanı HPV 16'dır ve dünyada CIN III (%45) ve serviks kanserlerinde (%50) en fazla görülen HPV tipidir (53,54). İkinci sırada yer alan HPV 18 ise serviks skuamoz hücreli karsinomların %13'ünde görülmektedir. Bu oran servikal adenokarsinomda ve adenoskuamoz karsinomda HPV 18 için %37'ye kadar çıkmaktadır (54).

Tablo 3. Servikal kanser gelişim riskine göre HPV tiplerinin sınıflandırılması (49).

Düşük riskli HPV tipleri	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81
Yüksek riskli HPV tipleri	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82

HPV cinsel yolla bulaşmaktadır ancak cilt çatlaklarından, kontamine yüzeylerden ve doğum kanalından bulaş görülmektedir (55).

HPV'nin tanısında sitoloji, histoloji ve kolposkopi önemlidir, ancak sadece enfeksiyondan kuşulanmayı sağlar (56). Kesin tanı, polimeraz zinciri reaksiyonu (PCR), nükleik asit amplifikasyon testi ve in situ hibridizasyon gibi tekniklerle HPV DNA'sının saptanması sayesinde konulur (57).

2.2.2 Serviksin Premalign Lezyonları

Bethesda 2001 Klasifikasyonu

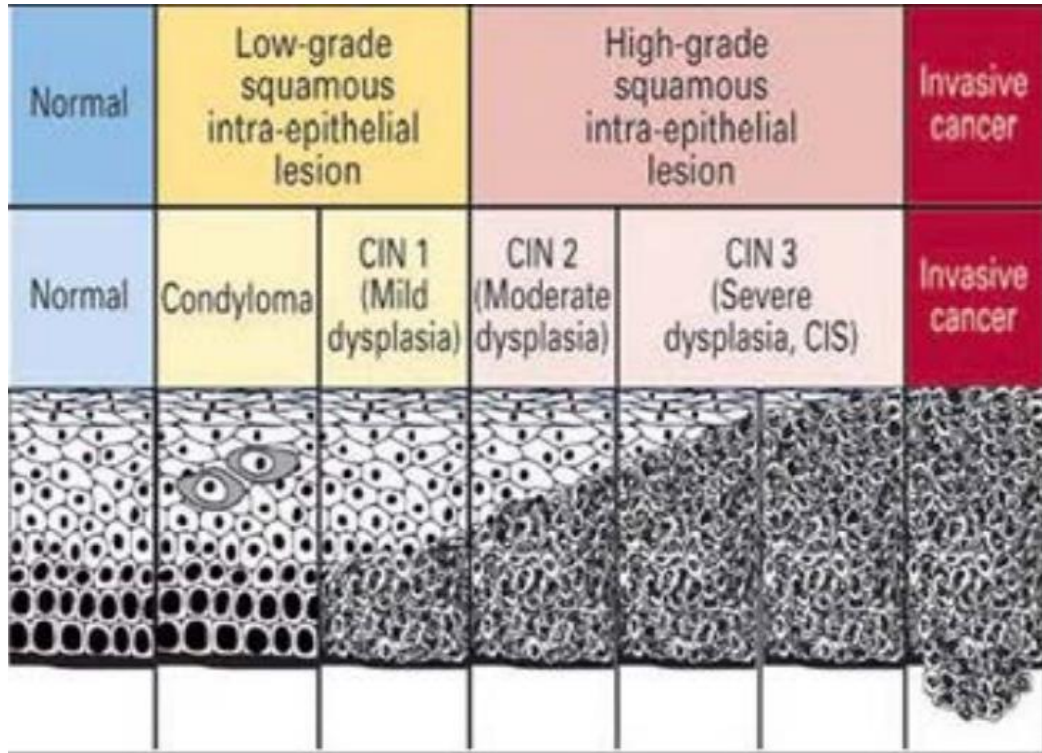
1900 yılında Cullen uterus kanseri ile ilgili eserinde ilk kez invaziv olmayan lezyonlara dikkat çekmiştir. Schauerstein (1908) ve Rubin (1910) süperfisyal metaplastik epitelin yassı epitel hücreli karsinomanın erken evresi olduğuna karar vermişlerdir. 1927 yılında Schiller preinvaziv neoplazi kavramını desteklemiştir. Broders 1932 yılında karsinoma insitu (CIS) terimini kullanmıştır (58). Toplu olarak servikal intraepitelyal neoplazi olarak bilinen bu değişiklikler, yakınma oluşturmadıklarından ve inspeksiyon ve palpasyonla tanınmadığından, servikal sitoloji ile tanınabildiği gösterilmeden önce klinisyenlerce çok yararlı değildi. 1940'larda eksfoliatif sitolojinin Papanicolaou ve Trout tarafından kullanılmasıyla preinvaziv servikal neoplazi kavramı önem kazanmıştır (59).

Reagan ve arkadaşları 1956'da servikste normal epitelyum ile arasında histolojik ve sitolojik farklılıkları gösteren anormallikleri displazi olarak adlandırmış; hafif, orta ve şiddetli olmak üzere 3 gruba ayırmıştır. Displazi ve CIN'in sürekli bir

olayın farklı basamaklarını teşkil ettiğini (Tablo 4) Servikal intraepitelyal lezyon progresyonu) düşünen Richart, 1967 yılında skuamöz hücreli serviks kanserinin preinvaziv komponentini belirlemiş ve servikal intraepitelyal neoplazi (CIN 1, 2, 3) terimini tanımlamıştır. Servikal intraepitelyal neoplazi, derece 1 (CIN1) hafif displazi ile aynı tanımlamadır ve CIN2 orta displaziye benzerdir (Şekil 10). Fakat CIN3 ciddi displazi ile karsinoma in situ'yu bir araya kombine etmiştir ve böylece 4 kategori olan sınıflandırma üçe inmiştir (60).

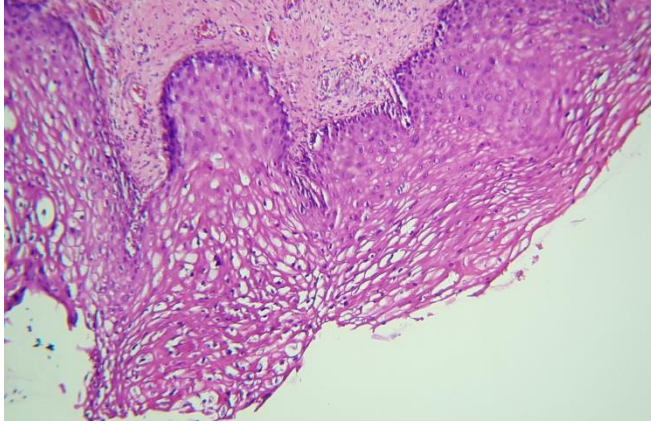
Tablo 4. Servikal intraepitelyal lezyon progresyonu (61,62).

CIN tipi	Regresyon	Kalıcılık	CIN 3'e ilerleme	İnvazyon
CIN 1	%60	%30	%10 (3-4 yıl içinde)	%1
CIN 2	%40	%40	%20	%5
CIN 3	%30	%60		%12 (10 yıl içinde)



Şekil 10. CIN 1, 2, 3 ve displazi karşılığı

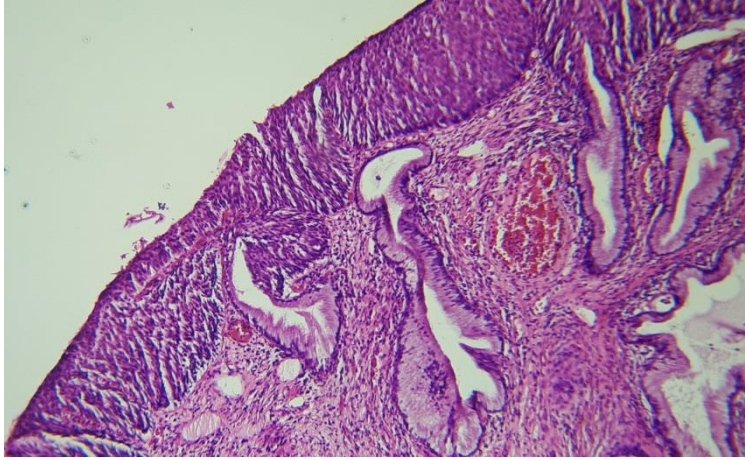
CIN1: Hafif nükleer atipi olabilmesine rağmen çok katlı yassı epitelin üst 2/3'lük kısmının hücreleri normal matürasyon gösterir. Bazal 1/3'lük kısımda ise nükleer anormallikler daha belirgin olup hafif derecededir. Mitoz bulunur fakat çok sayıda değildir. Epitelin 1/3'ünde sınırlıdır, anormal mitoz yapıları nadirdir (63) (Şekil 11).



Şekil 11. CIN 1, H&E, 100x

CIN2: Nükleer atipi yüzeğe kadar izlenebilmesine rağmen epitelin üst yarısı matürdür. Nükleer anormallikler CIN 1'den daha belirgindir. Mitozlar bazal 2/3'de mevcuttur ve anormal formları görülebilir (63).

CIN3: Matürasyon yoktur veya sadece üst 1/3'te sınırlıdır. Nükleer anormallikler epitelin tamamına yakınında izlenir. Mitozlar çok sayıdadır ve epitelin tüm tabakalarında mitozlar sıktır (63) (Şekil 12).



Şekil 12. CIN 3, H&E, 100x

Klinik takibe yardımcı olması ve servikal sitoloji sonuçlarının standardize bir şekilde raporlanması için Bethesda sistemi geliştirildi. Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından 1991 yılında Bethesda'da yapılan iki geniş toplantıda Bethesda Sistemi tanıtıldı ve yayınlandı (64).

Artan sıklıkta kullanılmaya başlanılan ve klinik olarak karışık olan nonspesifik değişiklikleri ifade eden "atipi" terimi çıkartılmaya çalışıldı. Bethesda sistemi sıklıkla koilositoz olarak ifade edilen HPV'ye bağlı değişiklikleri ve hafif displazi ya da CIN1

olarak ifade edilen lezyonları düşük dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon (LGSIL) kategorisi altında topladı. Daha ciddi lezyonlar olan orta ve ciddi displazileri kapsayan CIN2 ve CIN3 yüksek dereceli intraepitelyal lezyon (HGSIL) olarak birleştirildi. Reaktif değişikliklere bağlanmayacak kadar belirgin olan ancak kalitatif ya da kantitatif olarak “skuamoz intraepitelyal lezyon” tanısı alamayacak kadar belirgin olmayan Pap testi sonuçları atipik skuamoz hücreler (ASC) olarak sınıflandırıldı. Bu örnekler daha ileri olarak önemi belirlenemeyen (ASC-US) ya da yüksek dereceli lezyonun dışlanamadığı (ASC-H) sonuçlar olarak ikiye ayrıldı. Bu kısmen servikal transformasyon zonunun kolposkopiyle belirlenmesiyle sağlanmıştır. 1973'te Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sitolojik tanı için bir rapor hazırlamıştır. 1988'de Ulusal Sağlık Enstitüleri, servikal sitoloji için ortak bir konsensusa varmışlar ve Bethesda sistemini getirmişlerdir. Bu sistem 1991 ve 2001 tarihinde yeniden modifiye edilmiştir (65) (Tablo 5).

Tablo 5. Servikal sitoloji klasifikasyon sistemlerinin karşılaştırılması

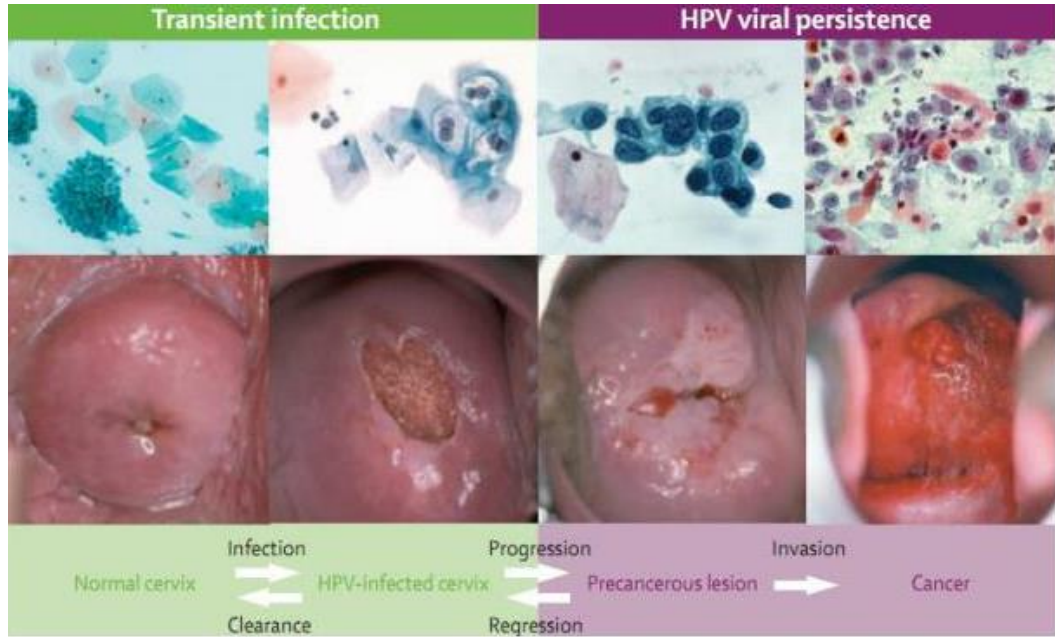
Pap	WHO	CIN	Bethesda
Class I	Normal		Normal
Class II	Atipik inflamasyon		Benign veya ASC
			ASC-US ve ASC-H
	Displazi		SIL
Class III	Hafif	CIN I	LGSIL
	Orta	CIN II	HGSIL
Class IV	Şiddetli	CIN III	
Class V	CIS		

ABD'de 1950'lerden itibaren Pap smearin yaygınlaşmasını takiben invaziv servikal kanser insidansı ve mortalitesi %70'lerden daha fazla düşüş göstermiştir (59).

2.2.3 Serviksin Malign Lezyonları

Servikal epitelde metaplastik olayların anormal gelişimi ile başlayan, servikal intraepitelyal neoplazi ve mikroinvaziv kanser ile devam eden bir sürecin sonunda invaziv serviks kanseri oluşabilir. İnvaziv serviks kanseri, uzun preinvaziv dönemi, tarama programlarının varlığı ve preinvaziv lezyonların etkin tedavisinin mümkün olması nedeniyle önlenebilir bir kanser olarak kabul edilmekle birlikte nadiren de

olsa hızlı bir şekilde ilerleyen serviks kanseri şeklinde de karşımıza çıkabilir (Şekil 13).



Adapted from N Engl J Med 2005; 353: 2101–04.

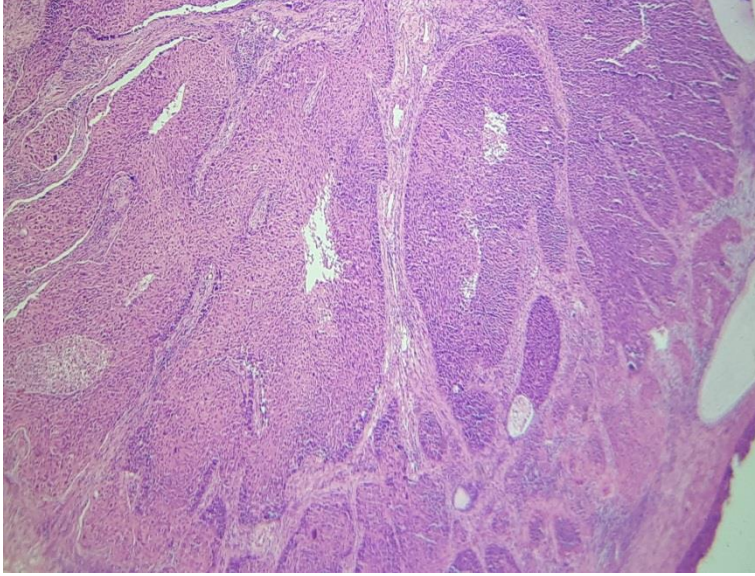
Şekil 13. Genital HPV enfeksiyonunun sonucu (66)

Serviks kanseri yaygın bir kanserdir. Kadınlardaki tüm maligniteler içinde 3. sırada yer almaktadır (67). Gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere oranla çok fazla sayıda görülür. Bu eşitsizlik Pap smear testinin düzenli olarak alınması ve servikal tarama programlarının uygulanmasındaki başarıyı göstermektedir.

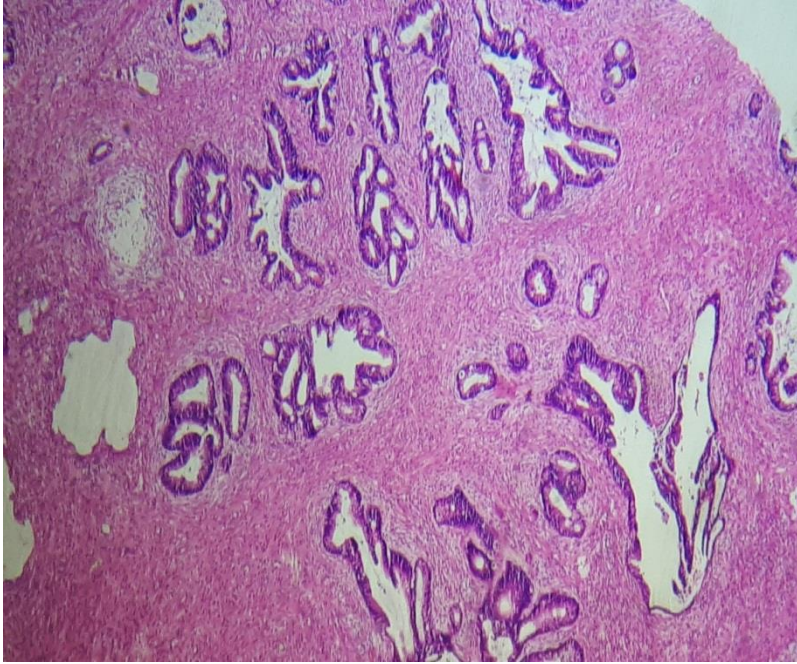
Gelişmekte olan ülkelerde serviks kanseri tanısı alan hastaların %85'inin gelişteki evresi FİGO evrelemesine göre Evre III ve Evre IV'tür (68). Gelişmiş ülkelerde ise tarama testleri daha iyi yapılabildiğinden genelde CIS iken veya mikroinvaziv dönemde tespit edilerek tedavi edilebilmektedir.

Serviks kanserli hastalarda en sık rastlanan semptom vajinal kanamadır. Genellikle postkoital kanama şeklindedir ancak düzensiz veya postmenopozal kanama şeklinde de olabilir. İlerlemiş hastalığı olanlarda bel ağrısı, alt abdominal ağrı, alt ekstremitelerde ödem, obstrüktif üropati, barsak obstrüksiyonu, ciddi anemiye bağlı nefes darlığı ve kaşeksi görülebilmektedir (69).

Serviks kanserinin en sık iki histolojik tipi skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinomdur (Şekil 14 ve 15). Baskın tip olan skuamöz hücreli karsinom serviks kanserlerinin %75'ini oluşturmaktadır (70). Skuamoz hücreli serviks kanserlerinin en iyi prognozlu olanı büyük hücreli keratinize olmayan tipi iken, en kötü prognoza sahip olanı küçük hücreli kanser tipleridir (69).



Şekil 14. Skuamöz hücreli karsinom H&E, 100x



Şekil 15. Adenokarsinoma insitu, H&E, 100x

Servikal kanserler için yaygın bir biçimde kullanılan evreleme sistemi FIGO tarafından geliştirilmiştir (71). Bu evreleme sistemi tümör büyüklüğü ve hastalığın pelvisteki yayılımını esas almaktadır. Erken evre hastalık FIGO evrelemesinin I ile IIa'sını kapsamaktadır. Geç evre hastalık ise IIb ve üstü evreleri içerir.

2.2.4 Serviks Kanseri Epidemiyolojisi

Servikal kanserde etyoloji diğer kanserlere göre daha net belirlenmiştir. HPV ile ilişkisi nettir. En sık 50-59 yaşları arasında görülür. İlk cinsel ilişki yaşının erken olması, cinsel partner sayısının fazla olması, nedeni bilinmemekle beraber sigara kullanımı riski arttıran faktörlerdendir. Bununla birlikte doğum sayısının fazla olması ve oral kontraseptif kullanımı da serviks kanser riskini arttırdığı belirtilmektedir (72,73).

Serviks kanseri ile HPV arasındaki ilişki akciğer kanseri ile sigara arasındaki ilişkiden bile daha fazladır (74). Ancak diğer olası risk faktörleri ile ilgili değişik sonuçlar bildiren çalışmalar mevcuttur. Bu risk faktörlerini aşağıda değerlendirdik:

Koite ve Seksüel Davranış: Servikal kanser, çok partnerli kadınlarda ve erken evlenenlerde daha sık gözükür. Pek çok vaka-kontrol çalışmasında kanser riski, ilk evlenen yaşla ters orantılı bulunmuştur. Örneğin 16 yaşından önce evlenen kadınlarda servikal kanser insidansı 20 yaşından sonra evlenenlerden iki kat daha fazladır (75). Kadının hayatı boyunca ilişkiye girdiği partner sayısı ve bu partnerlerin ilişkiye girdiği kadın sayısı ile yüksek oranda ilişkilidir. Tüm bu bulgular servikal kanserin, cinsel yolla geçen epidemik hastalık gibi davrandığını göstermektedir (59).

Oral Kontraseptifler: Oral kontraseptif kullanımı ile serviks kanseri ilişkisi henüz net değildir. Uzun süre oral kontraseptif kullanımının servikal kanser riskini arttırdığına dair veriler bulunmaktadır. Ancak, HPV pozitif hastaların uzun süreli oral kontraseptif kullanımında riskin 2 kat artmakla sınırlı olduğu düşünülmektedir (76). Risk OKS kullanımını bıraktıktan 10 sene sonra normale dönmektedir (77). 1970'lerden sonra servikal adenokarsinom insidansı ikiye katlanmıştır ve bunun sebepleri arasında oral kontraseptifler yer alabilir (7).

Sigara Kullanımı: Sigara içiminin HPV'ye bir kofaktör gibi davranıp onkojenik enfeksiyonun temizlenmesini önleyip enfeksiyonun artmasını ve daha uzun süre kalmasını sağladığı düşünülmektedir. Sigara ile ilişki, skuamöz hücreli kanserler için net bir şekilde ortaya koyulmuşken, adenokarsinomlar için ilave çalışmalara ihtiyaç vardır (7,78). Ayrıca, detoksifikasyondan sorumlu enzimi kodlayan GST genotipindeki polimorfizmin servikal kanser riskini arttırdığı ileri sürülmüştür (79).

Enfeksiyonlar: 2002'de Smith JS ve ark.'ları tarafından HPV'li kadınlarda, ek olarak Herpes Simpleks Virüs (HSV)-2 ya da Chlamidya Trachomatisle de enfekte olması halinde; bu ajanlarla enfekte olmayanlara göre servikal kanser gelişiminin daha fazla olduğunu yayınlamıştır (80).

Diyet ve Vitaminler: 1995'te yapılan bir çalışmada Liu ve ark.'ları 294 displazili hasta ve 170 kontrol grubunda düşük folat düzeylerinin HPV 16 ile ilişkili olduğunu belirtmiştir (81). Vitamin A deriveleri özellikle de retinoidler normal epitel hücrelerinin büyümesini modüle ederler, hücrelerin farklılaşmasını ve modülasyonunu sağlarlar. Nagata ve ark.'ları, retinol için düşük serum seviyesine sahip kadınların yüksek serum seviyesine sahip kadınlara göre, kanser progresyon oranının daha yüksek bulunduğunu (42).

Dietilstilbestrol (DES): DES ilk üretilen sentetik östrojendir. Geçmişte 1941-1971 yılları arasında erken gebelik kayıpları ve postmenoposal rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmıştır. Maruz kalan kişilerde vajen ve serviks kanseri insidansının arttığı görülmüştür (7).

Multiparite: Multiparite, gebelik esnasında değişen hormonal durum veya immün sistemin kısmen baskılanması ile HPV enfeksiyonu ya da kanser gelişimi için yatkınlık yapabileceği düşünülmüştür (82). Yine, doğum esnasındaki servikal travmanın da kanser gelişimi ile ilgili olabileceği ileri sürülmüştür (83).

İrk: ABD 2001-2005 verilerine göre hispanik ve siyahiler hem insidans hem de mortalite açısından beyaz ırktan daha yüksek oranlara sahipti (84).

Sosyoekonomik Statü: Sosyoekonomi düzeyi düşük kadınların, sağlık hizmetine sınırlı ulaşımı, beslenme ve sağlığı koruyucu davranışlar hakkında yetersiz bilgileri servikal kanser ile ilişkilidir (59,85). Servikal kanser olgularının %80'i gelişmekte olan ülkelerde karşımıza çıkar. Yıllık pap smear taramasının yapılması bir kadının serviks kanserinden ölme riskini %90'lık bir farkla 4/1000'den 5/10000'e düşürmektedir (42). İmmünsupresyon: HPV enfeksiyonunda, hastalığın gerilemesinde immün cevap etkilidir. HPV servikse dökülmekte olan hücrelerden rahatlıkla girebilir ve sitopatik hücre ölümüne yol açmaz. Bundan dolayı doğal immün sistemde küçük bir inflamasyon oluşumunu uyarır (59). Hücre aracılı immün cevap, HPV persistansının önlenmesinde kritik öneme sahiptir. İmmün sistemi baskılanmış olan organ transplant alıcılarının ya da düşük CD4 sayısına (CD4 sayısı<200 /mcl) sahip HIV ile enfekte kadınların servikal HPV persistansı için yüksek riske sahip oldukları gösterilmiştir (86). 1993'te Centers For Disease Control And Prevention, invaziv servikal kanseri AIDS ile görülebilecek hastalıklardan biri saymıştır (59).

2.2.5 HPV Aşı ve Pozoloji

HPV'ye yönelik henüz bir dekat önce geliştirilen aşılardan bivalent human papilloma virüs (2vHPV), kuadrivalan human papilloma virüs (4vHPV) ve nonavalan

human papilloma virüs (9vHPV) olarak sınıflandırılmıştır (87,88). Hangi virüslerden koruduklarına göre isimlendirilmiştir (Tablo 6). Amerikan Bağışıklama Uygulamaları Danışma Komitesi (The Advisory Committee on Immunization Practices-ACIP); 9 yaşından itibaren aşının yapılabileceğini belirtirken, rutin olarak 11-12 yaşlarında HPV aşısını önermektedir (89).

Tablo 6. HPV aşı etkinliği ve pozoloji

Aşı tipi	Etkin olduğu HPV tipleri	Pozoloji (İlk aşıya göre)
Bivalan (2'li) Cervarix	16 ve 18	0., 1. ve 6. Aylarda
Kuadrivalan (4'lü) Gardasil	6,11,16,18	0., 2. Ve 6. aylarda
Nonavalan (9'lu) 9v	6,11,16,18,31,33,45,52,58	0., 2. Ve 6. Aylarda

2.3 SERVİKAL LEZYON TANI, TARAMA YÖNTEMLERİ

2.3.1 Sitolojik Yöntemler

- PAPS
- Sıvı bazlı teknikler
- Kompüterize teknikler (AutoPap-Papnet)

2.3.2 Vizüel Yöntemler

- Asetik asit testi
- Spektroskopi
- Speküloskopi
- Servikografi
- Kolposkopi

2.3.3 Diğer:

- HPV testleri
- Polarprobe

2.3.1 Sitolojik Yöntemler:

Pap Test:

1928'de George Papanicolaou, vajendeki dökülmüş hücreleri incelerken tesadüfen kanser hücrelerini buldu. Papanicolaou 1939'da bir jinekolog olan Traut ile birlikte çalışmış ve "vajinal pool" olarak adlandırdıkları posterior forniksten topladıkları hücreleri inceleyerek serviks kanseri tanısı konabileceğini göstermişlerdir. Ama ilk yayınlarında yanlış negatiflik oranı %40 civarındaydı. 1947'de Dr.Ayre kendi adıyla anılan tahta spatulu oluşturdu. Bu spatulayla transformasyon bölgesinde skuamokolumnar bileşke kazınarak hücreler alınabilmektedir ve yanlış negatif oranı düşüktür (86,90). 2003'de Amerikan Jin&Obst. Dergisinde yayınlanan iki meta-analizin sonuçlarına göre pap testin sensitivitesi %51, spesifitesi ise %90'dır (91).

Gay ve ark.'ları, örnekleme hatalarının %70 ile en sık görülen yanlış negatiflik nedeni olduğunu göstermiştir (92). Yanlış negatif smear sonuçlarının, örnek alınırken gelişen nedenleri lezyonun servikal kanalın içine doğru yerleşmesi, tekniğe uygun alıştırma yetersizlik, anormal hücrelerden örnek alınsa bile bunu lamele aktarılan hücrelerin smear çubuğundan cama aktarılamaması, fiksasyon ve etiketlemedeki yanlışlıklar ve inflamasyondur (93).

Servikal smear 'in yanlış negatif oranını azaltmak için smear alınırken dikkat edilmesi gereken noktalar şu şekilde sıralanabilir:

- Hastanın vajinal kanaması olmamalıdır.
- Menstrüel siklusun proliferatif fazında iken örnek alınması daha uygundur.
- Vajinal spekulum kuru ve steril olmalı, lubrikan kullanılmamalıdır. Lubrikan kullanılırsa hücreler yağ ile örtüleceğinden görüntülenemez.
- Postmenopozal hastalarda endoservikal fırça (cyto-brush) kullanılmalıdır. Bu hastalarda transformasyon zonu yukarılarda olduğu için çok sayıda yumuşak naylon kıldan oluşan bu fırçaların kullanılması transformasyon zonunun örneklenmesini sağlar. Endoservikal fırça eksternal ostan örnekleme yapamayacağı için tek başına kullanılmamalıdır.
- Smeari fikse etmek için %95 'lik alkol, spreye tercih edilmelidir. Hücreler havada kurumadan hemen fiksasyon sağlanmalıdır.
- Smear alınmadan 48 saat önce koit, vajinal duş yapılmamalı, 7 gün önce de vajinal ovüller bırakılmamalıdır (94).

Diğer bir yanlış negatif sonuç sebebi ise değerlendirme hatalarıdır. Sitolog ya da patolog, lamda anormal hücreleri göremeyebilir veya görse bile yanlış yorumlayabilir. İdeal bir smearde 50.000-300.000 arasında hücre vardır. Bunları taramak en az 5 dk almalıdır. Patoloğun bunu inceleyecek yeterli zamanı olmalıdır.

Hataya sebep olan bir başka nokta da sitolojinin güvenilirliğinin tümör invazyonu ile korele olmasıdır. 1 mm invazyon halinde sitolojinin yakalama şansı %14 iken, invazyon 3 mm olduğunda % 88'e çıkmaktadır. Yani asıl tanı için gereksinim olan evrelerde atlama şansı yüksektir (90).

Yapılan çalışmalarda, smearlerin %10-20 kadarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Servikal smearde yetersiz sonuç endoservikal hücrelerin bulunmaması anlamında kullanılır (95).

ABD'deki kanser tarama hatalarının %50'si tarama yapılmamasına, %10'u hatalı tarama yapılmasına, %10'u yanlış takibe, %30'u örneklem ve değerlendirme hatalarına bağlanmıştır (96). Servikal kanser için en büyük risk hiç Pap smear yaptırmamaktır. ABD gibi gelişmiş ülkelerde kadınların % 85'i yaşamları boyunca en az bir kez Pap smear yaptırmış iken az gelişmiş ülkelerde bu oran sadece % 5'tir (97).

Taramanın kimlere yapılması gerektiğiyle ilgili ACS servikal neoplazi tarama rehberine bakarsak:

❖ Tarama Başlangıcı:

-Seksüel aktivite başladıktan üç yıl sonra veya en geç 21 yaşında taramaya başlanmalıdır.

-HIV enfeksiyonu tanısı alan ve/veya immünsüpresif tedavi alan olgularda ilk yıl iki kez, sonuçları negatif ise yılda bir alınmalıdır.

❖ Tarama kesilmesi:

-Üç veya daha fazla dökümante edilebilen teknik yeterli negatif smear ve son on yılda anormal/ pozitif sitoloji yokluğunda 70 yaşından sonra kesilmelidir.

-Serviks kanseri, inutero DES maruziyeti ve/veya immünsüpresif tedavi (HIV+ olgular dahil) uygulanan hastalar da iyi sağlık koşulları olana kadar yılda bir devam edilmelidir.

❖ Histerektomi sonrası:

-Bening jinekolojik nedenlerle total histerektomi yapılmış olgularda CIN2 ve CIN3 varlığı bening kabul edilmemektedir vajinal sitoloji ile takip endike değildir.

-Subtotal histerektomi yapılmış olgularda serviks intakt olgulardaki rehber geçerlidir.

-CIN2 ve CIN3 nedeni ile histerektomize olgularda; üç dökümante edilebilen teknik yeterli negatif sitoloji ve son on yılda anormal/pozitif sitoloji yokluğunda tarama kesilmelidir.

❖ Tarama Aralıkları:

-Konvansiyonel sitoloji ile yılda bir veya sıvı bazlı pap smear ile iki yılda bir tarama yapılmalıdır.

-Hangi teknikle olursa olsun; üç dökümente edilebilen, teknik yeterli negatif smear varlığında 30 yaşından sonra 2 yıl veya 3 yılda bir tarama yapılmalıdır.

-In utero DES maruziyeti HIV+ veya immünsupresif tedavi alanlar, kemoterapi ve kronik kortikosteroid tedavisi alanlar tarama kesilme kriterleri sağlanıncaya kadar düzenli aralıklarla taranmalıdır (7). Bu konuda ACS ve ACOG'un yayınlanan rehberlerinin karşılaştırması tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. ACS ve ACOG'un servikal tarama rehberleri karşılaştırması (98)

Rehber	ACS	ACOG
İlk tarama	21 yaşında ya da ilk vajinal ilişkiden 3 yıl sonra	21 yaşında ya da ilk vajinal ilişkiden 3 yıl sonra
Tarama aralığı	- Konvansiyonel sitoloji için her yıl - Likit baz sitoloji için 2 yılda bir - Arka arkaya 3 normal sonuç varsa 30 yaşından sonra 2-3 yılda bir	- Hem konvansiyonel sitoloji hemde likit baz sitoloji için her yıl örnekleme - Arka arkaya 3 normal sonuç varsa 30 yaşından sonra 2-3 yılda bir
Taramaya son verme	Son 10 yıl içinde arka arkaya 3 normal sonuç varsa 70 yaşının üzerinde son verilebilir	Tarama üst yaş sınırı yok

Papanicolaou'nun bulduğu pap test 1950'den beri servikal kanser insidansını %79, mortaliteyi %70 azaltmıştır (58). Buna rağmen tarama hataları, yanlış takip, sitolojinin yanlış negatifliği nedeniyle ölümler devam etmektedir. Bu yüzden sitolojinin sensitivitesini arttırmak için yeni yöntemler bulunmaya çalışılmıştır.

Sıvı Bazlı Sitolojik Teknikler:

Pap-testteki yalancı negatiflik oranını azaltmak için yeni teknolojiler geliştirilmektedir. Bunlardan biri de likit-baz sitolojidir. Smear klasik tarzda alınır. Daha sonra smear çubuğu özel bir koruyucu solüsyona daldırılır. Likit ortamdan yararlanılarak hazırlanan bu yöntemlerin Thin-prep, Autocyteprep gibi çeşitleri

vardır. Sitoloğun daha iyi görmesi için uniform, hücrelerin kan, mukus ya da inflamatuvar oluşumlarla yapısının bozulma olasılığının azaltıldığı, hücrelerin tabakada iyi bir şekilde dağıldığı, sıvı içinde ince yayma preparatlar geliştirilmiştir. Hücre süspansiyonu kan ve debrisin ayrıştırıldığı bir filtre sistemine konur ve hücre örnekleri 20 mm çapındaki bir lamele yayılır. Böylece lam üzerinde 40000-70000 kadar hücre olur. Bu preparat daha sonra Papanicolaou boyasıyla boyanıp incelenmektedir.

Bu preparat konvansiyonel sitolojiye göre çok daha temizdir. Konvansiyonel sitoloji ile lam üzerine hücrelerin yalnızca %10-20'sini aktarabildiğimiz halde, likit baz sitoloji ile hücrelerin %80-90'ını likit ortama aktarabiliyoruz. İlave olarak likit baz teknoloji ile havada kurumunun önüne de geçilmiş olmaktadır. ABD'de artık çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Thin-prep adı verilen bu teknik Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmıştır (42). Özel sıvı hücreleri uzun süre korur ve ileri tekniklere (HPV gibi) izin verir. Doğruluk oranını arttırdığı ve yanlış negatif sonuçları azalttığı belirtilmektedir (99).

Wilbur ve ark.'larının yaptığı çalışmalardan birinde bir gruba konvansiyonel smear, diğerine Thin-prep uygulanmıştır. Yalancı negatif sonuçlar konvansiyonel pap smear için %15, Thin prep için %4'tür (100).

Kompüterize Teknikler(AutoPap-Papnet):

İki farklı kompüterize teknik; Autopap ve Papnet, FDA'dan onay almıştır. Nükleustaki nükleik asidin akridin oranla boyanması kuvvetine göre slaytlar seçilir (33). Autopap sistemi primer taramada ve ilk değerlendirmede normal olarak kabul edilen örneklerin tekrar taranmasında yani kalite kontrol amaçlı kullanılabilir. Bu teknikte özel dijital kameraya birleştirilmiş otomatik mikroskop kullanılır. Bu sistemde slaytın her köşesi kompüterize teknikle taranır. Kalite kontrol amaçlı kullanıldığında anormal hücre içeren smearlerin %10'u tekrar değerlendirilir. Primer amaçla kullanıldığında negatif olması muhtemel %25 slaytı ayırır. Geriye kalan %75 slayt sitolog tarafından tekrar değerlendirilir (98). Bu teknik yalancı negatif oranını %32 azaltır. Pahalı olduğu için dünya çapında kullanımı yaygın değildir (98).

PapNet sisteminde de, AutoPap sisteminde olduğu gibi yalancı negatiflik oranının düşürüldüğü ve keza yalancı pozitiflik oranının da bu yöntemle yapılan taramalarda düşürüldüğü görülmektedir. Standart manuel sitolojik tarama sonucu negatif değerlendirilen preparatların tekrar değerlendirilmesinde kullanılan bir sistemdir (90). FDA tarafından primer tarama için önerilmeyen bu test, pahalı olduğu için büyük laboratuarlara daha uygundur (42).

ACOG komite kararıyla bu tekniklerdeki yüksek maliyet ve LGSIL olarak tanımlanmış hasta sayısındaki artışın bir sorun olduğunu belirtmiştir. Bu tekniklerden herhangi birinin invaziv servikal kanser insidansını azaltıp azaltmadığı ya da sağkalım oranlarını artırıp artırmadığına dair geniş çaplı prospektif bir çalışma yapılmamıştır. Bu sebeple günümüzde standart uygulamaya girememişlerdir (42).

2.3.2 Vizüel Yöntemler:

Asetik Asit Testleri:

%3-5 asetik asit uygulanmasından sonra serviksin çıplak gözle incelenmesidir. Asetowhite alan görülmesi pozitif test sonucunu vermektedir (101). Basit ve ucuz bir test olduğu için düşük sosyoekonomik seviyelerdeki ülkelerde pap smear testine bir alternatiftir (102). Sensitivitesi %70-80'lerde fakat spesifitesi (%50-70) düşüktür (103). Pap smear testinde sensitivite %44, spesifite %90 kabul edilirken, vizüel asetik asitin sensitivitesi %77 spesifitesi %64 olarak kabul edilir (102). Sitoloji ile desteklenmiş çalışma sayısı çok azdır. Transformasyon zonunda, skuamokolumnar bileşmeye yakın, iyi sınırlı, opak, asetowhite lezyonlar pozitif sonuç olarak değerlendirilir.

Spektroskopi:

Spektroskopi basitçe servikal dokuya gönderilen ve geri gelen ışığın değerlendirilmesidir. Bu muayene sırasında asetik asit kullanılmaz. Yansıyan ışığa göre dokular, normal veya hastalıklı olarak değerlendirilir. Anormal doku ışığı çok daha değişik yansıtacaktır. Hastalıklı dokuda hemoglobin konsantrasyonu, mukozal kalınlaşma, kapiller perfüzyon, nükleer oran, gibi değişiklikler hastalıkla ilgili optik bir imza oluşturacaktır. Bu teknoloji gelişme halindedir. Sensitivite oranları % 62-92 arasındadır (90).

Speküloskopi:

Serviks yüzeyine %3-5'lik asetik asit sürüldükten sonra özel bir ışık kaynağı (ve büyütme - opsiyonel) kullanılarak dokusal değişiklikler değerlendirilir. Kolposkopiden daha spesifik ancak daha az sensitiftir (90).

Servikografi:

Serviks yüzeyine seyreltilmiş asetik asit sürüldükten sonra serviksin yüksek kalitede fotoğrafları çekilir ve uzmanlar tarafından yorumlanır. Sensitivitesi % 50, spesifitesi %88'dir. Hastaları geri çağırma gereksinimi vardır. Avantajı ise ucuz ve kolay bir yöntem olmasıdır (103).

Kolposkopi:

Bu başlık aşağıda ayrıntılı olarak ele alınacaktır.

2.3.3 Vizüel Yöntemler:

HPV-DNA:

HPV'e ait DNA için polimeraz zincir reaksiyonu ile HPV genotipi belirlenir (104).

2.4 KOLPOSKOPİ

Kolposkopinin kelime anlamı vajina içine bakmaktır (colpo ve scope). Kolposkop, serviksin daha kolay ve detaylı incelenmesi amacıyla Hans Hinselmann tarafından 1925 yılında icat edilmiştir. Hinselmann ve arkadaşları kolposkopi ile çok sayıda hasta üzerinde yaptıkları çalışmalarda servikal lezyonlardaki atipik değişiklikleri saptamışlardır (105). O dönemde pek popüler olmasada, 1970'lerden itibaren serviks ve vulva lezyonlarının tanı ve tedavisi için çoğu klinikte kullanıma girmiştir. Üzerinde her ne kadar değişimler olsa da temel ilkeleri Hinselmann tarafından belirlendiği gibidir.

Pap smear testinin ve HPV-DNA testinin birlikte uygulandığı "co-test" olarak adlandırılan tarama testi sonucunda riskli görülen hastalar kolposkopik muayeneye yönlendirilir. Bu hastalardan gereği halinde alınan biyopsi tanı için altın standart yaklaşımdır.

Kolposkopi işleminden önce, hasta rahat bir şekilde modifiye litotomi pozisyonunda yatırılıp dış genital sistem incelendikten sonra, serviksi tamamen ortaya koyacak tarzda spekulum vajinaya yerleştirilir. Serviks incelenir, gerekli görülür ise smear tekrarlanır. Sonrasında iki farklı teknik ile incelemeye devam edilir. Klasik veya uzun kolposkopi tekniği; ilk tanımlanan ve en çok kullanılan tekniktir. Spekulum yerleştirildikten sonra üst vajina ve serviks giderek artan büyütme ile incelenir. Mukus fazlalığı yavaşça alınır. Bu ilk incelemeden sonra, %3-5'lik asetik asit solüsyonu servikse uygulanıp 60-90 saniye kadar beklenir. Ardından serviks ve üst vajina tekrar incelenir. Bu aşamadan sonra serviks ve üst vajinaya Schiller solüsyonu (lugol solüsyonu; %1 iyot, %3 potasyum iyodür karışımı) uygulanır. Glikojenden zengin dokuları koyu renkte boyayan Schiller solüsyonu, anormal epitel hücrelerini glikojenden fakir oldukları için açık renkli alanlar olarak gösterecektir. Teste göre glikojen içermeyen, iyodu tutmayan bölgeler iyot negatif (Schiller pozitif), iyodu tutan, koyu kahverengi boyanan bölgeler ise iyot pozitif (Schiller negatif) olarak isimlendirilir. Başka bir teknik salin tekniğinde ise; asetik asit ve Schiller solüsyonunun subepitelial damar yapısını gizlemesi nedeni ile servikse asetik asit

yerine tuzlu su uygulanmakta, yeşil filtre kullanımı ile de kolposkopik olarak serviksin damarlarını detaylı bir şekilde görmek mümkün olmaktadır.

2.4.1 Enstürmantasyon (Şekil 16)



Şekil 16. Kolposkopi için aletler (sol alttan saat yönünde): Breisky spekulum, biyopsi forseps, küret, oval forseps, Chrobak probu, tenakulum, keskin küret, ThinPrep kabı, üç endoservikal-fırça, asetik asit ve iyot pamukları, Cogan servikal dilatör ve anatomik forseps

Kolposkop: Modern kolposkoplar 6 ile 40 kat büyötmeye izin verebilen mercek sistemi ile ışık sisteminden oluşmaktadır (105). Modern ışık kaynakları tungsten ya da halojen ışıklardır (106). Yeşil filtre kırmızı ışığı emerek vasküler yapıların siyah görünmesini sağlar. Kolposkopideki en önemli aksesuar yapı fotoğraflama ya da video ünitesidir.

Spekulum: Vajina boyutlarına göre değişik boyutlarda seçilebilirler. Uygun bir servikal ve vajinal görüş sağlanmalıdır. Bu amaçla vajinal retraktörlerde seçilebilir.

Endoservikal spekulum: Endoservikal kanalın görüntülenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

Biyopsi forsepsleri: Kevorkian, Tischler-Morgan, Mini-Townsend gibi forsepsler bulunmaktadır. Ayrıca endoservikal kanal küretajı için değişik çap ve uzunlukta keskin küretler de hazır bulundurulmalıdır.

Tenakulum ve polip forsepsleri: Servikal biyopsi sırasında serviksin fiksasyonu için ve polip eksizyonu için tenakulum ihtiyacı duyulabilir.

Chrobak's saund: Normal doku ya da benign tümörler ile temasta elastik bir dirençle karşılaşılır. Bununla beraber yumuşak malign dokuya batar (107).

Diğerleri: Sitoloji için ayre spatulası ve endoservikal fırça, pamuk ya da kare gaz, Schiller solüsyonu, Asetik asit solüsyonu, Monsel solüsyonu.

2.4.2 Kolposkopik Muayene Tekniği

Pozisyon:

Hasta litotomi pozisyonunda yatırılır. Spekulumla serviks ve forniksler açığa çıkarılır.

Smear alınması:

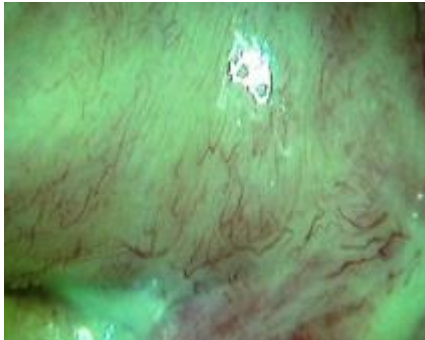
Smear muayeneye başlarken ve asetik asit uygulamadan alınmalıdır. Yaklaşık 5 günlük vajinal duş yapılmamış olması ve lokal tedavi uygulanmamış olması tercih edilir (107). Smear kolposkopi rehberliğinde asetik asit uygulamadan kolposkopide görülebilir bir anormal lezyon ya da transformasyon zonundan alınabilir. Fakat tüm serviksin örneklenmesi tercih edilmektedir (107).

Direkt bakış:

Serum fizyolojik ile ıslatılmış bir gaz ile serviks nazikçe mukustan temizlenir. Önce çıplak gözle sonra kolposkop ile serviks vizüalize edilir. Multipar serviksin dudakları ters çevrilmeli bu sayede endoservikal kanalın aşağı kısmı görülmelidir (107). Direk bakışta renk değişiklikleri, normal doku ile lezyonlar arasındaki yüzeysel kontur ya da marjinler dikkatlice kaydedilmelidir.

Yeşil filtre ile bakış:

Vasküler yapıların daha net incelenmesini sağlar. Atipik damarlanmanın olup olmadığı araştırılır. Yöntem daha zor olmasına karşın, tecrübeli bir kolposkopist asetik asit testine göre daha yüksek oranla histolojik değişimi tahmin edebilir. Bu yöntem Kolstad tarafından geliştirilmiştir (106).



Şekil 17. Yeşil filtrede vasküler yapıların görülmesi

Asetik asit testi:

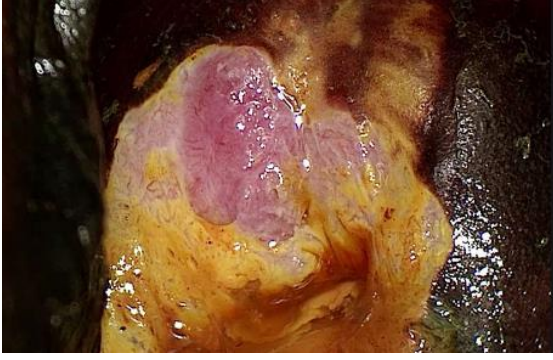
Hinselmann servikal mukustan kurtulmak için % 3'lük asetik asit kullanmıştır (108). Asetik asit mukus aglütinasyonuna neden olarak ortamdan uzaklaştırır. Serviksin temizliği kolposkopik muayenenin kalitesini artırdığı söylenmiştir (107). Asetik asit kolumnar epitelin şişmesine neden olarak beyaz üzüm benzeri şekle dönüşmesine yol açar. Ayrıca anormal transformasyon zonu lezyonlarının da tanımlanmasına yardımcı olmaktadır (109). Asetik asitin etkisi hücrenin içerdiği nükleer protein miktarına bağlı olduğundan ve anormal beyaz epitelde daha yüksek oranda protein olduğundan bu epitelde maksimum oranda asetik asit tutulumu olacaktır. Böylece ışığın geçişi engellenmiş olacaktır. Asetik asitin patolojik epiteldeki etkisi kolumnar epitelde olduğu kadar hızlı değildir. Asetik asit uygulaması sonrası görülen beyaz epitel lökoplaki ile karıştırılmamalıdır. Asetik asit olmadan kolposkopik muayene tamamlanamaz (107).



Şekil 18 . Asetik asit uygulanmasından sonra izlenen asetowhite epitel

Schiller testi:

İyodin testi ilk kez 1929'da Schiller tarafından tanımlanmış ve kullanılmıştır (110). O zamandan beri hala kullanılmaktadır. Schiller (Lugol) testi, servikal biyopsi için en uygun yerin bulunmasında kesin bir yardımcıdır (111). Glukojeni yoğun miktarda içeren normal skuamöz epitel tarafından tutulur, fakat kolumnar epitel ile anormal epitel tarafından tutulmamaktadır (112).



Şekil 19. Schiller testi sonrası iodin negatif kolumnar epitelyum

Kolposkopik bulguların dökümantasyonu:

Kolposkopta bulunan bir fotoğraf makinesi ya da videokolposkop ile bulgular arşivlenmelidir.

Biyopsi:

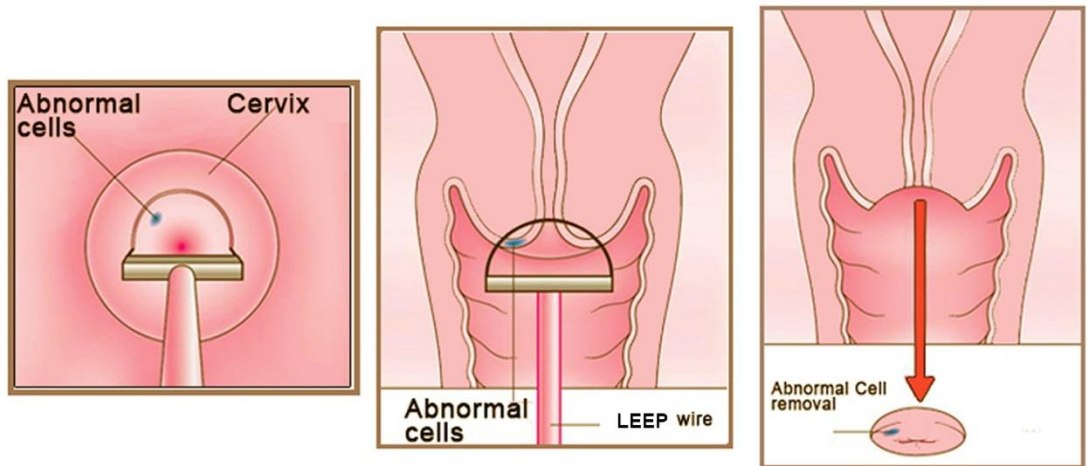
Yalnızca kolposkopik muayene sonrasında biyopsi alınmalıdır. Bu lezyonun genişliğine göre punch biyopsi, LEEP ya da endoservikal küretaj şeklinde olabilir.

Punch biyopsi:

Kolposkopik kontrol altında biyopsi yapılacak alana doğru biyopsi forsepsi yönlendirilir. Kolposkopik muayenenin hedefi biyopsi alınacak hedefi belirlemedir (107).

Loop diathermy excision (LEEP):

Bu teknik sayesinde tanımlanan lezyonun tam eksizyonu ile tedavisi mümkün olabilmektedir. Hekime tek seferde “gör ve tedavi et” şansı tanımaktadır. Kesme ve koagülasyon aynı anda sağlanmaktadır (113). İşlem genel ya da lokal anestezi gerektirir. İşlem sonrası hemostaz için top başlı elektrod ile sağlanır.



Şekil 20. LEEP işlemi ve işlem sonrasında spesimen

Endoservikal küretaj:

Daha çok skuamokolumnar bileşkenin yukarıdaki şüpheli anormallikleri yakalamak için uygulanmaktadır (114). İşlem ağırlıdır, hasta bu konuda uyarılmalıdır. Kolposkopik muayenenin yetersiz olduğu durumlarda veya kolposkopik muayenede sitolojide belirtilen anormalligi açıklayacak bulgu yoksa ECC yapılmalıdır (90). ECC internal os'tan eksternal os'a kadar olan bölgeden yapılmalıdır. Küretaj sırasında küreti çıkarmadan tüm kanal çevresi kürete edilmeli ve bu işlem iki kez tekrarlanmalıdır (42).

2.4.3 Kolposkopi endikasyonları (115)

- Anormal smear sonucu olan olgular
- HPV pozitif (HPV 16-18) kadınlar
- Vulvar, vajinal ya da servikal kondilomu olan kadınlar
- Serviksin muayenesinde klinik şüpheli varlığında
- Postkoital kanaması olan kadınlar

2.4.4 Kolposkopik morfoloji

Kolposkopik bulguların yorumlanmasının en yararlı yolu kolpofotograflardır. Bazen aynı görüntü farklı histolojilerde görülebilir, bu paradoksta ancak histolojinin bilinmesi sorunu çözer (107).

Skuamöz epitel:

Skuamöz epitel yüzeyi düzgün olup gland açıklıkları ile kesintiye uğramaz (107). Reprodüktif dönemde genelde mat kırmızı renktedir. Bu soluk kırmızıdan pembeye kadar değişebilir (107). Skuamöz epitelde astik asit uygulamasından sonra renk değişimi gözlenmezken içerdiği yüksek glikojenden dolayı Schiller testinde kuvvetli iyot tutar.

Atrofik skuamöz epitel:

Menopozdan sonra östojen replasmanı yapılmadığı durumlarda epitel incelik, glikojen içeriği azalır ve stromal kan akımı azalır. Bu değişiklikler epitelin soluk görünmesine ve kapiller damar ağında incelmeye yol açar. Bu değişimler yaygın olabilir ya da adacıklar şeklinde olabilir ve bu durum iodinün düzensiz alınımından dolayı alacalı görünüme yol açar. Yaşlılarda epitel glikojenin tamamen kaybına bağlı olarak açık kahverengi ya da sarı görünüm kazanır (107). Epitelin inceliği

terminal damarları minör travmalara karşı daha hassas hale getirir ve bu durum subepitelyal hemoraji ve erozyonlara yol açar.

Kolumnar epitel:

Normal kolumnar epitel villöz görünümündedir. Tek katlı olduğundan dolayı altındaki vasküler yapılar daha belirgindir bu da epitelin renginin daha kırmızı görünmesine neden olur. Asetik asit uygulamasından sonra villöz yapı belirgin beyaz görünür (112).

Transformasyon zonu:

Nonspesifik kırmızı bir alan olarak görünür. Asetik asit uygulaması ile grimsi beyazımsı bir renk şeklinde görünür. Zon içinde gland ağızları ve küçük adacıklar şeklinde kolumnar epitel bulunur. Orijinal skuamöz epitelden sınırları net olarak ayırt edilemez (107). Transformasyon zonundaki bez açıklıklarının olması, retansiyon kistlerinin olması ve kapiller ağların daha belirgin olması, kolumnar epiteli orijinal skuamöz epitelden ayırt edilebilir. İmmatür ya da aktif metaplazi sürecindeki epitelin asetowhite olduğu ve anormal epitelle karışması kolay olduğu için tanımak zordur. Copleason ve Reid metaplazinin kolposkopik olarak tanınabilecek üç aşamadan geçtiğini tanımlamıştır.

Stage 1: Kolumnar epitel villuslarının ışık geçirgenliği azalmıştır ve villuslar buzlu cam gibi görünürler.

Stage 2: Üzüm benzeri konfigürasyon kaybolmuş, komşu villuslar birleşmiş ve aralarındaki boşluk dolmuştur.

Stage 3: Villöz yapı tamamen kaybolmuş, ışık geçirgenliği giderek azalan yeni bir yüzey teşekkül etmiştir. Villusların birleşimi onucu artık normal yassı hücreli bir epitel görünümü oluşmuştur.

Vasküler yapılar:

Skuamöz epitelde ilk kez Koller ve Kolstad tarafından tanımlanan 4 kapiller tipi ayırt edilebilir (106).

Saç tokası şeklinde kapillerler: Bu tipteki terminal vasküler yapılar, bir halka oluşturan, çekince kalibrasyondaki bir inen bir de çıkan daldan oluşurlar. Eğer yüzey epiteli çok ince ise kolposkopide tüm bir halkayı izlemek olasıdır. Ancak genellikle halkanın uç kısımları izlenir. Böylece kolposkopide yoğun ve düzenli olarak dizilmiş küçük noktacıklar olarak görülürler (112).

Ağ kapillerleri: Bazan yassı hücreli epitelin terminal kapillerleri birbirleri ile ağ şeklinde bağlantı yapan çok ince, oldukça düzensiz bir yapı oluşturabilirler (112).

Çift kapillerler: Saç tokası tipindeki terminal kapillerlerin, halkalarının ucunda iki ya da daha fazla çıkıntı olduğu zaman bu terim kullanılır. Şekilleri, çatal, geyik boynuzu ya da yonca yaprağına benzeyebilir. Bu tip görünüm çoğunlukla *Trichomonas vaginalis* enfeksiyonlarında görülmektedir (112).

Dallanma gösteren damarlar: Daha büyük yapıdaki terminal damarlar irregüler bir dallanma paterni gösterirler. Ancak düzenli şekilde dal verdikçe daha ince bir kalibrasyonlara ulaşır, ince bir ağ yapısı ile sonlanırlar. Sadece transformasyon zonunda izlenirler. Özellikle retansiyon duvarlarında ya da gland ve yarıkların ağızlarında izlenirler. Orijinal yassı hücreli epitel; tipik olarak düzgün pembe görünümü ile karakterizedir. Şayet yüzeyi temizleyip SF ile ısıtılırsa tipik aç tokası şeklindeki kapillerler kolaylıkla izlenebilir (112).

2.4.5 Anormal kolposkopik morfoloji

Lökoplaki:

Lökoplaki genellikle çıplak gözle görülebilir. Bazen kolposkopi gerekebilir. Histolojik olarak lökoplaki parakeratoz ve gerçek keratinizasyona karşıdır, ama bu kolposkopik olarak saptanamaz. Kolposkopik olarak yama tarzı beyaz düzenli görünüm parakeratoza karşılık gelirken, hiperkeratoz kalın düzensiz yüzeyli plaklar şeklinde izlenir (107). Eğer keratin tabakası tamamen ortadan kaldırılırsa alttaki epitelin sıklıkla punktuasyon gösterdiği görülür. Hinsellman bunu zemin lökoplakişi olarak tanımamıştır (105). Lökoplaki transformasyon zonu içinde ya da dışında olabilir. Dışında olduğunda; orijinal skuamöz epitelden köken almaktadır. Lökoplaki ile ilgili önemli bir husus; alttaki epitelin kolposkopik olarak tahmin edilememesidir (107). Topografik çalışmalar göstermiştir ki; tedavi gerektiren lökoplakiler transformasyon zonu dışındakilerdir ve bunların % 38 i CIN, % 62 si bening akantotik epitelidir.

Anormal vasküler görünüm:

Garip dağılımlı kaba dallanmalar yaparlar. Gelişimlerinden tümör anjiogenezis faktör sorumludur. Neoplastik dokuyu hızlı beslemek için hızlı proliferasyon olurlar. Sistemik olmayıp düzensiz dallanmalar gösterirler. Kolposkopide değişik çaplarda asimetric görünürler. Epiteli kaplayan birkaç hücre tabakası ile yüzeyel olarak doğarlar. Genellikle horizontal olarak seyrederek. Sıklıkla kısa dallanmalar yaparlar. İmmatür metaplazi ve karsinom bulgusu olabilirler. Görüldüğünde biyopsi yapılması zorunludur (116). İnterkapiller mesafe ortalama 50 ile 200 mikrometre

arasındadır. Displazi ağırlaştıkça mesafe artar. CIN I'de ortalama 200 mikrometre iken, CIN II'de 450-500 mikrometreye varabilir (117).



Şekil 21. Yeşil filtrede atipik vasküler yapıların görünümü

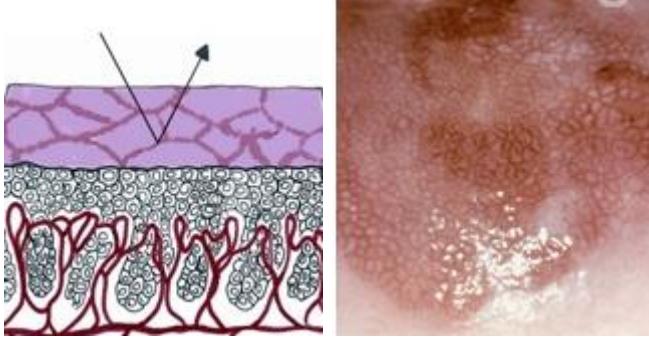
Puntuasyon:

Puntuasyon, lökoplakinin keratin tabakası altında oluşabilir. Genellikle puntuasyon bez açıklıkları, nabotian folikülleri ya da transformasyon zonunun diğer bulgularının olmadığı üniformite gösteren yüzeylerde görülür. Puntuasyon derecesi alttaki epitel anormalliğın derecesi ile paralel olarak değişir (107). Puntuasyonun tipi kolposkopik değerlendirmede karar verdirici değere sahiptir. Pratikte tanısal değeri olan 2 tip puntuasyon vardır. İnce ve kaba puntuasyon. Her zaman mümkün olmasa da 2 tip arasında ayırımı sağlayan iyi tanısal kriterler vardır. Bu bulgular her zaman şüphe ile karşılanmalı ve biyopsi alınmalıdır. Genellikle ince puntuasyon eşit derecede ince mozaizm ile beraberdir. İnce fokal puntuasyonlar enflamasyon nedeni ile olabilir, fakat iodin testinden sonra bu alanlar iodin tutarak sınırları kaybolur. Kaba puntuasyonda peteşiler daha belirgindir ve aynı zamanda geniş şekilde yayılmıştır. Asetik asit uygulamasından sonra kaba puntuasyonlar onu çevreleyen yüzey epitelinden belirgin farklı şekilde görülür.

Mozaizm:

İnce ve kaba olmak üzere ikiye ayrılır. İnce mozaizm keskin sınırlardan oluşmaktadır. Asetik asit uygulamadan önce görünüm nonspesifik olabilir ama bez açıklıkları ve retansiyon kistleri yoktur. Asetik asit uygulamadan sonra gri beyaz renk değişikliği belirgin görülür ve sınırlar netleşerek kan damarları daha az şüpheli olur (107). Mozaizm soluk kırmızı çizgilerden oluşan bir ağ tarafından belirlenir.

Genellikle mozaizmin ince ya da kaba olduğunu sınıflamak zor olup bu lezyonlar genellikle LGSIL tarafından oluşur.



Şekil 22. Mozaizm

Kaba mozaizm mozaik paternin oldukça belirgin şekilde irregüler formu ile karakterizedir ve fissürler oldukça belirgindir. Transformasyon zonu dışında orijinal skuamöz epitelde bulunabilir. İzole bölgelerde de görülüp diğer lezyonlarla beraberlik gösterebilirler. Diğer lezyonlarla beraber olduğunda daha periferde yerleşik olan lezyonlar genelde LGSIL ya da sadece akantotik epitelidir. Topografik çalışmalarda mozaizm ya da punktuaston % 84 oranında transformasyon zonu dışında görülmüştür. Transformasyon zonu dışındakilerde % 70 benign akantotik epitele % 30 CIN a karşılık gelir. Transformasyon zonu içinde ise %80 CIN görülür (118).

Atipik Transformasyon zonu:

Atipik transformasyon zonu terimini; lökoplaki, punktuasyon ve mozaizm gibi tüm anormal kolposkopik bulguları pratik olarak gösteren kapsayıcı bir terim olarak kullanmak yanlıştır. Çünkü bu lezyonlar transformasyon zonu dışında da yer alırlar. Transformasyon konseptini tüm kolposkopik lezyonlar için genişletmek mümkündür, çünkü tüm atipik epiteller kolumnar ya da orijinal skuamöz epitel olsun transformasyon nedeniyle oluşur. Transformasyon zonu terimini kolumnar epitelin skuamöz epitele dönüşüğü alanlar olarak anlamak gerekir (107). Bu alan ektopinin varlığı ile karakterizedir. Aksine skuamöz epitel içinde gerçekleşen potansiyel değişimler tahmin edilemez. Bu nedenle servikal kanserin bir atipik transformasyon zonundan kaynaklandığı terimi yanlıştır. Herhangi bir yanlış anlamadan kaçınmak için "beyaz epitelle" eş anlamlı "atipik transformasyon zonu" terimi kullanılmaya devam edilmektedir (109). Beyaz epitel, mozaizm, punktuasyon ya da lökoplaki göstermez ve genellikle bez ağızları hatta retansiyon kistleri içerir. Beyaz epitel

genellikle normal transformasyon zonu gibi olmasına rağmen bir çok önemli farklılıklar gösterir. Bu nedenle transformasyonun belirteçleri (örneğin bez ağzları, retansiyon kistleri, rezidüel kolumnar epitel adaları) açısından skuamokolimar bileşke ile benzerdir fakat aşağıdaki özelliklerden bir ya da daha fazlası ile normalden ayrılır (109).

Göze çarpmayan İodin sarı bölgeler:

Kolposkopik muayenede iodin test kullanılırsa ve eklenirse iyi sınırlanmış iyot sarı alanlar görülecektir. Bu iodin sarı alanlar diğer lezyonlarla beraber olabilir. Kolposkopik olarak göze çarpmayan iyoın sarı alanlar genellikle benignig akantoik epitelden oluşmaktadır. Bu alanlarda neoplazi riski düşüktür (107).

Erken invaziv karsinom bulguları:

Stroma içine yalnızca milimetrik boyutta ulaşmış karsinom koloskop ile görünmeyebilir. Bu alanlar daha çok CIN içerirler. Erken invaziv karinomun kolposkopik bulguları indirektir. Erken invaziv karsinom ihtimali lezyonun genişliği ile paralel olarak artar. Bununla beraber değişik tipte lezyonlar bir arada olduğu zaman erken invaziv karsinom riski de artmaktadır. Atipik vasküler yapılar olduğunda invazyon şüphesi vardır. Tamamı küçük olup kötü vaskülarite gösteren lezyonlar invaziv olabilir. Şaşırtıcı olarak; kolposkopik bulguların çok az olduğu erken invaziv karsinom vakaları da vardır. Mikroinvaziv karsinomanın belirlenmesi lezyonun genişliği ve lokalizasyonuna bağlıdır. Erken mikroinvaziv karsinom tamamen endoservikal kanal içinde ise herhangi bir bulguya rastlanmayabilir. Atipik damarların fokal toplanmasıyla karakterize ektoservikal lezyonlar yüksek derecede mikroinvaziv karsinom riski taşırlar. Atipik damarlar daima irregüler özelliktedirler ve kanamaya yatkındırlar. Bir miktar geniş vasküler yapılar lezyon dışında önemsiz çaprazlanmalar yapabilir ya da polipoid yapılar oluşturabilir. Eğer lezyon endoservikal kanala doğru gelişim gösteriyorsa kolposkopik olarak tanısı güçtür ama imkansız değildir. İnvazyonu tahmin edebilme ancak olgulardan alınan konizasyon spismentlerindeki histolojik ile kolposkopik bulguların dikkatli retrospektif analizi ile mümkündür (107).



Şekil 23. Mikroinvaziv karsinom olgusu

İnvaziv karsinoma:

Ektoserviksteki invaziv karsinoma çıplak gözle görülebilir. Tümör tamamen endoservikal kanal içinde olsa dahi kolposkopiyle görülebilir. Büyük tümörlere bağlı olarak ektoserviks görünümü bozulur. Ekzofitik lezyonlar geniş mantarsı tümörler gibi vajinaya sarkabilirler. Tersine endofitik lezyonlar sadece kırmızı ya da beyaz aşınmış alanlar olarak görülebilirler. Bunlar yüzeysel papiller yapıları ve atipik damarları sayesinde tanınabilirler. Yüzeyi ülser ve düz endofitik karsinomanın çıplak göz ya da kolposkopiyle tanısı güç olabilir. Bu tip olgularda palpasyon ve Chrobak's saund'un kullanılması ayırimda değerli bilgiler verir. İnvaziv karsinoma kısmen endofitik kısmen ekzofitik görülür. Çoğu eksternal oza yakın yerleşmeye eğilimlidirler. Yüzeysel invaziv karsinomlar sıklıkla karnıbahar gibi düzensiz yarıkların olduğu yüzeysel görünüme sahiptirler. Eğer papilla bir derceye kadar düzenli görünüme sahip ise ektopi ile karıştırılabilir. Ülerasyon ve doku harabiyetinin derecesi çoğu büyümüş tümörlerde daha belirgindir. Bazen tümör sapsız ya da düz papilla şeklinde görülebilir. Chrobak's saund'un kullanılması ve vasküler yapısı sayesinde benign papilladan ayırt edilebilir. Bir keratotik yüzey ile endofitik tümör daha ileri bir tanısal problem gösterebilir. Keratotik lezyonlardan biyopsi alınması ile hatalardan kaçınılabılır. Keratotik lezyonun histolojik doğasının kolposkop ile tahmini daha zordur, çünkü epitel keratin tarafından maskelenmiştir.

İnvaziv karsinom olguları atipik vasküler yapıların tanınması için iyi bir fırsattır. Bu asetik asit uygulamadan önce kuru bir gaz ile serviksin dikkatli bir şekilde temizlenmesiyle olur. İnvaziv lezyonlar asetik asit uygulaması ile daha belirgin olurlar (107).



Şekil 24. İnvaziv karsinom: düzensiz yüzey konturu

Adenokarsinoma insitu ve mikroinvaziv adenokarsinoma:

Adenokarsinoma in situ ya da mikoinvaziv adenokarsinoma dışındurecek kolposkopik bulgu yoktur (119). Çünkü bu lezyonlar genellikle CIN I ile beraber görülür ve CIN'in içerdiği kolposkopik değişimler izlenir. Ayrıca atipik glandüler epitel genellikle glandin kriptalarına lokalizedir. Yüzeyel olduğunda sıklıkla frajildir. Bir dereceye kadar geniş olan mikroinvaziv adenokarsinoma nadiren kolposkop ile görülebilir fakat bu durumda skuamöz hücreli karsinomdan ayırt edilmesi güç olabilir (107).

Kondilomatöz lezyonlar:

Serviksteki düz kondilomatöz lezyonların tanımı kolposkopi için kritiktir (120). Kolposkopik kolpitin anlatımı kolposkopik tanıya yeni bir boyut kattı. Kondiloma accuminata genellikle kolposkopik olarak kolayca tanınır. Eksternal os'tan izoledir, bununla beraber ekzofitik karsinomla karışabilir. Bu ikisini ayırmada Chrobak's saund yararlı olabilir. Yüzeyel kondilomatöz lezyon klasik olarak papiller yapıdadır. Yapısal detayları keratin tarafından maskelenebilir. Kondilomların renkleri keratinizasyonun derecesine göre değişir ve açık kırmızıdan beyaza kadar değişen renklerde görülebilir. Kondilomlar sıklıkla multipl olup değişik boyutlardadırlar. Daha yüksek büyütmelede kondilom içindeki damarlar virgöl, tırbüşon ya da boynuzsu şekilde görülebilir ve bunlar göreceli olarak geniş çaplarından dolayı malignite şüphesi uyandırabilirler. Düz ve pürüzsüz olanlar hiperkeratozisin bir sonucu olarak tipik inci gibi görünme eğilimindedirler. Tipik ve atipik kondilomlar arasında şüpheli

kriterler ortaya konmamıştır (121). Kaba mozaizm ve punktuasyon hem CIN hem de akantoik epitelde görülebilir. Schiller testinde; kondilomatöz lezyonlar ve aynı lezyonun yüzeyi farklı iyot tutma eğilimindedirler. Bu durum fokal keratin üretiminden kaynaklanabilir. Bu nedenle iyot tutulumu noktasaldır. Benzer görünümlü kondilomatöz ve nonkondilomatöz lezyonları anlayabilmek için Reid ve arkadaşları subklinik HPV enfeksiyonunu destekleyen bir sınıflama önerdiler (122). Arada bir kondilomatöz lezyonda depo edilen glikojenin derecesine göre iyodin pozitif mozaizm ya da punktuasyon tanımlandı. Bu tablonun daima kondilomatöz lezyonlardan dolayı olup olmadığı ve tipik olup olmadığı açık değildir. Ne olursa olsun uzun stromal papilla ile ilişkili glikojen içeren epitel tarafından oluşturulan mozaik gibi lezyonlardır. Bunlar düz kondilomların karakterlerini gösterirler. İyodin pozitif lezyonlar; iyot uygulamasından önce inci benzeri yüzeylerinden başka nonspesifik bir şekilde de görülebilirler.

2.4.6 KARIŞIK KOLPOSKOPİK BULGULAR

İnflamatuvar değişiklikler:

Vajinanın diffüz inflamasyonu nonspesifik kolposkopik görünüme sahiptir. Kapiller dilatasyonun eşlik ettiği stromanın yamalı infiltratif inflamasyonundan dolayı bazı fokal lezyonların görünümü önem kazanır. Tanısal güçlükler focusla daha büyük olduklarında ortaya çıkarlar ve kolayca ayırt edilebilirler. Trikomonal enfeksiyon görüntüsü tipik köpük şeklinde görülür. Sekresyonlar uzaklaştırıldığında çok sayıda kırmızı nokta görülebilir. İnflamatuvar fokuslar serviks yüzeyinde dağılmışlardır. Asetik asit uygulamasından sonra bu kırmızı noktalar beyazımsı renk alırlar. Skuamöz epitel inflamasyondan dolayı daima gevşektir. Epitelin hasarlanması glikojenin kaybına neden olabilir, bu durumda iyodin test negatif olabilir. İnflamatuvar değişikliklerde iyodin test sonucu tipik olarak leopar derisi şeklinde kendini gösterir. Çilek servisitisi uniform 5 mm genişliğinde kırmızı noktasal görüntüyle karakterizedir. Bu değişiklik de genellikle *Trichomonas vaginalis* enfeksiyonundan kaynaklanmaktadır. İnflame alan daima iyodin negatif ve marjini belirsizdir. Çoğu olguda vajina da tutulmuştur (107).

Polip:

Polipler endoservikal kanal içinde, daha uzak yerleşimli olsalar dahi kolposkop ile rahatlıkla görülebilirler. Kolpokopide hedef polipleri belirlemek ve onların yüzey değişimlerini genel kolposkopik kriterlere göre değerlendirmektir. Polip skuamöz epitelten gelişebilir, bu durumda tipik üzüm benzeri görüntüsü ile

tanınacaktır. Çok sıklıkla polip düzgün yüzeyli skuamöz epitel ile örtülür. Poliplerin sınırları belirgindir. Nadiren epitel atipik olabilir ve kolposkopik değişiklikleri serviksin diğer bölgelerindeki atipik değişimlerine uyar. Polip tek ya da çok sayıda olabilir. Ektopi, transformasyon zonundan ya da serviksin diğer herhangi bir bölgesinden kaynaklanabilir. Ara sıra kanayan polipoid yapılar görülebilir ve bunlar endometrial kanserin ya da vagene sarkan myomların habercisi olabilirler (107).

Kolposkopide displaziyle karışabilecek durumlar ise şöyle sıralanabilir (Tablo 8):

-İnflamasyonda, epiteldeki stromaya ait papilla yüzeye doğru uzanır ve stroma papillaları içindeki basit kapiller yumaklar genellikle iki veya daha fazla 'taç' oluşturarak punktuasyonu taklit edebilen çatala benzer bir görüntü oluşturur. Ancak inflamasyonda olay gerçek punktuasyondaki gibi fokal olmayıp, yaygındır ve sınırları keskin bir şekilde belirlenmemiştir.

-Menapozda epitel incelik ve alttaki kapillerler yüzeye daha yakınlaştıkları için daha belirgin gözüktürler. Bu kapillerlerin değişik görünüşleri atipik damarlanmayla karıştırılabilir.

-Granülasyon dokusunda kan damarlarının yoğunluğunda ve neovaskülarizasyon sahasında artış vardır. Ancak burada dokunun asetik asite cevabı daha az yoğundur.

-Gebelikte serviksin damar ve lenfatik ağında bir artış olur, stromada da beraberinde ödem vardır. Bu durumda punktuasyondakine benzer bir görünüm ortaya çıkar, ancak inflamasyondaki gibi buradaki bulgular da tüm vajina ve serviksi içine alacak şekilde yaygındır (44).

-Kondilamatöz değişiklikler kolposkopiyle kolaylıkla görülebilir. Bunlar çoğunlukla displastik değişikliklerle ilgili değildir. Kondilamatöz değişiklikler, damarsal değişikliklerin olmayışı ve lezyonların yukarı doğru çıkıntı yapmasıyla displaziden ayrılır (44).

Konizasyon sonrası değişimler:

Konizasyon sonrası serviks skuamöz epitel ile kaplanır ve düzgün görünüme sahiptir. Skuamokolumnar bileşke eksternal os'ta tekrar belirir. Bazen konizasyon sonrasında gelişen skar dokusu açık bir şekilde ektopiye benzer bir çıkıntı yapabilir ve bu durum diğer anomalilerle karıştırılabilir. Fakat bu durumda alanın Schiller testi ile kahverengi benzeri lekeleniği görülür. Epitel altındaki skar dokusundan dolayı lekelenme ince bir şekilde görülür. Bu durum stromanın kolposkopik görünüme nasıl etki edebileceğinin iyi bir örneğidir. Konizasyondan altı hafta sonra skar yayılabilir. LEEP konizasyondan sonraki değişiklikler de soğuk konizasyon değişikliklerine

benzerdir. Takip eden kolposkopilerde doğru teknik ile skuamokolumnar bileşke görülebilir. Laser vaporizasyon teknikleri ile mükemmel kozmetik sonuçlar elde edilir. Eksik konizasyondan kaynaklanan rezidüel lezyonlar yeni oluşmuş eksternal os bölgesinde takip eden kolposkopik muayenede saptanabilir. Sturmdorf sütürü kısmen kötü kozmetik sonuca yol açtığı için konizasyon sonrası uygulanması terkedilmiştir.

Tablo 8. Kolposkopi için Uluslararası Servikal Patoloji ve Kolposkopi Federasyonu (IFCPC) sınıflandırması (123)

I	Normal kolposkopik bulgular	Orijinal skuamöz epitel Kolumnar epitel Transformasyon zonu
II	Anormal kolposkopik bulgular	Asetowhite alan İnce ve kaba mozaizm İnce ve kaba punktuasyon İyot kısmi pozitifliği İyot negatif (Schiller pozitif) Atipik damarlanma
III	İnvaziv kanseri düşündürülen kolposkopik özellikler	
IV	Yetersiz kolposkopi	Skuamokolumnar bileşke'nin görülmemesi Ağır enflamasyon, travma veya atrofi Serviksin görülememesi
V	Diğer bulgular	Kondilom Keratozis Erozyon İnflamasyon Atrofi Desiduoöz Polip

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız retrospektif olarak dizayn edilmiş olup, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğine servikal kanser tarama programı sonucu pozitif olduğu için refere edilerek kolposkopik değerlendirmesi yapılan hastaların dosyaları incelenmiştir. Hastaların başvuru sırasındaki klinik özellikleri ve bulguları, kolposkopi sonuçları, sosyodemografik özellikleri hasta dosyaları değerlendirilerek derlenmiştir. Çalışma kapsamında 01 Ocak 2015 – 01 Kasım 2019 tarihleri arasındaki dosyalar taranmıştır. Çalışma için Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Etik Komitesi'nden 19.11.2019 tarih ve 20 sayılı toplantı kararı ile Etik Kurul izni alınmıştır.

Hastaların dosya bilgilerine hastane arşivinden ve elektronik veritabanından ulaşılmıştır.

3.1 Çalışmaya dahil olma kriterleri:

- ✓ Pozitif servikal kanser tarama testi sonucu nedeni ile kliniğimizde kolposkopik değerlendirmesi yapılan hastalardan kolposkopik değerlendirmede sağlıklı olarak tanımlanmayan hastalar (Şekil 25)

3.2 Çalışmadan dışlanma kriterleri:

- ✓ Kolposkopik muayenenin tamamlanamamış olması.
- ✓ Daha önceden bilinen servikal displazi ve veya bu amaçla gerçekleştirilmiş cerrahi girişim öyküsü.
- ✓ Dosya bilgilerine ulaşılamayan hastalar



Şekil 25. Kolposkopi Cihazı

Bu kriterler kapsamında 30 düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LGSIL) ve 30 yüksek dereceli intraepitelyal lezyon (HGSIL) olmak üzere toplam 60 hasta belirlenmiş ve analiz için bilgileri değerlendirilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen servikal intraepitelyal lezyon materyallerine ait Hematoksilen Eozin boyalı keşitler tekrar incelenerek, lezyonlara ait alanlar lam üzerinde işaretlendi. Ayrıca, servikal intraepitelyal lezyonlar derecelerine göre gruplandırıldı. Sonrasında, ait oldukları lama ait parafin bloklardan keşit uygun kalınlıkta (yaklaşık 3-5 µm) kesilerek ve pozitif yüklü cam slayt üzerine yerleştirildi. Doku keşitini içeren slaytlar 53-65°C'lik bir etüvde en az 2 saat (24 saati aşmayacak şekilde) kurutuldu.

3.3 İmmünohistokimyasal İnceleme

Çalışmamızda immünohistokimyasal boyamalar için boyama prospektüsünde önerilen talimatlar doğrultusunda boyama işlemi gerçekleştirildi (124,125). Ayrıca, tüm boyamalar için *ultraView* Universal DAB detection kiti kullanıldı.

CD3 (Ventana, predilüe-otomatik kullanıma hazır antikor; CONFIRM anti-CD3 (2GV6) Tavşan (Rabbit) monoklonal Primer Antikor, Tucson, Arizona 85755, USA). Boyamaya ait prospektüste yer alan ve uygulanan prosedür tablo 9'da sunulmuştur.

Tablo 9. BenchMark ULTRA ve BenchMark XT cihazları üzerindeki *ultraView* Universal DAB Detection Kit ile CONFIRM anti-CD3 (2GV6) antikoruna için Önerilen Boyama Protokolü.

Prosedür Tipi	Yöntem
Deparafinizasyon	Seçili
Cell Conditioning (CC) (Antijen Ortaya Çıkarma)	BenchMark ULTRA cihazı Cell Conditioning 1, Hafif BenchMark XT cihazı Cell Conditioning 1, Hafif
Enzim (Protease)	Seçili yok
Antikor (Ana)	BenchMark ULTRA cihazı 20 dakika, 36°C BenchMark XT cihazı 16 dakika, 37°C
Arka Plan Boyası	Hematoksilen II, 4 dakika

Arka Plan Boyama Sonrası	Bluing, 4 dakika
---------------------------------	------------------

CD4 (Ventana, predilüe- otomatik kullanıma hazır antikor; CONFIRM anti-CD4 (SP35) Tavşan (Rabbit) Monoklonal Primer Antikor, Tucson, Arizona 85755, USA). Boyamaya ait prosedür tablo 10'da sunulmuştur.

Tablo 10. BenchMark XT ve BenchMark ULTRA üzerinde *ultraView* Universal DAB Detection Kit ile CONFIRM anti-CD4 (SP35) için Önerilen Boyama Protokolü

Prosedür Tipi	Yöntem
Deparafinizasyon	Seçili
Hücre Hazırlama (Antijen Ortaya Çıkarma)	Standard Cell Conditioning 1
Enzim (Proteaz)	Gerekli değildir
Antikor (Primer) Enkübyasyonu	BenchMark XT için Yaklaşık 16 Dakika, 37°C BenchMark ULTRA için Yaklaşık 32 Dakika, 36°C
Karşıt Boya	Hematoksilen II, 4 dakika
Karşıt Boya Sonrası	Bluing, 4 dakika

CD5 (Ventana, predilüe- otomatik kullanıma hazır antikor; CONFIRM anti-CD5 (SP19) Tavşan (Rabbit) Monoklonal Primer Antikor, Tucson, Arizona 85755 USA). Boyamaya ait prosedür tablo 11'de sunulmuştur.

Tablo 11. *ultraView* Universal DAB Detection Kit kullanılarak BenchMark XT/BenchMark ULTRA cihazları ile CONFIRM anti-CD5 (SP19) Tavşan Monoklonal Primer Antikoru için Önerilen Boyama Protokolleri.

Prosedür Tipi	Yöntem
Deparafinizasyon	Seçili
Hücre Hazırlama (Antijen Ortaya Çıkarma)	Standard Cell Conditioning 1
Enzim (Proteaz)	Gerekli değildir

Antikor Enküasyonu	(Primer)	BenchMark XT için Yaklaşık 16 Dakika, 37°C BenchMark ULTRA için Yaklaşık 32 Dakika, 36°C
Karşı Boya		Hematoksilen II, 4 dakika
Karşı Boya Sonrası		Bluing, 4 dakika

CD8 (Ventana, predilüe- otomatik kullanıma hazır antikor; CONFIRM anti-CD8 (SP57) Tavşan (Rabbit) Monoklonal Primer Antikor, Tucson, Arizona 85755 USA). Boyamaya ait prosedür tablo 12'de sunulmuştur.

Tablo 12. BenchMark XT/BenchMark ULTRA cihazları üzerindeki *ultraView* Universal DAB Detection Kit ile CONFIRM anti-CD8 (SP57) antikoru için Önerilen Boyama Protokolü

Prosedür Tipi	Yöntem	
	XT	ULTRA
Deparafinizasyon	Seçili	Seçili
Hücre Hazırlama (Antijen Ortaya Çıkarma)	CC1 Standart	ULTRA CC1 64 Dakika, 95°C
Antikor (Primer)	16 dakika, 37°C	20 dakika, 36°C
Antikor Seyreltici ile ultraBlock aşaması (Önerilir)	8 dakika	
Karşı Boya	Hematoksilen II, 4 dakika	
Karşı Boyama Sonrası	Bluing, 4 dakika	

PD1 (CD279) (Cell Marque, predilüe-otomatik kullanıma hazır antikor; Fare (Mouse) monoklonal, klon: NAT105, Rocklin, CA 95677, USA). Boyamaya ait prosedür tablo 13'de sunulmuştur.

Tablo 13. PD1 için, BenchMark IHC/ISH enstrümanlarında ultraView Universal DAB saptama kiti ile önerilen boyama protokolü.

ultraView™	üzerinde	Önerilen	Boyama	Protokolü
1.	Slaytları, antikor ve ultraView™ saptama seti dispenserlerini	BenchMark®		aletine yükleyin.
2.	CC1 yumuşak ön işleme	seçin.		
3.	Antikor inkübasyonu	37°C'de 16 dakika	olarak	ayarlanmalıdır.
4.	Çalıştırın.			
5.	Boyama turu tamamlandığında,	slaytları aletten alın	ve yıkama	tamponuyla iyice durulayın.
6.	Kapağı kapatın.			



Şekil 26.



Şekil 27.

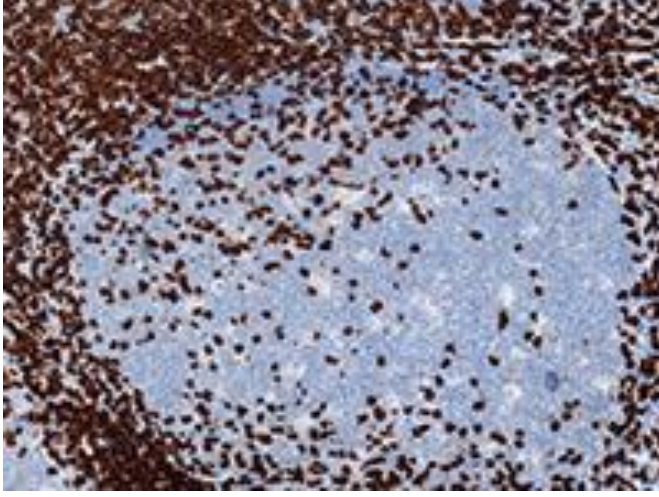


Şekil 28.

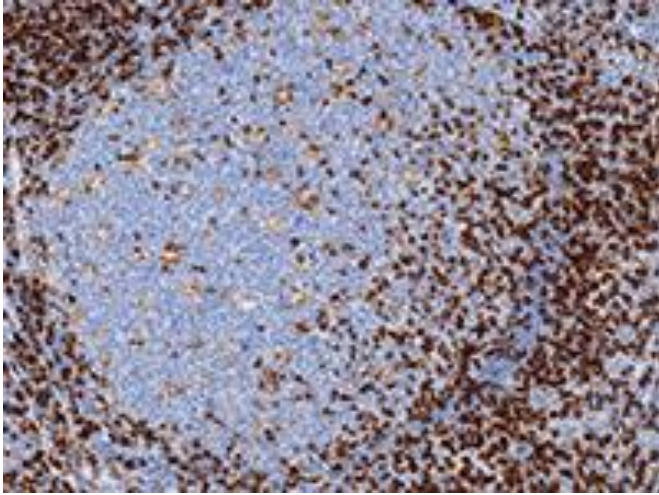
(Şekil 26, 27 ve 28 sırasıyla; Ventana Benchmark ULTRA™, Ventana Benchmark XT™ ve Nikon eclipse e200 mikroskop)

Seçilen parafin bloklardan lizinli lam üzerine alınan yaklaşık 3-5 mikron kalınlığında keşitlere Ventana Benchmark ULTRA™ (Şekil 26) ve Ventana Benchmark XT™ (Şekil 27) tam otomatik boyama cihazlarında immünohistokimyasal

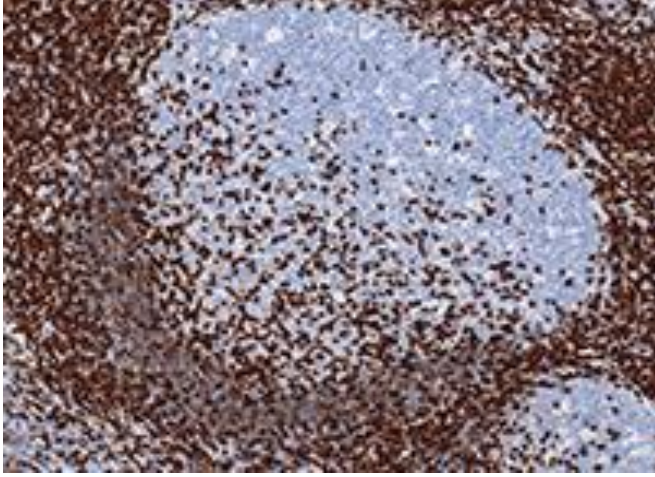
boyama işlemi uygulandı. İmmünohistokimyasal boyamada negatif kontrol için primer antikor aşaması atlandı. İncelenen lamlar biri patolojik olmak üzere en az iki araştırmacı tarafından Nikon eclipse e200 mikroskop ile değerlendirildi (Şekil 28) (126). Pozitif kontrol için her blokta bulunan talimatname de yer alan dokular değerlendirildi (124) (Şekil 29, 30, 31, 32, 33).



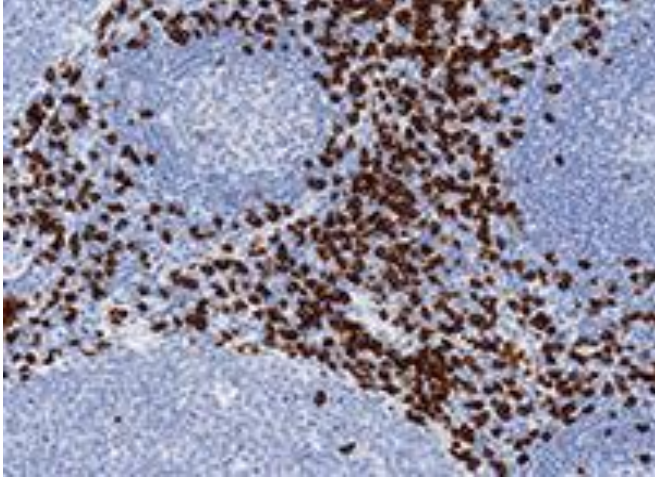
Şekil 29. CD3 için pozitif kontrol, tonsil, 150x



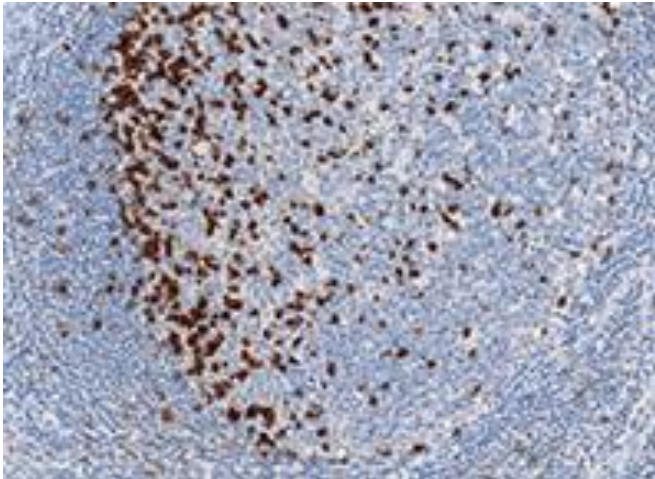
Şekil 30 . CD4 için pozitif kontrol, tonsil, 150x



Şekil 31. CD5 için pozitif kontrol, tonsil, 150x



Şekil 32. CD8 için pozitif kontrol, tonsil, 200x



Şekil 33. PD1 için pozitif kontrol, tonsil, 200x

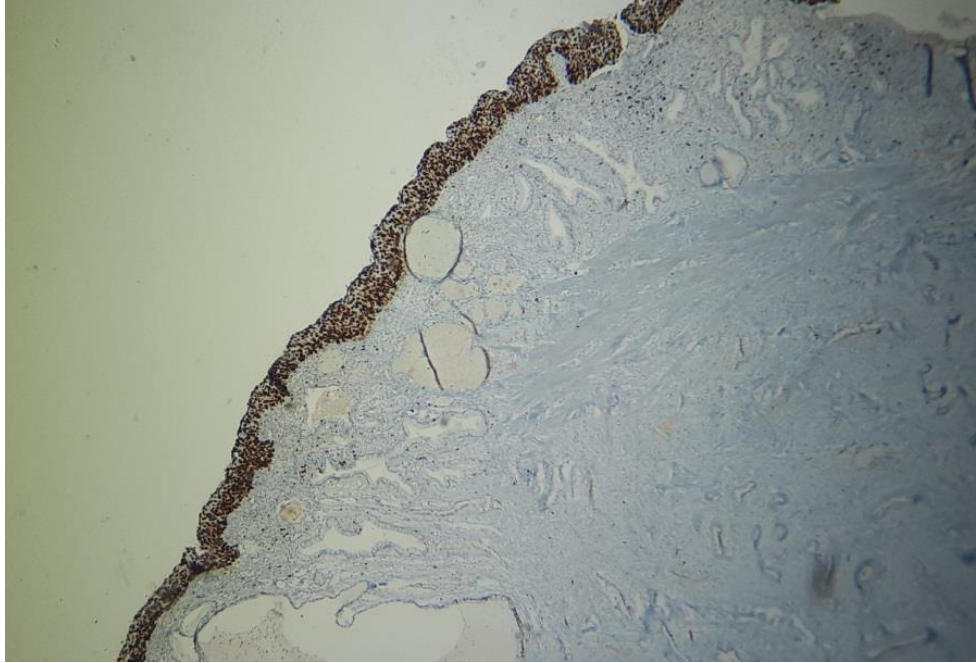
3.4 İstatiksel Değerlendirme

Nicel sürekli değişkenlerin (yaş gibi) tanımsal değerleri standart tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerle incelenmiştir (aritmetik ortalama, standart sapma, medyan gibi). Kategorik değişkenler (varlık sıklıkları) frekansları ve toplam içindeki yüzdeleri ile birlikte verilmiştir. Nicel ölçümlerin değerlendirilmesi, verilerin dağılım özelliklerine göre, "Student's t test" veya "Wilcoxon signed rank test" kullanılarak yapılmıştır. Kategorik değişkenlerin kıyaslamaları, olgu dağılımlarının durumuna göre Chi-square ya da Fischer's Exact Test ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 İmmünohistokimyasal boyanma özellikleri

Hastalara ait arşivde tutulan Ki67 boyamaya ait lamlar tekrar incelendi. İmmünohistokimyasal incelemede Ki67 pozitifliği, nükleer boyanma olarak izlendi. Ki67, proliferasyon belirleyicisidir ve displazide ekspresyonu artmaktadır. Hücre proliferasyonu, mitoz sayımı, flow sitometri, timidin labelling indeks veya immünohistokimyasal olarak, hücre siklusu içerisinde yapılan proteinlerin (Ki67, siklinler vb.) tayini ile ölçülebilir. Yüksek proliferasyon hızına sahip tümörlerin prognozu daha kötüdür (127) (Şekil 34).

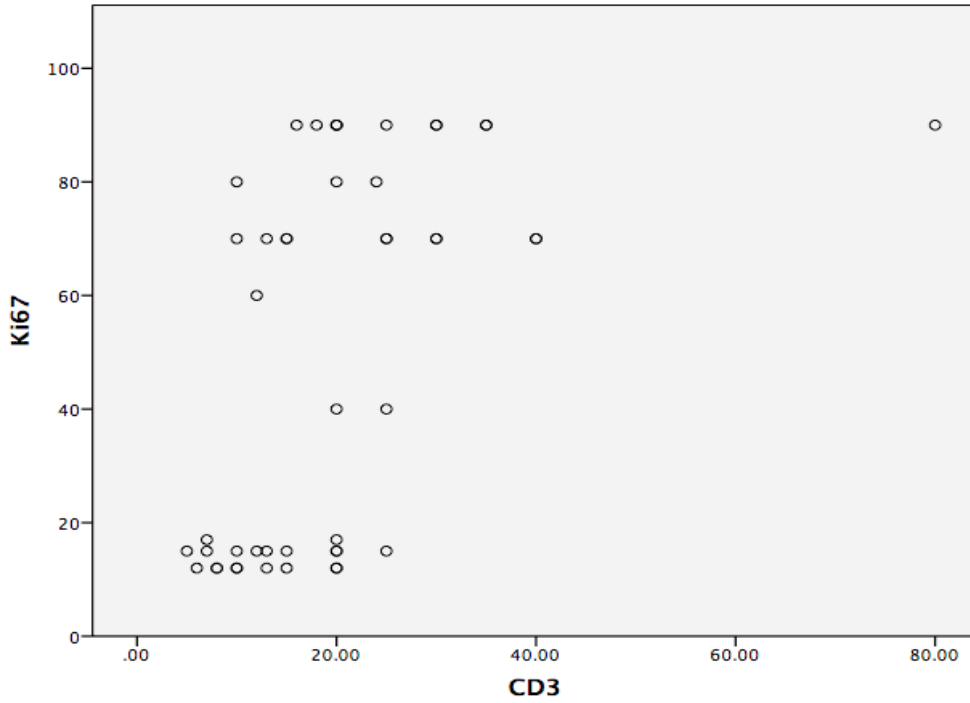


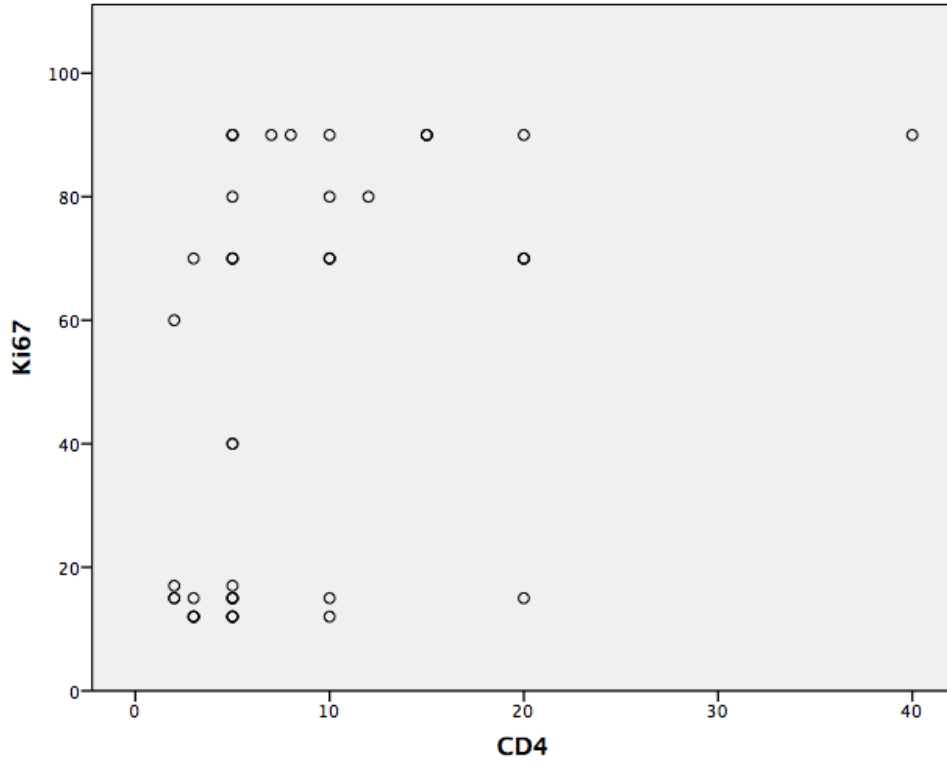
Şekil 34. CIN III alanında epitelde Ki67 için tam kat boyanma, İHK, 100x

Kolposkopi sonrası histopatolojik tanısı LGSIL veya HGSIL olarak gelen toplamda 60 hasta analize dahil edilmiştir. Tüm olgulara CD3, CD4, CD8, CD5 ve PD-1 immünohistokimya boyaması yapılmış olup boyamanın sellülerite yüzdesi epitel (lezyon içerisi) ve stromada ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Analiz edilen hastaların ortalama yaşı LGSIL grubunda 52.0 ± 9.0 ve HGSIL grubunda 40.3 ± 8.7 olarak saptanmış idi ($p < 0.05$).

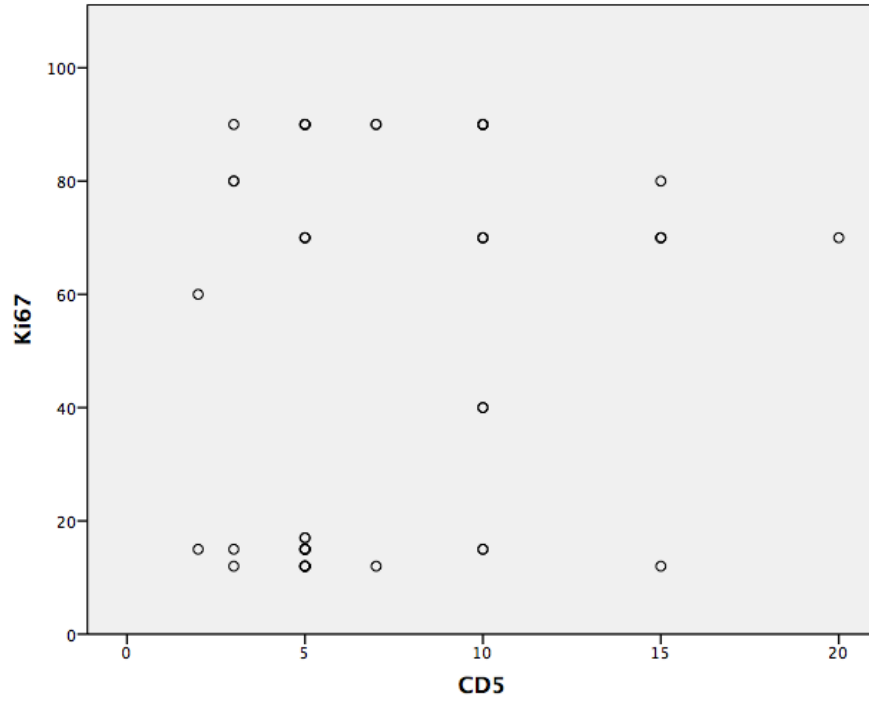
Yeniden değerlendirilen keşitlerde lezyon sınırları içerisinde ve lezyonun stromasında görülen TIL yüzde olarak kaydedildi (128).

Ki-67 proliferasyon endeksi ile epitelyal CD3, CD4, CD8 ve CD5 arasındaki ilişki karşılaştırılmıştır (Şekil 35, 36, 37 ve 38). Yapılan bivariat korelasyon analizinde pearson korelasyon katsayıları şu şekilde bulunmuştur: CD3 için 0,51 ($p<0,001$); CD4 için 0,45 ($p=0,002$); CD8 için 0,49 ($p<0,001$); CD5 için 0,25 ($p=0,09$).

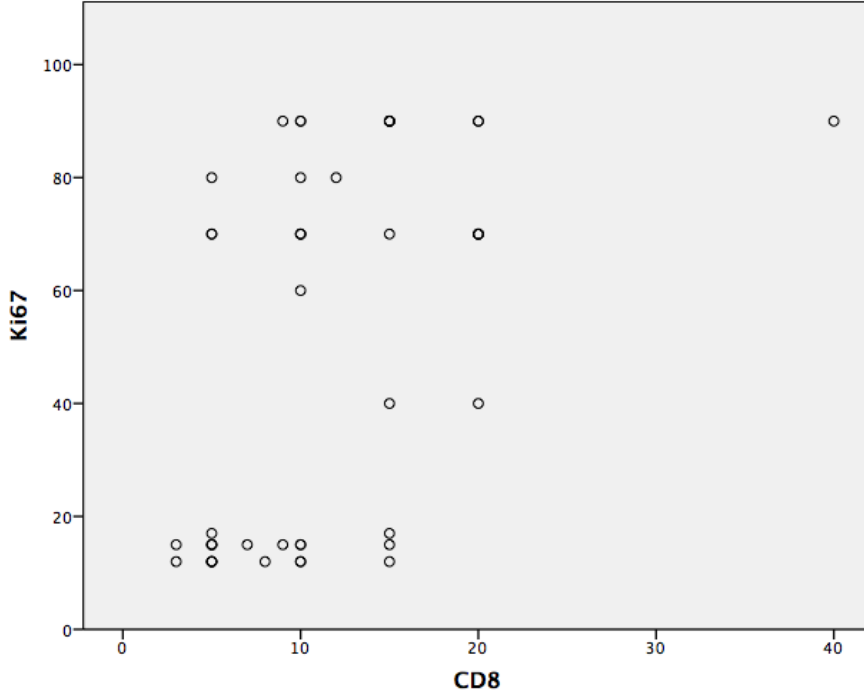




Şekil 36. Epitelyal CD4 boyanması ile Ki-67 arasındaki ilişki



Şekil 37. Epitelyal CD5 boyanması ile Ki-67 arasındaki ilişki



Şekil 38. Epitelyal CD8 boyanması ile Ki-67 arasındaki ilişki

CONFIRM anti-CD3 (2GV6) antikorunu, CD3 epsilon zincirinin karboksi terminal bölgesinden sentetik bir peptide karşı üretilen bir tavşan monoklonal antikorudur. CD3 epsilon zinciri; T lenfositleri, doğal katil (Natural Killer-NK) hücreler ve T-hücre ile NK-hücre neoplazmlarında ifade edilir (129). CD3 boya çoğunlukla olgun T-hücrelerinin zarında bulunmakla birlikte, pro-timosit ve NK hücrelerinin sitoplazmasında da bulunur (130). CONFIRM anti-CD3 (2GV6) antikorunu için selüler boyama modeli membranöz ve/veya sitoplazmikdir. LGSIL ve HGSIL tanılı hastalarda epitel içerisinde ve stromaya ait CD3 için immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi sırasıyla tablo 14 ve 15’de sunulmuştur.

Tablo 14. LGSIL ve HGSIL tanılarında epitel içerisinde CD3 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi

CD3 boyanması	LGSIL olguları N=30	HGSIL olguları N=30	p değeri

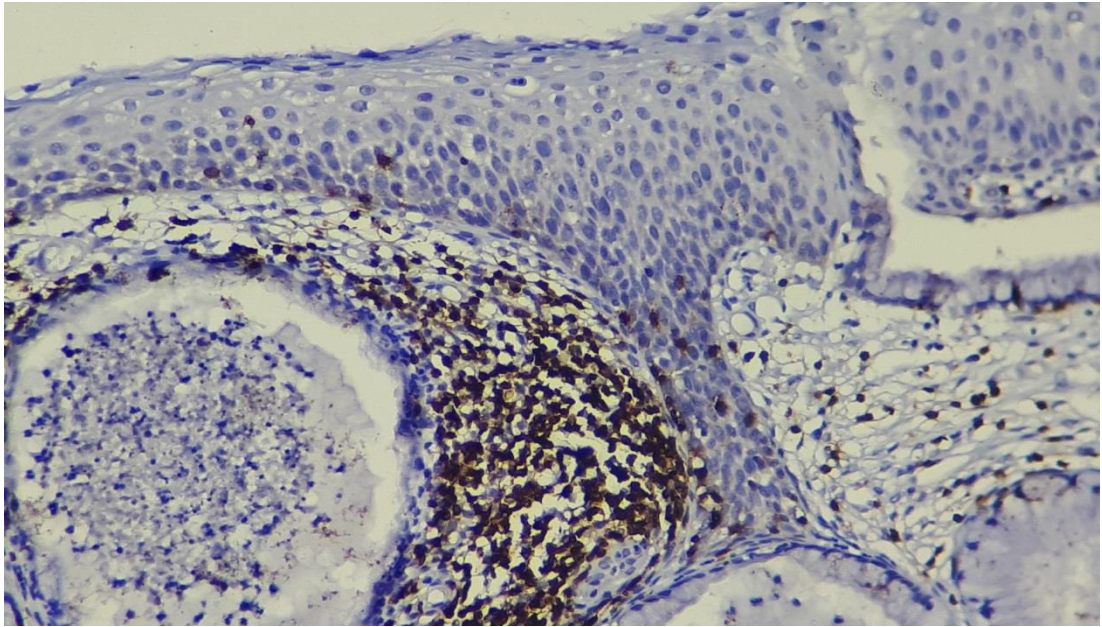
Ortalama	13,2	24,4	<0,001
Standart deviasyon	5,1	13,5	
Ortanca	12,5	22,00	
İnterkuartal aralık	6,75	15,00	

LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon

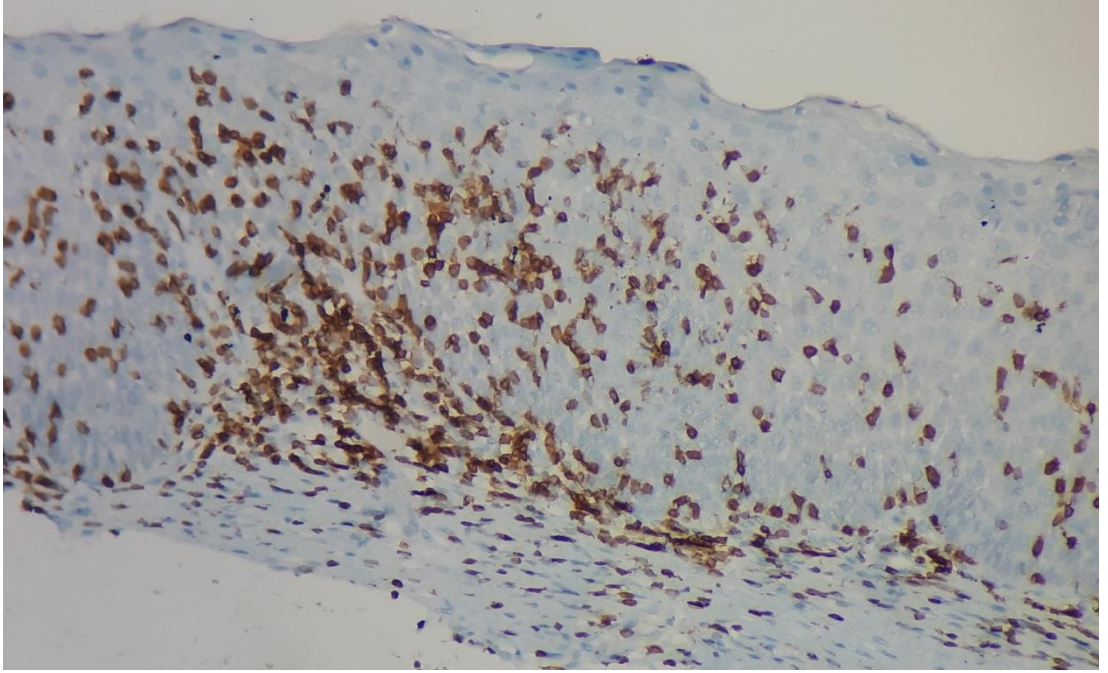
Tablo 15. LGSIL ve HGSIL tanılarında stroma içerisinde CD3 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi

CD3 boyanması	LGSIL olguları N=30	HGSIL olguları N=30	p değeri
Ortalama	37,43	55,80	0,006
Standart deviasyon	18,38	29,57	
Ortanca	30,00	50,00	
İnterkuartal aralık	25,00	36,25	

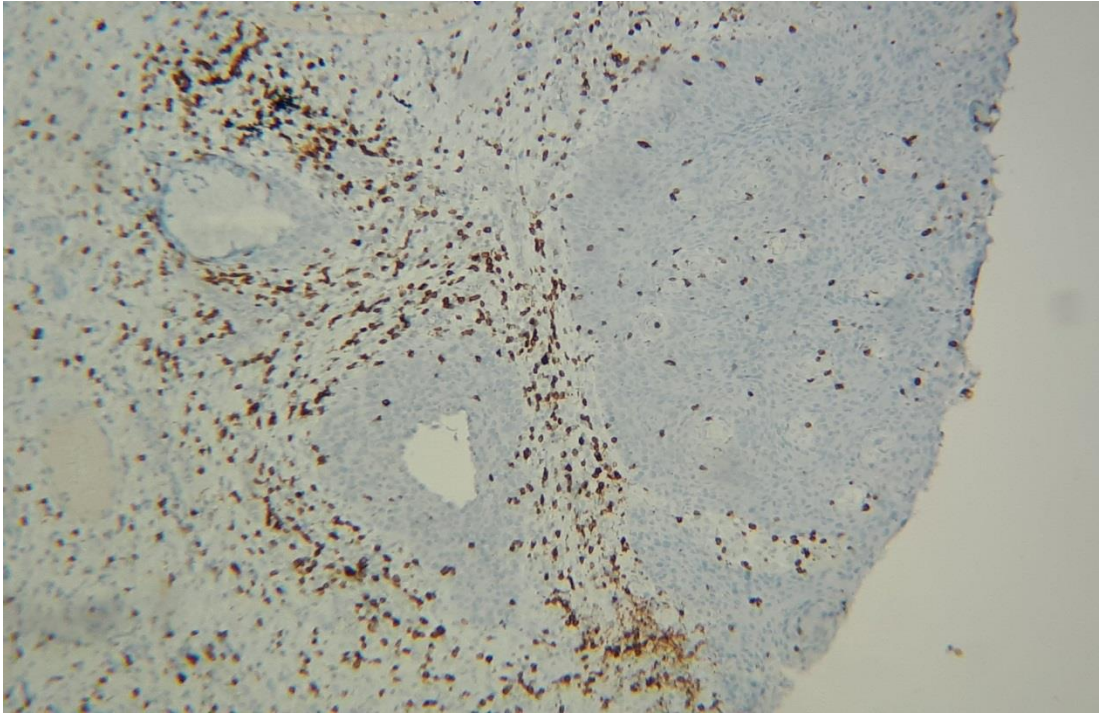
LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon



Şekil 39. CIN II alanında stromada artmış CD3, İHK, 100x



Şekil 40. CIN III alanında epitelde yüksek oranda artmış CD3, İHK, 200x



Şekil 41. CIN III ve endoservikal gland tutulumu alanında stromada artmış CD3, İHK, 200x

CD4, matür periferik kan T-hücre lenfositlerinin kabaca %45'ini oluşturan yardımcı-indükleyici T hücre altkümesi üzerinde bulunan tek zincirli bir

transmembran glikoproteindir. Ayrıca, timositlerin yaklaşık %80'inin ve monositlerin biraz daha düşük bir düzeyinin üzerinde CD4 bulunurken B-hücreler CD4 ekspres etmezler (131). CD4, T hücre reseptörü (TCR) için bir eş reseptör görevi görür ve T hücre aktivasyonu sırasında, antijen sunan hücre (APC) ile etkileşimin ardından TCR sinyalinin transdüksiyonunu sağlar. CD4, APC yüzeyindeki MHC sınıf II moleküllerle doğrudan etkileşir (132,133). CD4, HIV için reseptör olarak görev yapar ve CD4 pozitif hücre sayısı HIV ile enfekte bireylerde prognoz tahmin edilmesinde kullanılmaktadır (134). Anti-CD4, T hücreli lenfomalar dahil T-hücre bozukluklarının sınıflandırılması ve yardımcı T hücreler ve katil hücreler arasında ayırım yapılması için antikor panelinin bir parçası olarak kullanılabilir (135,136). LGSIL ve HGSIL tanılı hastalarda epitel içerisinde ve stroma için immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi sırasıyla tablo 16 ve 17 'de sunulmuştur.

Tablo 16. LGSIL ve HGSIL tanılarında epitel içerisinde CD4 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi

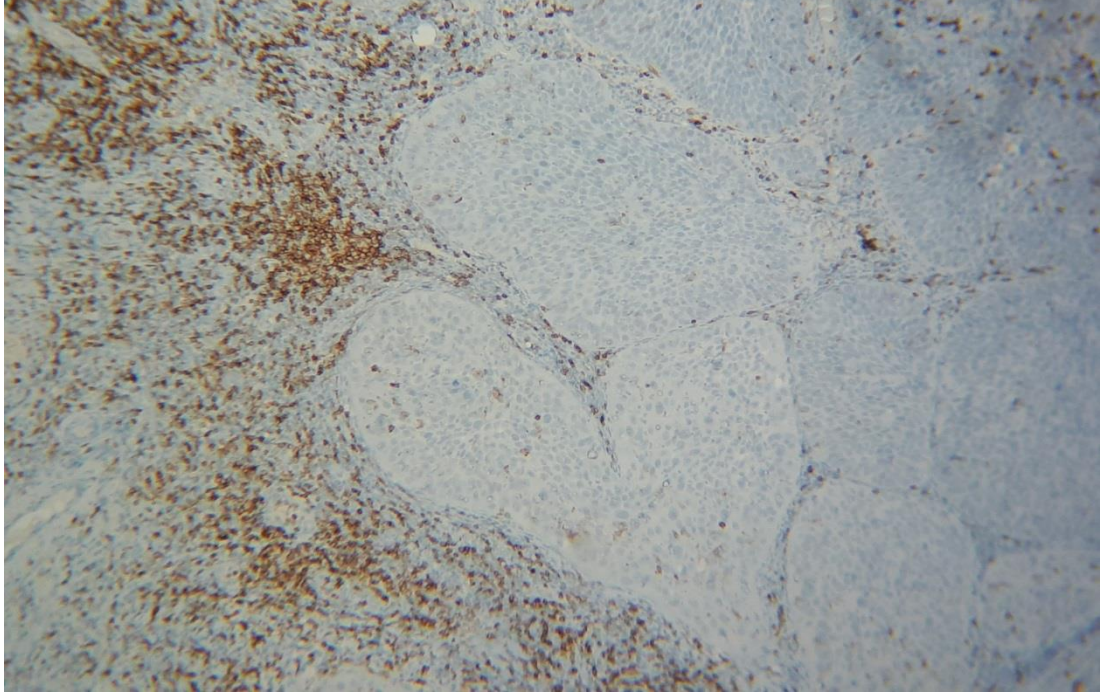
CD4 boyanması	LGSIL N=30	HGSIL N=30	p değeri
Ortalama	5,37	10,57	0,002
Standart deviasyon	3,47	7,75	
Ortanca	5,00	10,00	
İnterkuartal aralık	2,00	10,00	

LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon

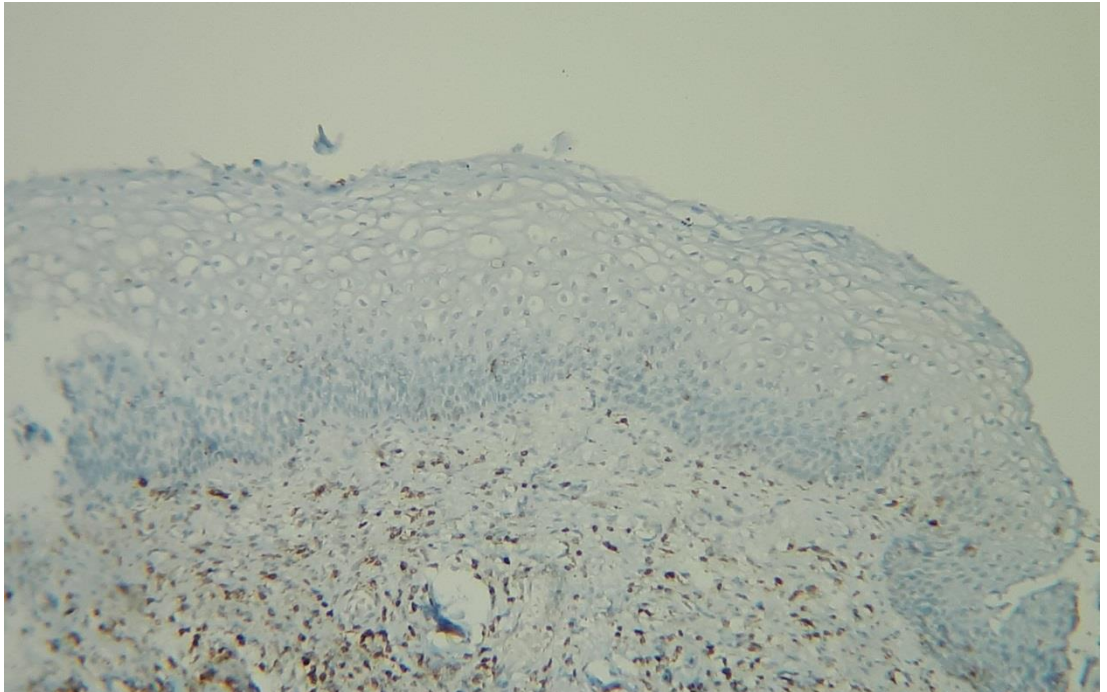
Tablo 17. LGSIL ve HGSIL tanılarında stroma içerisinde CD4 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi

CD4 boyanması	LGSIL olguları N=30	HGSIL olguları N=30	p değeri
Ortalama	17,30	29,23	0,017
Standart deviasyon	13,18	22,75	
Ortanca	10,00	17,50	
İnterkuartal aralık	10,00	33,00	

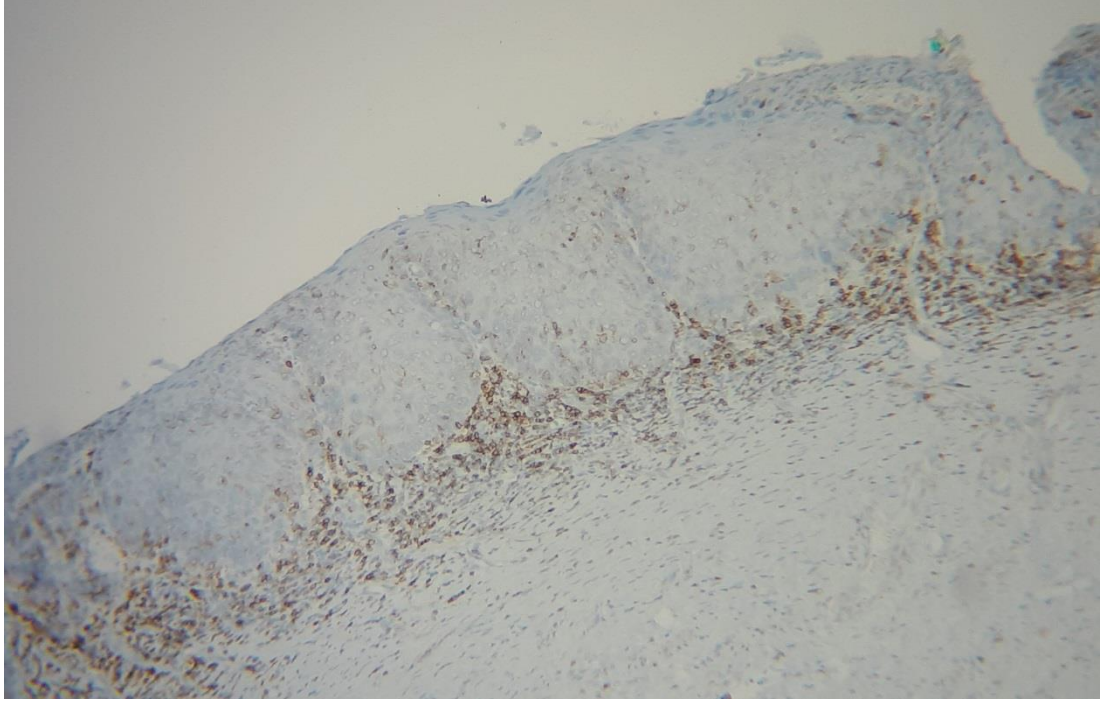
LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon



Şekil 42. Lezyon stromasında CD4 artmış oranda izlenmektedir, İHK, 200x



Şekil 43. CIN I alanında CD4, İHK, 100x



Şekil 44. CIN III alanında stromada artmış CD4, İHK, 200x

CD5, erken timosit gelişiminde görülen tek zincirli bir transmembran glikoproteindir. CD5, timositlerdeki düşük düzeyde ve T lenfositlerindeki yüksek düzeyde ifade edilir (137). Ayrıca, CD5 insan B lenfositlerinin B1a alt kümesiyle de ifade edilir (138). CD5, antijen spesifik reseptör bağımlı etkinleştirme ve diferansiyasyon sinyallerinin düzenlenmesinde koreseptör olarak hareket eder. Timosit ve B1a hücrelerinde, CD5 olgun T lenfositlerinde kostimülatör reseptörü olarak hareket ederken inhibitör sinyalleri verdiği izlenimi uyandırır (137). Anti-CD5 T hücre lenfomaları dahil T hücre bozuklukları³ ve manto hücre lenfoması gibi belirli B hücre bozukluklarını sınıflandırmak için bir antikor paneli parçası olarak kullanılabilir (139,140). LGSIL ve HGSIL tanılı hastalarda epitel içerisinde ve stromaya ait CD5 için immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi tablo 18 ve 19'da sunulmuştur.

Tablo 18. LGSIL ve HGSIL tanılarında epitel içerisinde CD5 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi

CD5 boyanması	LGSIL olguları N=30	HGSIL olguları N=30	p değeri
Ortalama	5,70	8,50	0,006

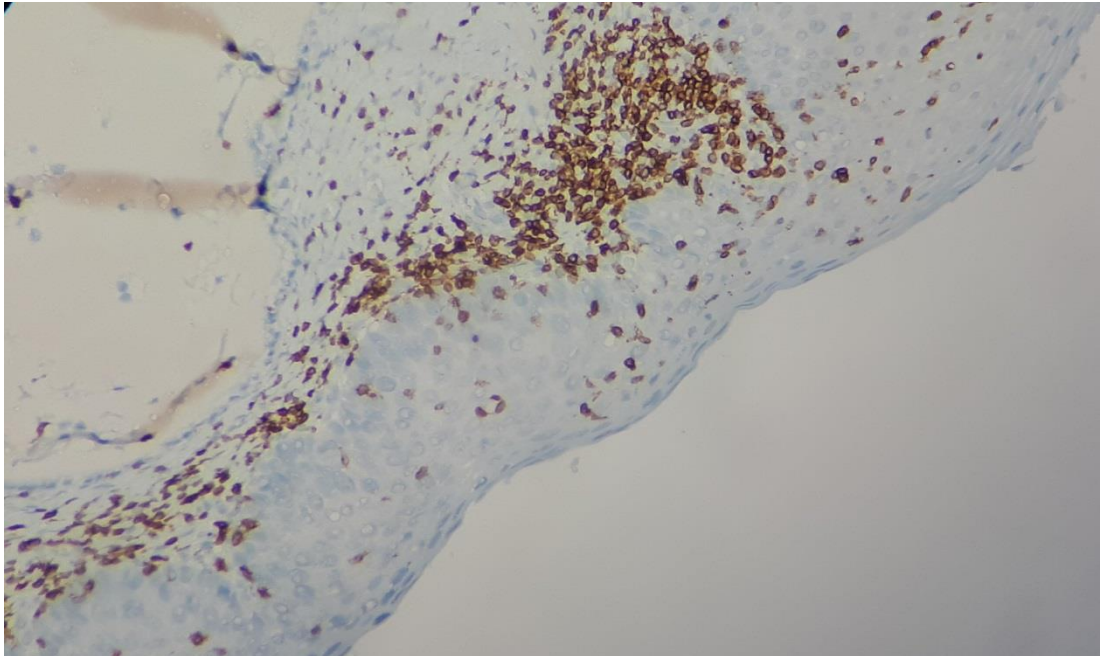
Standart deviasyon	2,81	4,59
Ortanca	5,00	8,50
İnterkuartal aralık	1,00	5,00

LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon

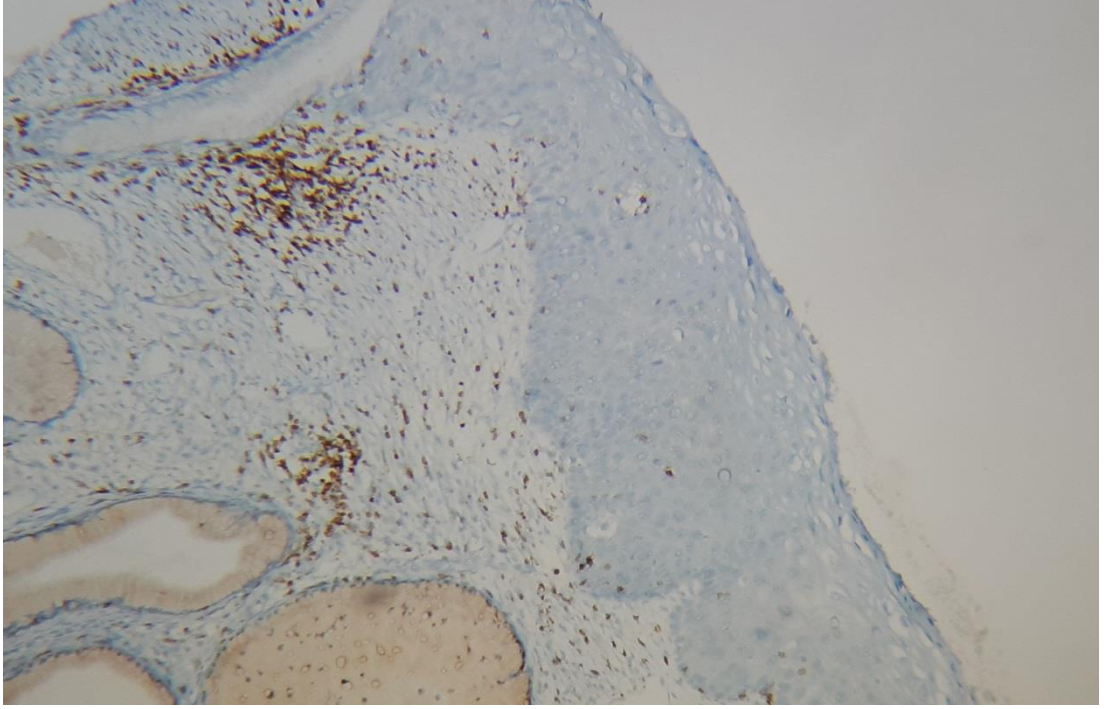
Tablo 19. LGSIL ve HGSIL tanılarında stroma içerisinde CD5 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi

CD5 boyanması	LGSIL olguları N=30	HGSIL olguları N=30	p değeri
Ortalama	19,67	25,40	0,204
Standart deviasyon	16,85	17,77	
Ortanca	13,50	20,00	
İnterkuartal aralık	10,00	15,00	

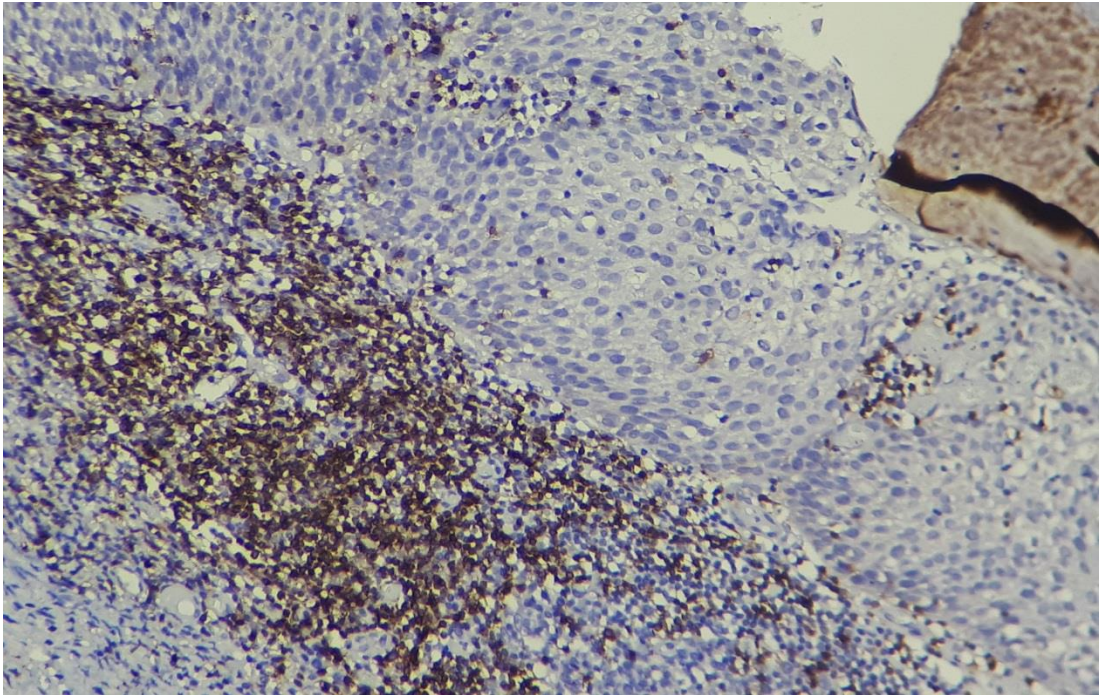
LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon



Şekil 45. CIN II alanında stromada CD5, İHK, 100x



Şekil 46. CIN III alanında epitelde ve stromada CD5, İHK, 200x



Şekil 47. CIN III alanında stromada yüksek oranda artmış CD5, İHK, 100x

CONFIRM anti-CD8 (SP57) antikorunu, CD8 glikoproteinine karşı üretilen bir tavşan monoklonal antikorudur. CD8 glikoproteinini, antijeni MHC sınıf I molekülleri

bağlamında tanıyan sitotoksik/supresör T lenfositlerinde bulunur. CD8 pozitif boyama sonuçları, T hücreli lenfomaların tespit edilmesine ve normal dokularda T lenfositlerinin T sitotoksik/supresör hücresi alt kümesinin tespit edilmesine yardımcı olabilir. CD8, periferik kan T hücresi lenfositlerinin %30-35'ini temsil eden sitotoksik-supresör T hücre alt kümesinde bulunan, ancak (141,142) B hücre lenfositlerinde bulunmayan bir heterodimerik, disülfür bağlı, transmembran glikoproteindir. CD8 ayrıca timositlerin %80'inde, daha düşük bir seviyeyeyle doğal katil hücrelerin yaklaşık %30-50'sinde ve kemik iliği hücrelerinin bir alt popülasyonunda da bulunur. CD8, T hücre reseptörü için koreseptör olarak davranır ve T hücre aktivasyonu boyunca MHC sınıf I molekülleriyle doğrudan etkileşime girer (143,144). Anti-CD8, T hücreli lenfomalar da dahil olmak üzere T hücre bozukluklarını sınıflandırmak ve yardımcı ve sitotoksik T hücreleri ayırt etmek için bir antikor panelinin parçası olarak kullanılabilir (145,146). LGSIL ve HGSIL tanılı hastalarda epitel içerisinde ve stromaya ait CD8 için immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi sırasıyla tablo 20 ve 21'de sunulmuştur.

Tablo 20. LGSIL ve HGSIL tanılarında epitel içerisinde CD8 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi

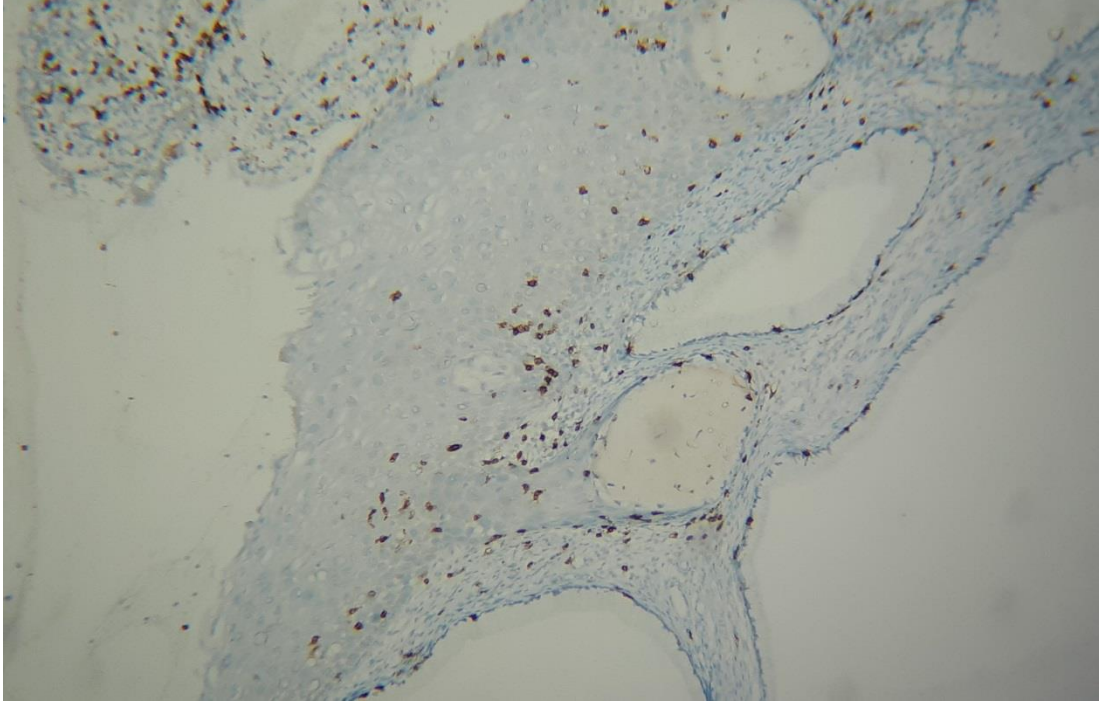
CD8 boyanması	LGSIL olguları N=30	HGSIL olguları N=30	p değeri
Ortalama	7,67	13,87	<0,001
Standart deviasyon	3,64	7,14	
Ortanca	6,00	15,00	
İnterkuartal aralık	5,00	10,00	

LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon

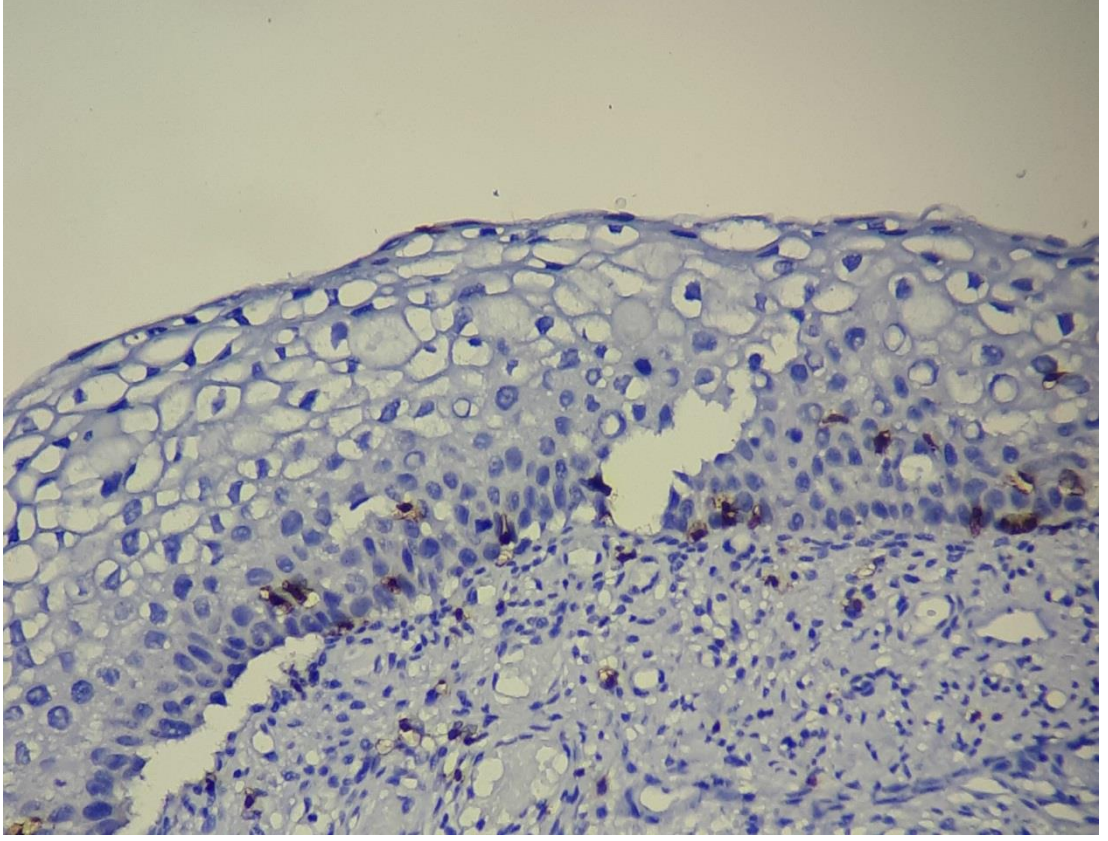
Tablo 21. LGSIL ve HGSIL tanılarında stroma içerisinde CD8 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi

CD8 boyanması	LGSIL olguları N=30	HGSIL olguları N=30	p değeri
Ortalama	20,13	26,57	0,066
Standart deviasyon	11,15	15,13	
Ortanca	17,50	20,00	
İnterkuartal aralık	9,00	25,00	

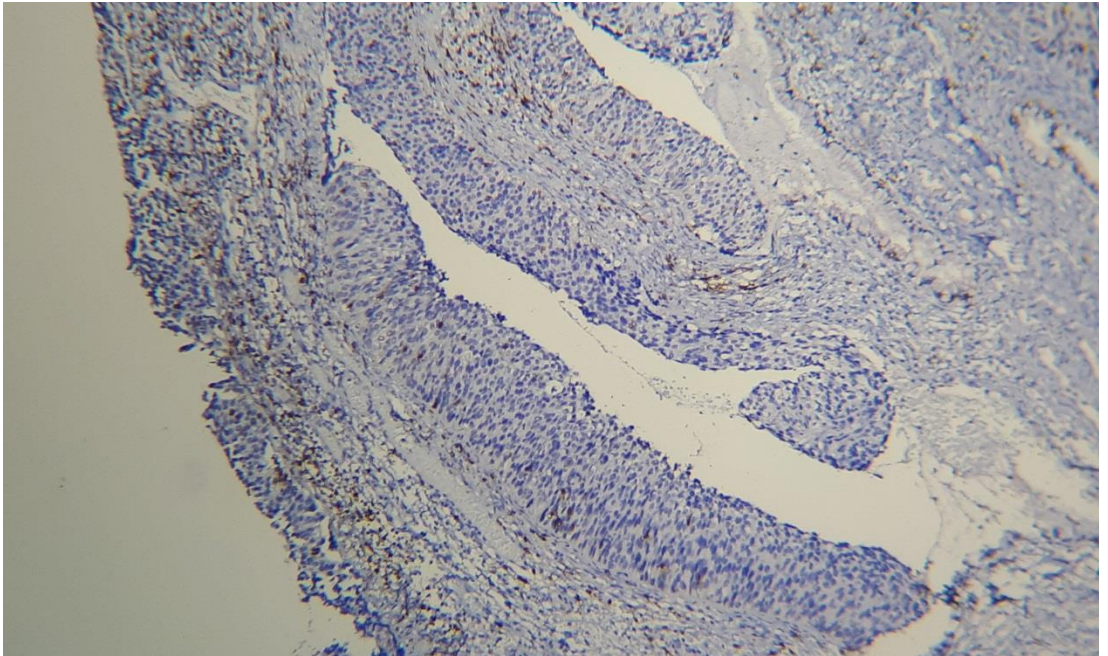
LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon



Şekil 48. CIN III ve endoservikal gland tutulumu alanında CD8, İHK, 200x



Şekil 49. CIN I alanında CD8, İHK, 200x



Şekil 50. CIN III ve endoservikal gland tutulumu alanlarında CD8, İHK, 200x

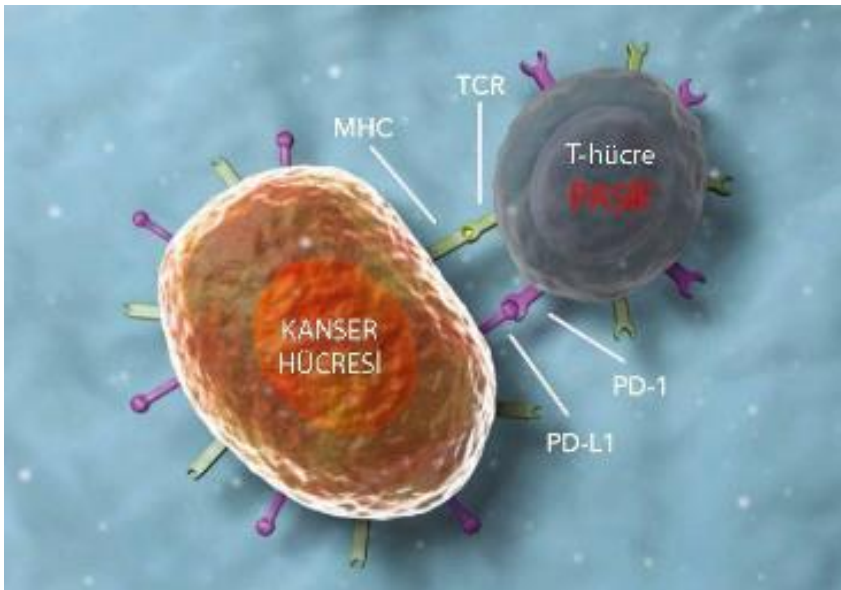
Epitel içerisindeki boyanma dikkate alındığında CD8 ve CD4 boyanması karşılaştırılmıştır. Genel olarak CD8 boyanma yüzdesi CD4'e göre daha fazla olmakla birlikte, CD8 hakimiyetinin olmadığı olgular da bulunduğu için, CD8 hakimiyet durumu LGSIL ve HGSIL grubunda karşılaştırılmıştır (Tablo 22).

Tablo 22. LGSIL ve HGSIL grubunda CD8 hakimiyet durumu

	LGSIL	HGSIL	p değeri
CD8 hakimiyeti* yok	11 (%36,7)	14 (%46,7)	0,43
CD8 hakimiyeti* var	19 (%63,3)	16 (%53,3)	
Total	30 (%100)	30 (%100)	

LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
*CD8 hakimiyeti CD8/CD4 oranına göre belirlenmiştir

Aynı zamanda CD279 olarak da bilinen programlı ölüm-1 (PD-1), T hücrelerinde, B hücrelerinde ve monositlerde aktivasyon sırasında eksprese edilen bir tip-1 transmembran proteindir (147). PD-1 ve ligandları (PD-L1 ve PD-L2) T hücre aktivasyonu ve otoimmüniteyi düzenleyerek bir immün yolu kontrol noktası görevi görür (148) (Şekil 51). PD-1 foliküler yardımcı T hücrelerini işaret eder ve bu nedenle anjiyoimmünoblastik T hücre lenfoması için kullanışlı bir belirteçdir (149). LGSIL ve HGSIL tanılı hastalarda epitel içerisinde ve stromaya ait PD1 için immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi sırasıyla tablo 23 ve 24 'de sunulmuştur.



Şekil 51. PD1/PD-L1 ve MHC/TCR'nin etkileşimi

Tablo 23. LGSIL ve HGSIL tanılarında epitel içerisinde PD1 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi

PD-1	LGSIL olguları N=30	HGSIL olguları N=30	p değeri
Ortalama	0,27	1,83	0,046
Standart deviasyon	0,69	4,07	
Ortanca	0,00	0,00	
İnterkuartal aralık	0,00	2,00	

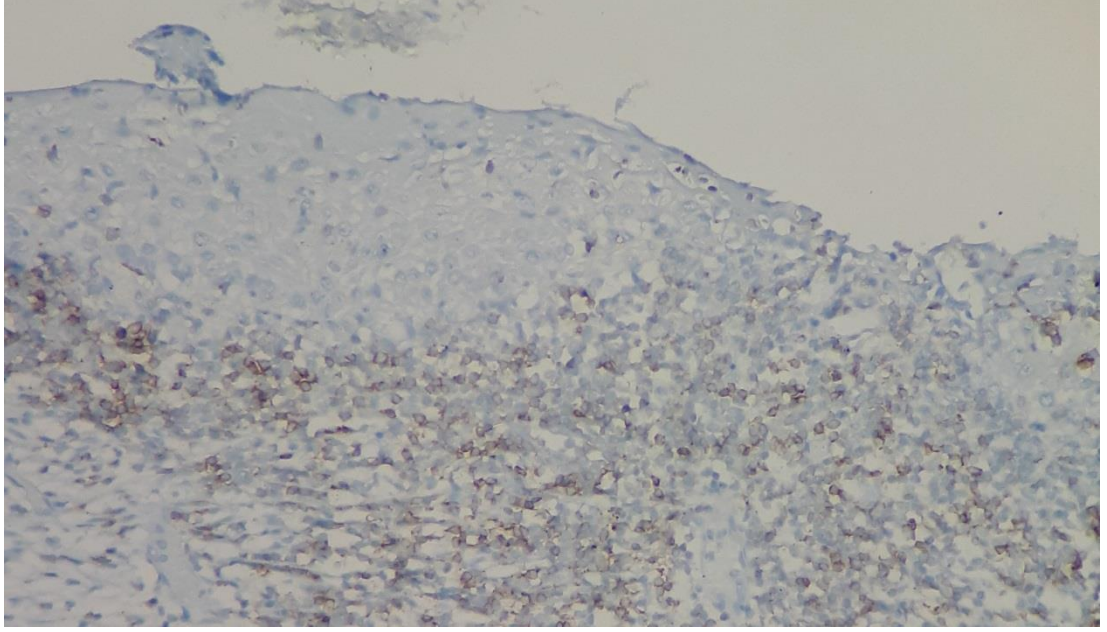
LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon

Tablo 24. LGSIL ve HGSIL tanılarında stroma içerisinde PD1 immünohistokimyasal boyanmasının selülerite yüzdesi

PD1 boyanması	LGSIL olguları N=30	HGSIL olguları N=30	p değeri
Ortalama	1,03	3,57	0,008
Standart deviasyon	2,35	4,39	
Ortanca	0,00	2,00	
İnterkuartal aralık	0,00	5,00	

LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon

Çalışmamızda PD1 için kullanılan NAT105 klonu daha önce Kitano ve arkadaşları, Bottai ve arkadaşları, Brockhoff ve arkadaşları, Barrett ve arkadaşları, Acs ve arkadaşlarının çalışmalarında da kullanılmıştır (150-153).



Şekil 52. CIN III alanında stromada artmış PD1, İHK, 200x

Epitel içerisindeki CD3, 4, 5, 8 ve PD-1 boyama ortalamaları LGSIL ve HGSIL grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu için, tüm bu parametreler ayrıca görel olarak belirlenen değerlere göre de ki kare testi ile ayrıca karşılaştırılmıştır (Tablo 25, 26, 27, 28, 29).

Tablo 25. Epitel içerisindeki CD3 immünohistokimya boyanması yüzdesinin düşük ve yüksek olmasının LGSIL-HGSIL ile ilişkisi

	LGSIL	HGSIL	p değeri
Düşük CD3 boyanması	23 (%76,7)	10 (%33,3)	0,001
Yüksek CD3 boyanması*	7 (%23,3)	20 (%66,7)	
Total	30 (%100)	30 (%100)	

LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
*%20 ve üzeri yüksek boyanma olarak tanımlanmıştır

Tablo 26. Epitel içerisindeki CD4 immünohistokimya boyanması yüzdesinin düşük ve yüksek olmasının LGSIL-HGSIL ile ilişkisi

	LGSIL	HGSIL	p değeri
Düşük CD4 boyanması	26 (%86,7)	14 (%46,7)	0,001
Yüksek CD4 boyanması*	4 (%13,3)	16 (%53,3)	
Total	30 (%100)	30 (%100)	

LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
*%10 ve üzeri yüksek boyanma olarak tanımlanmıştır

Tablo 27. Epitel içerisindeki CD5 immünohistokimya boyanması yüzdesinin düşük ve yüksek olmasının LGSIL-HGSIL ile ilişkisi

	LGSIL	HGSIL	p değeri
Düşük CD5 boyanması	25 (%83,3)	15 (%50,0)	0,006
Yüksek CD5 boyanması*	5 (%16,7)	15 (%50,0)	
Total	30 (%100)	30 (%100)	

LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
*%10 ve üzeri yüksek boyanma olarak tanımlanmıştır

Tablo 28. Epitel içerisindeki CD8 immünohistokimya boyanması yüzdesinin düşük ve yüksek olmasının LGSIL-HGSIL ile ilişkisi

	LGSIL	HGSIL	p değeri
Düşük CD8 boyanması	21 (%70,0)	6 (%20,0)	<0,001
Yüksek CD8 boyanması*	9 (%30,0)	24 (%80,0)	
Total	30 (%100)	30 (%100)	

LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
*%10 ve üzeri yüksek boyanma olarak tanımlanmıştır

Tablo 29. Epitel içerisindeki PD1 immünohistokimya boyanması yüzdesinin düşük ve yüksek olmasının LGSIL-HGSIL ile ilişkisi

	LGSIL	HGSIL	P- değeri
Düşük PD1 boyanması	25 (%83,3)	17 (%56,7)	0,024
Yüksek PD1 boyanması*	5 (%16,7)	13 (%43,3)	
Total	30 (%100)	30 (%100)	

LGSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HGSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
*%1 ve üzeri yüksek boyanma olarak tanımlanmıştır

5. TARTIŞMA

Servikal kanser dünya çapında kadınlarda gözükten en sık ikinci kanserdir (155). Serviks kanseri, erken teşhis ve etkili bir şekilde yönetilirse, en önlenebilir ve en başarılı şekilde tedavi edilebilen kanser türlerinden biridir. Özellikle etkin tarama programlarının uygulanmadığı ülkelerde servikal kanser halen çok önemli bir kadın sağlığı problemidir. Dünya çapında normal servikal sitolojisi olan kadınlarda HPV prevalansı yaklaşık %10 olarak bulunmuştur (156). HPV tip 16 ve 18 görülen servikal kanserlerin yaklaşık %70'inden sorumludur. Bu iki tip aynı zamanda mevcut aşuların etkinliği olan tiplerdir. Kansere neden olan yaygın insan papilloma virüsü türlerine karşı koruyan ve serviks kanseri riskini önemli ölçüde azaltabilen profilaktik aşular mevcuttur. Lokal tedavi ile servikal kanser öncesi servikal tarama programının bir parçası olarak HPV enfeksiyonu testi servikal kanseri önlemek için ikinci bir fırsattır (157).

Dünyada en yaygın gözükten HPV tipleri tip 16 ve 18'dir. Amerika'da HPV prevalansı 20 milyon olarak tahmin edilmektedir. Ancak dünya genelinde HPV dağılımı coğrafi farklılıklar göstermektedir. Örneğin Afrikada yapılan bir çalışmada HPV sıklığı %75'e kadar çıkmaktadır (158). Şu anda piyasada HPV'e karşı üretilmiş 3 değişik aşı bulunmaktadır. Her birinde ortak tip olan 16 ve 18 dışında, dördü olan ayrıca tip 6 ve 11'e karşı da etkindir. Bunun yanında dördü aşı, servikal kanserlerin %20'sinden sorumlu olan tip 31, 33, 45, 52, 58'lere karşı da kısmen çapraz koruma sağlamaktadır (159). Türkiye'de yapılan geniş serili bir çalışmada ise hastaneye başvuran kadınlarda HPV prevalansı %23 olarak bulunmuştur (160).

Servikal intraepitelial neoplazi, klasik olarak 3 dereceye ayrılır: CIN I; II ve III. Bu tümör öncülü lezyonlar, düşük ve yüksek dereceli skuamöz intraepitelial lezyon olarak da derecelendirilebilirler (161). CIN lezyonunu dereceleme, düşük dereceli (CIN I) ve yüksek dereceli (CIN II-III) lezyonun gerileme, devam etme ve ilerleme oranını anlayabilmek ve tedavi ve klinik izlem algoritmasını değerlendirebilmek için gereklidir (162).

HPV virüsü bazı insanlarda persiste ederken, çoğu insanda zaman içerisinde yok olmaktadır. Bu süreçten immünite sorumlu tutulmakta ve özellikle hücrel immünitesi baskılanmış kişilerde hücrel immün sistemin HPV kontrolündeki yeri

immünitesi baskılanmış kişilerdeki HPV enfeksiyonunun persistansının gözlemlenmesinden elde edilmiştir. HPV ve ilişkili hastalıklarda E6 ve E7'ye karşı CD4 ve CD8 T-hücre cevabının HPV kontrolündeki yeri açıktır. T-regulatuvar immün sistemin azalması lezyonun progresyonu ile sonuçlanır (163).

Yukarıda da değinildiği gibi servikal kanserin önlenmesinde en önemli basamak taramadır. Türkiye'de 2014 yılından itibaren servikal kanser taraması için HPV testi kullanılmakta ve sadece HPV pozitif saptanan hastalar kolposkopi için ileri merkezlere refere edilmektedir. Türkiye'deki güncel tarama stratejisinin daha başarılı olduğu çok yakın tarihli bir raporda da belirtilmektedir (164).

HPV'nin temizlenmesi için hem doğal hem de kazanılmış immünite gereklidir. Doğal immün sistem inflamasyon ve kemotaksis ile patojenin tanımlanması için kompleks bir cevap oluşturarak, adaptif immün sisteme bir köprü gibi işlev görür. Doğal immün sistemdeki en önemli özellik ise özellikle dendritik hücre ve makrofajlarda bulunan patojen ve ilişkili moleküler paternleri tanıyan Toll-like reseptörlerin (TLRs) olmasıdır. TLR aktivasyonu ile sonuçlanan doğal immün yanıt nonspesifiktir ve dendritik hücreler ve makrofajlar gibi antijen sunan hücrelerin (APC'ler) yanı sıra lokal ve sistemik inflamatuvar değişiklikleri indükleyen sitokinler (interferonlar; IFN alfa, beta), inflamasyon başlatıcılar (interlökinler) ve kemotaksis ile oluşur (165). Aksine, kazanılmış immün sistem oldukça spesifiktir ve uzun süreli hafıza yanıtına sahiptir. Kazanılmış immünite, antikoları salgılayan bellek B hücrelerinin, sitotoksik CD8 + T lenfositlerin ve T yardımcı CD4 + T lenfositlerin gelişmesiyle sonuçlanır. T hücresi immün yanıtının aktivasyonu, tümör antijenleri APC'ler tarafından işlendiğinde, CD8 + T lenfositler tarafından doğrudan tümör sitolizine yol açan fagositik hücrelerin toplandığı ve hem CD8 + hem de CD4 + T lenfositler tarafından sitokin üretimi yoluyla tümör ve stromayı yok eden dolaylı sitoliz meydana geldiğinde ortaya çıkar (165).

Tümör hücreleri, hem T hücrelerinin süpresyonunu sağlamak hem de tümörjenik inflamasyonu uyarmak amacıyla, tümör mikroçevresini modifiye eder. ImmünsüpresyonIDO, Prostoglandin E2, TGFβ, IL-6 ve VEGF-A gibi mediatörler aracılığı ile immünsüpresyon sağlanarak tümör hücrelerinin proliferasyonu hızlandırılır (165).

T hücrelerinin uyarılması zaman içinde çözülen bir kavramdır. T hücre aktivasyonu için iki sinyalli model, naif T hücrelerinin aktivasyonu için bir model olarak Kevin Lafferty tarafından önerilmiştir (166). Bu modele göre T hücrelerinin tam olarak aktive olabilmeleri için 2 sinyal gerekmektedir. Bağışıklık cevabına özgülüğü veren ilk sinyal, antijenik peptid – MHC kompleksinin T hücre reseptörü (TCR) ile etkileşimi ile sağlanır. İkincisi, antijenden bağımsız uyarıcı sinyal, T hücresi klonal genişlemesi, sitokin sekresyonu ve efektör fonksiyonunu desteklemek için APC'ler tarafından T hücrelerine gönderilir. İkinci sinyalin yokluğunda, antijene spesifik lenfositler etkili bir şekilde yanıt vermezler ve fonksiyonel olarak etkişiz hale gelirler veya anerjiktirler ve antijen tarafından devam ettirilen aktivasyona karşı dirençlidirler (167). T-hücreleri, MHC ile T-hücresi reseptörünün (TCR) birlikte sentezlenmesi ve diğer yandan immün kontrol noktası olarak bilinen CD28/B7 ailesinin üyelerini de içeren (168,169) stimülatör ve/veya inhibitör sinyallerin eş zamanlı aktivasyonu ile sunulan yabancı antijenler tarafından aktive edilir (170). İmmün kontrol noktaları, aktivasyonun yanı sıra T hücre toleransı ile ilgilidir. Fizyolojik koşullar altında self toleransı ve immün homeostazını muhafaza etmede çok önemli bir rol oynarlar, böylece immün sistem patojeni etkin bir şekilde yok ettiğinde dokuları gereksiz hasarlardan korurlar (171). Fetusa karşı maternal immün tolerans bile kontrol noktası inhibitörleri tarafından kısmen düzenlenir (172). T hücre yanıtının immün regülasyonu, antijen stimülasyonundan sonra doku yıkımını ve otoimmüniteyi en aza indirmek için gereklidir, ancak bu inhibitör moleküller, lokal T hücre inhibisyonuna neden olmak için kanser dokularında aşırı eksprese edilebilir (165). Tümörler, patolojik antijenlere karşı zayıflatılmış bir immün reaksiyon ile sonuçlanan immün inhibitör sinyalleri eksprese edebilir (173). Sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili antijen-4 (CTLA-4), PD1/PDL1/PDL2 yolağı, lenfosit aktivasyon geni-3 (LAG-3), T hücre immünoglobulin müsin-3 (TIM-3), T hücre immün yanıtını inhibe eden negatif sinyallerdir (170). Tümör immünolojisinde, CTLA-4 sinyalleme, lenf nodlarında bir T-hücresi tepkişinin başlatılmasının sınırlandırılmasında daha fazla yer alırken, PD1 daha sonra bu süreçte daha belirgin bir şekilde ortaya çıkmakta ve tümör mikroçevresinde T hücre aktivitesini sınırlandırmaktadır (174).

Ki67, ilk defa 1983'de Gerdes ve arkadaşları tarafından tanımlanmış, tonsil germinal merkez hücreleri, epitelyum bazal hücreleri ve intestinal epitelin kript hücreleri gibi proliferasyon hücrelerinde gösterilmiştir (175). Ki67, hücre siklusunun Go fazı dışında tüm fazlarında bulunan nonhiston nükleer proteindir. 345 ve 395 kd

ağırlığındaki iki molekülden oluşur ve geni 10. kromozom üzerinde yer alır (176,177). İmmunhistokimya ile Ki67 için pozitif nükleer boyanma gösteren hücre yüzdesi, proliferatif fraksiyonu gösterir. Agresif tümörlerde bu oran yüksektir (178). Birçok sistem tümörlerinde (meme, akciğer, özofagus, böbrek ve prostat kanseri, malign melanom, non hodgkin lenfoma, glial tümörler) yüksek Ki67 oranı, kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir (179,180). Servikal displazilerin değerlendirilmesinde de, birçok çalışmada, Ki67'nin displazinin şiddetiyle ilişkisi araştırılmış ve sensitif bir belirleyici olabileceği belirtilmiştir (176,181-183). Ki67, HGSIL ile bunlarla karışabilen atrofik skuamöz epitel, transizyonel metaplazi ve immatür skuamöz metaplazi gibi durumlarda değerlidir. Ki67 ayrıca loop marjiniindeki koterize epitelin değerlendirilmesinde de yardımcıdır (176).

Araştırmamızda, yüksek dereceli displazide, Ki67 ile boyanma oranı, düşük dereceli displazi içeren olgulara göre anlamlı olarak artmaktadır. Buna göre nonneoplazik olgularda, Ki67 ile boyanma sadece bazal tabakada görülürken displazide ve ayrıca displazinin şiddeti arttıkça boyanma oranı da artmaktadır. Ki-67 proliferasyon endeksi ile epitelyal CD3, CD4, CD5 ve CD8 arasındaki ilişki karşılaştırılmış ve yapılan bivariat korelasyon analizinde pearson korelasyon katsayıları; CD3 için 0,51 ($p<0,001$); CD4 için 0,45 ($p=0,002$); CD5 için 0,25 ($p=0,09$); CD8 için 0,49 ($p<0,001$) bulunmuştur.

Literatürde Ki67 ekspresyonu ile servikal neoplazinin derecesi arasında belirgin korelasyon bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (184,185). Ancak çalışmamızdan farklı olarak, Agoff'un çalışmasında neoplazi içermeyen olgularda da Ki67 ile orta ve üst tabakalarda boyanma görülmüştür (184). Bunun nedeni olarak da hücre döngüsünün hızının artışını göstermişlerdir. Bu da düşündürmektedir ki, Ki67 ekspresyonu servikal neoplaziler için duyarlı bir işaretleyicidir ancak tüm proliferen hücrelerde ekspresyon göstermesi nedeniyle servikal neoplaziler ve HPV infeksiyonu için spesifik değildir ve neoplazi tanısında sadece yardımcı bir belirleyici olarak kullanılabilir.

Negri ve arkadaşlarının çalışmasında, Ki67, HGSIL tanısı almış olgularda daha önemli bir belirteç olarak kabul edilmiş ve LGSIL tanısı almış olgularda daha az hassas olduğu vurgulanmıştır (186).

Kruse ve arkadaşlarının yaptığı çeşitli çalışmalarda, epitelin orta 1/3 kısmında bulunan Ki67 ile boyanmış hücrelerin yüzdesi ve Ki67 stratifikasyon indeksi, progresyonu gösteren en iyi kombinasyon olarak kabul edilmiştir (187).

Ma ve arkadaşlarının çalışmasında, bizim çalışmamıza benzer şekilde Ki67 ile, tüm HGSIL vakalarında epitelin üst 2/3'ünde boyanma izlenmiş olup skuamöz metaplazi vakalarında boyanma izlenmemiştir (188).

Bozuk T hücresi, kanser hastalarında, dolaşımdaki T hücrelerinde ve NK hücrelerinde sinyal ileten CD 3 zeta (ζ) zinciri dimer moleküllerinin ekspresyonunun azalması ile bağlantılı olarak işlev görür. Servikal karsinomda T-hücreleri üzerinde CD 3 zeta zinciri ekspresyonunun intralezyonel down-regülasyonu literatürde mevcuttur (189).

CIN tip 2 ve 3' de CD3 / VEGF ve monosit-makrofaj / VEGF'nin birlikte ekspresyonu görülürken, CIN 3 lezyonlarda CD3 lenfositlerde önemli bir artış bulunmuştur (23). Çalışmamızda da, hem stromal hem epitel lenfositlerde HSIL lezyonlarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (sırasıyla; $p=0,006$ ve $p<0,001$). Ayrıca, CD3 için %20 ve üzeri boyanma yüzdesi gruplandırıldığında, LSIL grubunda 7 hasta (%23,3); HSIL grubunda 20 hasta (%66,7) olarak belirlendi ($p=0,001$).

T hücreleri, özellikle CD4 + T hücreleri, viral korunmada en önemli hücrelerdir (190). Regulator T hücreler (Treg), CD4+ T hücrelerinin bir alt grubu olup peptid-MHC ile eş uyaran varlığında uyarılan TCR'ler aktif T hücrelerinin çoğalmasını ve sitokin üretimini baskılar (191).

Artan CD4 ve antijen sunucu hücreler (antijen presenting cells- APC) infiltrasyonuna kıyasla servikal prekanser lezyonları infiltre eden CD4 T hücrelerinin immünohistokimyasal paterni azalmıştır (192).

İnvaziv servikal karsinomlu hastalar da, kontrollerle karşılaştırıldığında, T hücrelerinin yüzdesinde ve sayısında bir azalma, yardımcı indükleyici (CD4 +) T hücrelerinin yüzdesinde bir azalma, CD4 + / CD8 + oranında azalma görüldü (193). Çalışmamızda, LSIL ve HSIL hasta grubu karşılaştırılmış olup; HSIL hastalarda

epitelde lezyon bölgesinde CD4 ve CD8 lenfosit yüzdesi için p değeri (sırasıyla; **0,002** ve **<0,001**) istatistiksel olarak fark anlamlıydı.

CD4 + T hücreleri, bir patojeni tahrip edebilecek ve CD8 + T hücrelerinin olgunlaşmasına yardımcı olabilecek bir antikor üretmek için B hücrelerini aktive edebilir (194).

B lenfosit, CD4 + T yardımcı lenfosit ve CD8 + sitotoksik lenfositler (CTL) adaptif bağışıklık hücrelerini temsil ederler. Tümör supresyonu için genel mekanizma da temel olarak CD4+ T yardımcı lenfositlere atfedilmiştir. CD4+ T yardımcı lenfositlerden salınan sitokin ve lenfokinler; CD8+ sitotoksik lenfositleri, NK hücreleri ve makrojalari aktive edebilir (195).

Th1 hücreler makrofajları, NK hücreleri ve CD8+ T hücrelerini aktifleştirerek hücre içi patojenlerle savaşır. CD8+ sitotoksik T hücreleri (CTL) patojenle enfekte veya malign dönüşüme uğramış konak hücrelerini öldürür. CTL IFN- γ , TNF- α ve IL-2 gibi sitokinleri üretir. IFN- γ , viral replikasyonu baskılar ve MHC klas I ekspresyonu tetikler. CTL üzerinde TCR uyarımı kabiliyetini artırır. IFN- γ , makrofaj aktivasyonu için TNF- α ile sinerjik etki gösterir. CD8+ T hücre farklılaşması için önemli transkripsiyon faktörleri T-bet ve Ömesodermindir (196).

Normal şartlarda akut enfeksiyon patojene özgü T lenfositlerin ekspresyonu, patojenlerin temizlenmesi ve hafıza T hücrelerinin gelişimi ile sonuçlanır. Ancak HBV, HCV, HIV ve HPV gibi bazı patojenler tamamen temizlenemez ve patojene özgü T lenfositlerine rağmen ömür boyu sebat eder. Bu persistan enfeksiyonlar kronik antijen maruziyetine yol açarak T hücrelerinin öldürme kabiliyetini bozar ve enfeksiyonları kontrol etmeye yarayan sitokinlerin üretimini durdurmasına yol açar. Yorgun CD8+ T hücreleri IL-2 veya TNF- α üretmez ve enfekte hücreleri lize edemez. Takiben CD8+ T hücreleri tamamen cevapsız hale gelir ve sonunda apoptozise uğrar. Fonksiyonel cevabın kaybı ile yorgun hücreler inhibitör hücre yüzey reseptörlerini up-regüle eder. Bunlardan en çok bilineni ise programlı hücre ölümü 1 (PD1)'dir. PD-1'in uyarılması T hücre cevabını baskılar (197,198).

İmmün kontrol noktasında görev alan reseptör immünglobülin süper-ailesinde yer alan PD-1 (CD279)'dir. PD-1, aktive olmuş T hücrelerinde (tümörü infiltre eden T hücreleri dahil), regülatuar T hücrelerinde, B hücrelerinde, NK hücrelerinde, aktive monosit ve dendritik hücrelerde eksprese olur. Görevi immünolojik aktivasyonu sınırlandırmak ve inhibe etmektir. PD-1'e bağlanarak bu inhibisyonun gerçekleşmesini sağlayan iki ligandı PD-L1 (B7-H1) ve PD-L2 (B7-DC) mevcuttur (167). CD4+ ve CD8+ T hücrelerde "programmed death-1" (PD-1) ekspresyonu nedeniyle T hücrelerinin tükenmesini teşvik eder. Sitotoksik CD8+ T hücre aracılı öldürme, baskın bir Treg yanıtı ile engellenebilir. CD4+ hücre yanıtlarının ani kaybı, CD8+ T hücre fonksiyonunu tehlikeye atar ve hedeflenen CD8+ T hücre epitoplarında viral kaçış mutasyonlarının ortaya çıkmasını kolaylaştırır. Virüse özgü CD4+ ve CD8+ T hücreleri azalır ve cevap sınırlı hale gelir(virüs persistansı). CD5, T hücrelerinde hücre büyümesini işaret eden bir reseptör molekülü türüdür. Sağlam epitopları tanıyan CD8 +T hücreleri tükenir ve tükenme markörlerini (PD-1) eksprese eder. □ Mutasyona uğramış epitopları hedef alan CD8+ T hücreleri periferik kanda işlevsel ve saptanabilir kalır (199). Koruyucu immünite için, hafıza CD4 ve CD8 T hücreleri gereklidir. PD-L1 ve PD-L2 proteinleri antijen sunan hücrelerde ve aynı zamanda tümör hücrelerinde bulunurlar. T hücrelerindeki PD-1 reseptörlerinin ligandlarıdır. Tümör hücrelerinde PD-L1'in ekspresyonu PD-1 yolağını aktive eder. PD-1 aktive T hücreleri dışında, B hücreleri, NK hücreleri gibi birçok hücre tipinden de eksprese olur. Aktive PD-1 yolağı, T hücre efektör fonksiyonlarının downregülasyonuna yol açar. PD-1 ve PD-L1 antikoru PD-1 yolak inhibisyonuna yol açar ve T hücre aktivasyonuna ve T hücre aracılı tümör rejeksiyonuna yol açar.

Bazı tümörler hücre yüzeylerinde PD-L1 proteinini yüksek oranda bulundururlar ve bunlara PD-L1 pozitif tümör denir. PD-L1, anti-PD-1 ve anti-PD-L1 sınıfı immünoterapilerin etkinliğini öngören değerli bir biyobelirteçdir. Kanser hücresi, bağışıklık sistemimizin bir üyesi olan T hücre ile etkileştiğinde MHC ile TCR etkileşimi T hücresini aktive eder. Kanser hücre yüzeyinde olan kontrol noktası proteini PD-L1, T hücre yüzeyinde bulunan PD-1 ile etkileştiğinde T hücresi pasifleşir.

En önemli immün yollarından biri, programlanmış hücre ölümü 1 (PD1) proteindir. PD1, T-hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilir ve immün reaksiyonları

kontrol eder (200). PD1'in 2 adet ligandı vardır: "Programlanmış hücre ölümü ligandı1 (B7-H1) ve Programlanmış hücre ölümü ligandı-2 (B7-DC)" (Programmed cell Death Ligand 1-2) (201).

Adına rağmen, PD1 doğrudan hücre ölümüne neden olmaz, ancak hücre büyüme faktörlerini ve hayatta kalma sinyallerini azaltır (170).

PD1 ve ligandları olan PDL1, PDL2 arasında gelişen aktivasyon T hücre aktivitesini, sitokin üretimini azaltırken, T hücre lizisini ve antijenlere olan toleransı artırır (202). PD1/PDL1 yolunun solid tümörlerde olduğu kadar diyabet (203), kardiyomyopati (204), HIV enfeksiyonu (197), lupus (205) ve diğer otoimmün hastalıklarda (206) da önemli olduğu gösterilmiştir.

PD1 288 aminoasitten oluşan tip 1 transmembran proteindir. Bir immünglobulin, bir transmembran protein, bir tirozin bazlı inhibitör (ITIM) yanı sıra bir tirozin bazlı değiştirici (ITSM) protein içerir. İnsanlarda 2. kromozom üzerinde lokalize Pcd-1 geni ile kodlanır (167).

PD1, T hücreleri, B hücreleri, doğal öldürücü hücreler, aktive edilmiş monositler ve dendritik hücreler üzerinde eksprese edilebilir (167). Aktif hale geçmemiş olan T hücrelerinde eksprese edilmez (205). PD1 insan reaktif lenfoid dokusunda 31 germinal merkeze bağlı T hücreleri üzerinde eksprese edilir (207). Hücre içi depolarda PD1 düzenleyici T hücresi (Treg) popülasyonunda tarif edilmiştir (208).

Over kanserlerinde, PDL1 ekspresyonu intraepitelyal değil stroma infiltre eden CD8 T hücreleriyle ters orantılıdır, bu da PDL1'in CD8 T hücrelerinin intratümöral migrasyonunu inhibe ettiğini gösterir (209). PD1 yolu, hematolojik malignitelerde de rol oynayabilir (167). PD1 veya PDL1 nadiren B hücreli malignitelerde eksprese edilir (210).

PD1, anjiyoimmünoblastik lenfomaların T hücreleri üzerinde yüksek oranda eksprese edilir ve ilişkili foliküler dendritik hücre ağı üzerinde PDL1 eksprese edilir (207). Nodüler lenfosit baskın Hodgkin lenfomada, lenfositik ve/veya histiyositik (L & H) hücrelerle ilişkili T hücreleri PD1 eksprese eder (167). PD1 ve PDL1, HTLV-1

aracılı yetişkin T hücreli lösemi ve lenfomada, CD4 + T hücreleri üzerinde eksprese edilir (211).

Çalışmamızda, immünohistokimyasal PD1 değerlendirmesi için Buisseret ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi, tümörü infiltre eden lenfositlerde %1 ve üzeri immünreaktivite pozitif kabul edildi (154).

Olgularda PD1 immünreaktivitesi tümörü infiltre eden ve stromadaki lenfositlerde sitoplazmik ve membranöz boyanma olarak izlendi. Değerlendirmede %1 üzeri hücrede boyanma pozitif kabul edildi. Buna göre, HSIL olgularının epitelde boyanma yüzdesi ortalaması %1'in üzerinde ve 1,83'idi. LSIL olgularının ise ortalaması 0,27'idi (**p=0,046**). Stromada ki boyanma yüzdesi ortalaması ise HSIL ve LSIL için sırasıyla; 3,57 ve 1,03'idi (**p=0,008**). Bir diğer ifadeyle, hem stroma hemde epiteldeki PD-1 boyanan lenfosit yüzdesi istatistiksel olarak anlamlıydı. LSIL hasta grubundan 5 tanesi %1 ve üzeri boyanma gösterirken; HSIL grubunda 30 hastanın 13 tanesinde %1 ve üzeri boyanma görüldü. Bu fark da istatistiksel olarak anlamlıydı (**p=0,024**). Bununla birlikte, boyanma yüzdesinin düşük olması nedeniyle geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

Tümör ilişkili APC'ler, antitümör T hücre yanıtlarını kontrol etmek için PD1/ PD-L yolunu kullanabilir (167).

Yaşlanmayla birlikte kadınlar, enfeksiyonlara ve enflamatuar hastalıklara daha yatkınlaşırlar. Bu nedenle, menopoza sonra immünolojik üstünlüklerini kaybediyor gibi görünmektedirler. İmmün sistemdeki spesifik değişiklikler; B hücrelerinin sıklığının azalması, naif T hücrelerinin tükenmesi, artan sayıda farklılaşmış efektör ve bellek T hücresi varlığı ve CD4+/CD8+ hücre oranının azalmasını içerir (212). Viral patojenlere ve tümörlere karşı savaşan doğal öldürücü hücreler yaşla birlikte artmasına rağmen, sitotoksikite ve sitokin üretme yeteneklerinde bir azalma görülür (213).

6. SONUÇ

Günümüze nazaran ilkel kabul edilebilecek ilk kolposkopik inceleme Hans Hinselmann tarafından 1924 yılında gerçekleştirilmiştir (214). Çalışmamız, KETEM tarafından da yönlendirilen veya hastanemize direkt başvuran hastalardan oluşmaktadır. Uzun zamandır kullanılan bir inceleme yöntemi olan kolposkopik muayene yöntemiyle muayenesi sağlıklı olarak kabul edilmemiş hastalardan oluşmaktadır.

HPV'nin immün sistem üzerinden etki gösterdiğini varsayarsak bu adımların tek tek gösterilmesi tanı kadar tedaviye getirebilecek çözümler için de önemli olacaktır. HPV'nin neden olduğu hücrel immünitedeki değişiklikler aydınlatılmış olacaktır. HPV'den korunmamızı sağlayan aşular içinde kilit öneme sahip olan immünite ile ilgili basamaklar aydınlatılmış olacaktır.

Kolposkopi eşliğinde biyopsi işlemi servikal lezyonların tanısında altın standart yöntem olarak güncelliğini korumaktadır. Değerlendirilen biopsilerde, lezyon varlığında bile, araştırmacılar arasında histolojik servikal intraepitelial neoplazi tanısının tutarlılığının olmaması ve diğer lezyonlarla karışması, spesifik belirleyicilerin önemini arttırmaktadır. Ancak, bu işlem invazif bir işlem olduğundan bazı hastalar işlemde kaçınmaktadır. Ayrıca, çoğu zaman hastalara kolposkopik muayene yapılmadan önce hastalar smear ve/veya hpv testlerini yaptırmış olmalıdırlar. Bu süreçlerin uzun zaman alması hastaların endişelerinin artmasında rol alabilmektedir. Smear ve hpv testleri tarama testi olarak kullanılmalara rağmen, tek başına etkinlikleri tartışmaya açıktır. Kolposkopi tarafından desteklenen bir test ihtiyacı doğmuştur. Tarama sonrası riskli bulunan tüm hastalara kolposkopi yapıldığı göz önüne alındığında, kolposkopik bulgular ile korelasyon gösterecek bir testin tanımlanması diagnostik açıdan önem arz eder. İşte bu noktadan yola çıktığımız da, immünohistokimya boyamalar ile aldığımız sonuçlarla periferik kandan değerlendirmenin yapılabileceğini öngörmekteyiz.

CD3, CD4, CD5, CD8 ve PD-1 pozitif hücreler yüksek dereceli lezyonların epiteli içerisinde düşük dereceli lezyonlara kıyasla daha yüksek oranda bulunmaktadır. CD3, CD4 ve CD8 ise Ki-67 proliferasyon endeksi ile de pozitif korelasyon göstermektedir. Bu anlamda adı geçen markerların tanısal potansiyeli

bulunmaktadır. Ancak bu ilişkinin prognoz açısından önemini değerlendirebilmek için daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Sigerist HE. The historical development of the pathology and therapy of cancer. In: Marti-Ibanez F, editor. On the history of medicine. New York: MD Publications Inc. 1960:59-65.

2. Kasting ML, Wilson S, Zollinger TW, Dixon BE, Stupiansky NW, Zimet GD. Differences in cervical cancer screening knowledge, practices, and beliefs: An examination of survey responses. *Prev Med Rep.* 2016;21:169-174.

3. <https://www.uicc.org/what-we-do/advocacy/cervical-cancer-elimination>.
Erişim tarihi: 3.1.2020

4. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on C. ancer; 2013. Erişim adresi: <http://globocan.iarc.fr>, Erişim tarihi:16.01.2020

5. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2014-yili-turkiye-kanser-istatistikleri.html> Erişim tarihi 4.01.2020

6. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vajina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976;20:505-509.

7. Gomel'in Jinekolojisi. Editörler: Prof.Dr.Erkut Attar, Dr. Barış Ata. Nobel tıp kitabevi. 2007:99-135.

8. Zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, Dippold W, Dreger I. Human papilloma viruses and cancer. *Bibl Haematol.* 1975;43:569-71.

9. Zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.* 1976;36:794.

10. Van Doorslaer K, Bernard HU, Chen Z, de Villers EM, zur Hausen H, Burk RD. Papilomaviruses: evolution, Linnaean taxonomy and current nomenclature. *Trens Microbiol.* 2011;19(2):49-50.

11. Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, Hulman G, Kitchener H, Luesley D, et al. Management of women who test positive for high-risk types of human

papillomavirus: the HART study. *Lancet.* 2003;362(9399):1871-1876.

12. Matsukura T, Sugase M. Pitfalls in the epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer using polymerase chain reaction: driver and passenger. *Int J Gynecol Cancer*. 2008;18(5):1042-1050.
13. Vasilev SA. Commentary: Kaiser permanente medicine 50 years ago: the gynecological cancer detection clinic. *Permanente J* 2000;4:39-46.
14. Mar, Vilos GA. The history of the Papanicolaou smear and the odyssey of George and Andromache Papanicolaou. *Obstet Gynecol*. 1998;91(3):479-483.
15. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, Moscicki AB, Smith RA, Eyre HJ, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *CA Cancer J Clin*. 2002;52(6):342-362.
16. ACOG Practice Bulletin Number 131: Screening for cervical cancer. *Obstet Gynecol*. 2012;120(5):1222-1238.
17. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam S, Cain J, et al. American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin* 2012;62(3):147-172.
18. Poomtavorn Y, Suwannarurk K. Accuracy of visual inspection with acetic acid in detecting high-grade cervical intraepithelial neoplasia in pre-and post-menopausal thai women with minor cervical cytological abnormalities. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;16:2327-2331.
19. Kingnate C, Supoken A, Kleebkaow P, Chumworathayi B, Luanratanakorn S, Kietpeerakool C. Is Age an Independent Predictor of High-Grade Histopathology in Women Referred for Colposcopy after Abnormal Cervical Cytology? *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;16:7231-5.
20. Das D, Sarkar B, Mukhopadhyay S, Banerjee C, Biswas SM. An altered ratio of cd4+ and cd8+ t lymphocytes in cervical cancer tissues and peripheral blood – a prognostic clue? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(2):471-478.
21. Davoodzadeh Gholami M, Kardar GA, Saeedi Y, Heydari S, Garssen J, et al. Exhaustion of T lymphocytes in the tumor microenvironment: significance and effective mechanisms. *Cell Immunol*. 2017;322:1-14.

22. Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M, Kühnel F, Woller N. Cd4 and cd8 t lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75:689-713.
23. Carrero Y, Callejas D, Alaña F, Silva C, Mindiola R, Mosquera J. Increased vascular endothelial growth factor expression, CD3-positive cell infiltration, and oxidative stress in premalignant lesions of the cervix. *Cancer.* 2009;115(16):3680-8. doi: 10.1002/cncr.24411
24. Bedoya AM, Jaramillo R, Baena A, Castano J, Olaya N, Zea AH, et al. Location and density of immune cells in precursor lesions and cervical cancer. *Cancer Microenviron.* 2013;6(1):69–77.
25. Ghosh AK, Moore M. Tumour-infiltrating lymphocytes in cervical carcinoma. *Eur J Cancer.* 1992;28(11):1910–1916.
26. Maskey N, Thapa N, Maharjan M, Shrestha G, Maharjan N, Cai H, et al. Infiltrating CD4 and CD8 lymphocytes in HPV infected uterine cervical milieu. *Cancer Manag Res.* 2019;11:7647-7655.
27. Tarakhovsky A, Kanner SB, Hombach J, Ledbetter JA, Müller W, Killeen N, et al. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science.* 1995;269(5223):535-537.
28. Yang W, Song Y, Lu YL, Sun LZ, Wang HW. Increased expression of programmed death (PD)-1 and its ligand PD-L1 correlates with impaired cell-mediated immunity in high-risk human papillomavirus-related cervical intraepithelial neoplasia. *Immunology.* 2013;139(4):513-522.
29. Park HJ, Park JS, Jeong YH, Son J, Ban YH, Lee BH, et al. PD-1 upregulated on regulatory T cells during chronic virus infection enhances the suppression of CD8+ T cell immune response via the interaction with PD-L1 expressed on CD8+ T cells. *Journal of Immunology.* 2015;194(12):5801-5811.
30. Lock JA, Jones H.W. *Te Linde's Operative Gynecology Dokuzuncu Basım (Türkçe basım).* 2005:1231-1254.

31. Singer A. Anatomy of the cervix and physiological changes in cervical epithelium. In: Fox H, Well M. eds. Haines and Taylor Obstetrical and Gynaecological Pathology. New York, NY: Churchill Livingstone, 1995:225-248.
32. Eid S, Iwanaga J, Oskouian RJ, Loukas M, Tubbs RS. Comprehensive Review of the Cardinal Ligament. Cureus. 2018;10(6):e2846.
33. Pratap Kumar, Narendra Malhotra. Jeffcoate's Principles of Gynecology, Seventh International Edition, 2006:409-422.
34. Sankaranarayan R, Basu P, Wesley RS, Mahe C, Keita N, Mbalawa CC, et al. IARC Multicentre Study Group on Cervical Cancer early Detection. Accuracy of visual screening for cervical neoplasia: Result from an IARC multicentre study in INDIA and Africa. Int J Cancer. 2004;110(6):907-913.
35. M.Sinan Beksaç, A. Ayhan, D. Kösebay, K.Yüce. Jinekolojik Onkoloji Kitabı. 2006:1317-1325,1633-44.
36. Moore KL, Persaud TVN. The developing human. Clinically oriented embryology, 8th ed. Saunders. Philadelphia. 2008:243–284.
37. Robboy SJ, Bernhardt PF, Parmley T. Embryology of the female genital tract and disorders of abnormal sexual development. In: Kurman RJ, ed. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract (4th ed). New York, NY: Springer-Verlag, 1994:8-10.
38. Meyer R. Die epithelentwicklung der cervix und portio vaginalis uteri und die pseudoerosio congenita (congenitales histologisches ektropium). Arch Gynecol Obstet. 1910;91:579-598.
39. Martens JE, Smedts F, van Muyden RC, Schoots C, Helmerhorst TJ, Hopman A, et al. Reserve cells in human uterine cervical epithelium are derived from müllerian epithelium at midgestational age. Int J Gynecol Pathol. 2007;26(4):463-468.
40. Ryan: Kistner's Gynecology and Women's Health. 7th ed. Mosby, Inc 1999:95-96.

41. Çiçek N, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A. Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Güneş Kitabevi 2004:145-1163.
42. Disaia JP, Creasman TW. Clinical Gynecologic Oncology 9th Edition. Elsevier. Philadelphia. 2017:1-20.
43. Berek JS, Novak. Jinekoloji. Onüçüncü Baskı, (Türkçe Basım), Nobel Kitabevi 2004:471-505.
44. Bozkurt S, Atasu T, Aydınli K. Jinekolojik Onkoloji, ikinci baskı, 1999:177-189 ve 239-260.
45. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology. 2004;324(1):17-27.
46. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer. 2002;2:342-50.
47. Ramael M, Gudleviciene Z, Didziapetriene J. Natural history and biological behaviour of human papillomavirus: implications for cervical cancer screening. ACTA Med Lituanica. 2004;11:1-7.
48. Amanda T, Alison F. Human papillomavirus (including vaccines). Obstetr Gynecol Reprod Med 2007;17:324-329.
49. Munoz N, Bosch FX, Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl Med. 2003;348(6):518-527.
50. Riemer AB, Keskin DB, Zhang G, Handley M, Anderson KS, Brusica V, et al. A conserved E7-derived cytotoxic T lymphocyte epitope expressed on human papillomavirus 16-transformed HLA-A2+ epithelial cancers. J Biol Chem. 2010;285(38):29608-29622.
51. McCance DJ. Human papillomaviruses. Am Infect Dis Clin North. 1994;8:751-756.

52. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(6):464-474.
53. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus. types reflects viral evolution. *Virology.* 2005;337(1):76-84.
54. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer.* 2007;121(3):621-632.
55. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1456-1460.
56. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis.* 2000;181(6):1911-1919.
57. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005;32(1):43-51.
58. Novak Jinekoloji. Onüçüncü Baskı .(Türkçe Basım).2004;16:471-505.
59. Rock JA, Jones HW. Te Linde's Operative Gynecology Dokuzuncu Basım(Türkçe basım). 2005:1231-1254.
60. Buckley CH, Butler EB, Fox H. Cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol.* 1982;35(1):1-13.
61. Jordan LB, Monaghan H. Pathology of the cervix: recent developments. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2004;16(4):248-254.
62. Wright TC Jr, Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. *N Engl J Med.* 2003;348(6):489-490.
63. Atasü T, Aydınli K. Jinekolojik Onkoloji, Logos Kitabevi, 2. baskı,1999:178-259.

64. Solomon D, Davey D, Kurman R, Morarity A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. JAMA. 2002;287(16):2114-2119.
65. Çiçek N, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A. Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Günes Kitabevi 2004:1145-1163.
66. Sharma S. Vaccines against human papilloma virus and cervical cancer: an overview. Indian J community Med. 2008;33(3):143-145.
67. Schiffman M, Castle PE. The promise of global cervical-cancer prevention. N Engl J Med. 2005;353(20):2101-4.
68. Cronje HS. Screening for cervical cancer in a developing countries. Int J Gynecol and Obstet. 2004;84:101-108.
69. Disaia JP, Creasman TW. Clinical Gynecologic Oncology 9th Edition. Elsevier. Philadelphia. 2017:40-90.
70. Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Barros-Dios XM, Borrás J, et al. International trends in incidence of cervical cancer: II. Skuamous-cell carcinoma. Int J Cancer. 2000;86(3):429-435.
71. <https://screening.iarc.fr/viaviliappendix1.php>. Erişim tarihi:29.12.2019
72. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric. case-control study. Lancet 2002;359:1093-1101.
73. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, et al. International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. Lancet. 2002;359:1085-1092.,
74. Basemen JG. The epidemiology of human papillomavirus infections. Virology J Clin. 2005;32:16-24.

75. Hatch KD. Handbook of colposcopy; diagnosis and treatment of lower genital tract neoplasia and HPV infection. Little, Brown and Co. 1989:7-19.

76. Moodley J. Combined oral contraceptives and cervical cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2004;16:27-29.

77. Sasieni P. Cervical cancer prevention and hormonal contraception. *The Lancet.* 2007;370:1591-1595.

78. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P, Bosch FX, et al. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control.* 2003;14(9):805-814.

79. Satinder Kaura, Jagmohan Singha, Indu Guptab, Veena Jain. Interaction of passive smoking with GST (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) genotypes in the risk of cervical cancer in India. *Cancer genetics and cytogenetics.* 2006;166(2):117-123.

80. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Munoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* November 2002;94(21):1604-1613.

81. Liu T, Soong SJ, Alvarez RD, Butterworth Jr. A longitudinal analysis of human papillomavirus 16 infection, nutritional status and cervical dysplasia progression. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev.* 1995;4:373-80.

82. <https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer.html> Erişim tarihi:10.01.2020.

83. Farley TMM, Rosenborg MJ, Rowe PJ et al. Intrauterine devices and pelvic inflammatory disease: an international perspective. *Lancet* 1991 ve 330:785.

84. <https://www.cancer.gov/types/cervical>. Erişim tarihi:2.11.2020

85. Dos Santos IS, Beral V. Socio-economic differences in reproductive behaviour. *IARC Scientific Publications* 1997;138:285–308.

86. Danforth *Obstetric and Gynecology*, Scott J, Disala P, Hammond C, Spellacy W. 2008:989-1001.

87. Petrosky E, Bocchini JA Jr, Hariri S, et al. Use of 9-valent human papillomavirus (HPV) vaccine: updated HPV vaccination recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015;64:300–4.

88. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6411a3.htm>.

89. <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/wr/mm6832a3.htm>.

90. Beksaç MS, Ayhan A, Demir N, Hassa H, Kösebay D, Tıraş MB, Tuncer ZS, Yaralı H, Yüce F. Jinekoloji, Üreme Endokrinolojisi&İnfertilite ve Jinekolojik Onkoloji. Ankara :Medical Network İntraepitelyal serviks, vajen ve vulva hastalıkları 2006;1326-1359.

91. Parham GP. Comparison of cell collection and direct visualization cervical cancer screening adjuncts. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:13-20.

92. Gay JD, Donaldson LD, Goelner JR. False negative results in cervical cytologic studies. *Acta Cytol* 1985;29:1043-6.

93. Sherman ME, Schiffman M, Herrero R. Performance of a semiautomated Pap smear screening system: Results of a population based study conducted in Guanacaste, Costa Rica. *Cancer* 1998;84:273-80.

94. Pregnancy, W.T. *Ann NY Acad Science Cancer and*, Sep, 2001;943:281-6.

95. Bibbo M, Wied GL, Keebler CM. Evaluation of the endocrinologic condition of the female genital tract by exfoliative cytology. *International Academy of Cytology*.7th edit.1992:44-51.

96. Prof. Dr. Z. Selçuk Tuncer. Türk-Alman Jinekoloji kongresi. Sitoloji ve sıvı bazlı sitoloji kullanımı. 2004.

97. Kuo DY, Goldberg GL. Screening of cervical cancer: where do we go from here? *Cancer Invest.* 2003;21(1):157-61.

98. Berek&Novak' s *Gynecology*. Berek JS. 2008:561-588.

99. Lee KR, Ashfaq R, Birdsong GC et al. Comparison of conventional Papanicolau smears and a fluid based, thin-layer system for cervical cancer screening. *Obstet Gynecol* 1997;90:278.

100. Wilbur DC, Parker EM, Foti JA. Location-guided screening of liquid-based cervical cytology specimens: a potential improvement in accuracy and productivity is demonstrated in a preclinical feasibility trial. *Am J Clin Pathol.* 2002;118(3):399-407.

101. Baggish M.S. Colposcopy of the cervix, vajina and vulva. 2003:1-121.

102. Denny L. The prevention of cervical cancer in developing countries. *BJOG.* 2005;112:1204-1212.

103. Cronje HS, Cooreman BF, Beyer E, Bam RH, Middlecote BD, Dival PD. Screening for cervical neoplasia in a developing country utilizing cytology, cervicography and the acetic acid test. *Int J Gynecol Obstet* 2001;72:151-157.

104. Patima, Cao J, Chen WT, Zhang ZY. Detection of high risk human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2000;9(4):212-215.

105. Hinselmann H. Die Aetiologie Symptomatologie und Diagnostic des uterus carcinoms. In: Veit S, Stöckel W, eds. *Handbuch der gynakologie.* Munich Bergmann. 1930;6(1):854.

106. Kolstad P, Stafli A. *Atlas of Colposcopy*, 3rd edition. Churchill Livingstone, Edinburg, 1982.

107. https://publications.iarc.fr/Advanced-Search?q=cervical+cancer&sort_by=year_desc&limit=20 Erişim tarihi: 1.01.2020

108. Hinselmann H. Die Essigsäureprobe: Ein Bestandteil der Erweiterten Kolposkopie. *Dtsch Med Wochenschr.* 1938;64:40.

109. Burhardt E. Über die atypische Umwandlungszone. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 1959;19:676.

110. Schiller W. Early diagnosis of carcinoma of the cervix Surg. Gynecol Obstet. 1933;56:210.
111. 1955, Donaldson M. Early diagnosis of cancer of the cervix uteri. Br Med J. 1955; 2(4947):1081–1083. doi:10.1136/bmj.2.4947.1081
112. Coppers M, Pixley E, Reid H. Colposcopy 3 rd ed. Charles C Thomas Springfield,1986.
113. Mathevet P, Dargent D, Roy M, Beav G. A Randomized Prospective study comparing three techniques of conization: cold knife, laser ablation and LEEP. Gynecol Oncol 1994; 54:179-179.
114. Williams DL, Dietrich C, McBroom J. Endocervical curettage when colposcopic examination is satisfactory and normal. Obstetric and Gynecology 2000;95:801-803.
115. Jordan J, Arbyn M, Martin-Hirsch P, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for clinical management of abnormal cervical cytology, part 1. Cytopathology. 2008;19(6):342-54. doi: 10.1111/j.1365-2303.2008.00623.x
116. Moawia Elsading MD. Department of obstetric and gynecology School of Medicine Elnailain University Ogssd Colposcopy course. 2008.
117. Kolstad P. The development of the vascular bed in tumors, as seen in squamous cell carcinoma of the cervix uteri. British Journal of Radiology 1965,38:216.
118. Girardi F. The topography of abnormal colposcopy findings. Cervix. 1993;11:45-52.
119. Östör AG, Pagaro R, Davoran RAM, Fortune DW, Chanen W, Rome R. Adenocarcinoma insitu of the cervix. Int J Gynecol Pathol 1984;3:179.
120. Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix, cytologic, colposcopic and histopathologic study. Acta Cytol 1977;21:379.

121. Meisels A, Roy M, Fortier M et al. Human papillomavirus infection of the cervix: the atypical condyloma. *Acta Cytol* 1981;25:7.

122. Pxxley EC. Colposcopic appearances of Human Papillomavirus of the uterine cervix. In: Syrjanen K, Gissmann L, Koss Lg eds. *Papillomavirus and human disease*. Berlin: Springer, 1987:268-295.

123. Walker P, Dexeus S, De Palo G, et al. Nomenclature Committee of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. International terminology of colposcopy: an updated report from the International Federation for Cervical Pathology and. *Cilt Colposcopy*. International terminology of colposcopy: an updated report from the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol*. 2003;101(1):175-177.

124. https://productlibrary.ventana.com/ventana_portal/home.do Erişim tarihi:15.12.2019.

125. <https://www.rochediagnostics.com.tr/home/diagnostik2/ihk.html> Erişim tarihi:15.12.2019.

126. http://www.nikonmikroskop.com/upload_cms/files/pdf/E200_2CE-MQZH-3.pdf Erişim tarihi:20.11.2019.

127. Rosai J. Respiratory tract. In: Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology*. 9th ed. China. Mosby. 2004:305-458.

128. Salgado R, Denkert C, Campbell C, Savas P, Nuciforo P, Aura C, Azambuja E de, Eidtmann H, Ellis CE, Baselga J. Tumor-infiltrating lymphocytes and associations with pathological complete response and event-free survival in HER2-positive early stage breast cancer. *Cilt treated with lapatinib and trastuzumab: a secondary analysis of the NeoALTTO trial*. *JAMA oncology*. 2015;1:448-455.

129. Matter M, Schwarz E, Marafioti T, Rechsteiner MP, Moch H. Immunohistochemical detection of CD3 in T-cell lymphomas: superior sensitivity of rabbit monoclonal 2GV6 antibody compared to mouse monoclonal F7-2-38 antibody. *J Histotechnol*. 2014;37:21-25.

130. Lanier LL, Chang C, Spits H, Phillips JH. Expression of cytoplasmic CD3 epsilon proteins in activated human adult natural killer (NK) cells and CD3 gamma,

delta,epsilon complexes in fetal NK cells. Implications for the relationship of NK and T lymphocytes. . J Immunol. 1992;149:1876-1880.

131. Reinherz E.L., P.C. Kung, G. Goldstein, and S.F. Schlossman. A separation of functional subsets of human T-cells by a monoclonal antibody. Proc Natl Acad Sci USA. 1979;76:40-61.

132. Brady R.L. and A.N. Barclay. The structure of CD4 . Curr. Topics Microbiol Immunol. 1996;205:1-18.

133. Doyle C. and J.L. Strominger. Interaction between CD4 and Class II MHC molecules mediate cell adhesion. Nature. 1987;330:256-259.

134. Dalgleish AG, Beverly PLC, Clamham PR, et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. Nature 1984;312:763-766.

135. Garcia-Herrera, A., Colomo, L., Camos, M. et al. Primary cutaneous small/medium CD4+ T-cell lymphomas: a heterologous group of tumors with deferent clinicopathological features and outcome. J. Clin. Oncol. 2008;26:3364-3371.

136. Maddon P.J., D.R. Littman, D.M. Godfrey et al. The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T-cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. Cell 1985;42:93-104.

137. De Leon ED, Alkan S, Huang JC, His ED. Usefulness of an immunohistochemical panel in paraffin-embedded tissues for the differentiation of B cell non-Hodgkin's lymphomas of small lymphocytes. Mod Pathol 1998;11:1046-1051.

138. Cabezudo E, Carrara P, Morilla R, Matutes E. Quantitative analysis of CD79b, CD5 and CD19 in mature B cell lymphoproliferative disorders. Hematologica 1999;84:413-418.

139. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. 2nd Edition. St. Louis, MO: The C.V. Mosby Company. 1980.

140. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6th edition. In: Rose NR, ed. ASM Press 2002.
141. Reinherz EL, Meuer SC, Schlossman SF. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. *Immunol Today* 1983;4:5-8.
142. Reinherz EL, Hussey RE, Fitzgerald K, et al. Antibody directed at a surface structure inhibits cytolytic but not suppressor function of human T lymphocytes. *Nature* 1981;294:168-170.
143. Bierer BE, Sleckman BP, Ratnofsky SE, et al. The biological roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Ann Rev Immunol* 1989;7:579-599.
144. Van den Berg HA, Wooldridge L, Laugel B, et al. Coreceptor CD8-driven modulation. of T cell antigen receptor specificity. *J Theor Biol* 2007;249:395-408.,
145. Nuckols JD, Shea CR, Horenstein MG, et al. Quantitation of intraepidermal T-cell subsets in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue helps in the diagnosis of mycosis fungoides. *J Cutan Pathol* 1999;26:169-175.
146. Stein H, Lennert K, Feller AC, et al. Immunohistochemical analysis of human lymphoma: correlation of histological and immunohistochemical categories. *Adv Cancer Res* 1984;42:67-147.
147. Thibult ML, et al. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol*. 2013;25:129-37.
148. Francisco L, et al. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol*. 2010;236:219-42.
149. Cogbill CH, et al. Utility of CD279/PD-1 immunohistochemistry in the evaluation of benign and neoplastic T-cell-rich bone marrow infiltrates. *Am J Clin Pathol*. 2014;142:88-98.
150. Brockhoff G, Seitz S, Weber F, Zeman F, Klinkhammer-Schalke M, Ortman O, Wege AK. The presence of PD-1 positive tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancers is associated with a favorable outcome of disease. *Oncotarget*, 2018;9(5):6201.

151. Kitano A, Ono M, Yoshida M, Noguchi E, Shimomura A, Shimoi T, Kodaira M, Yunokawa M, Yonemori K, Shimizu C, Kinoshita T, Fujiwara Y, Tsuda H, Tamura K. Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early. Cilt breast cancer. *ESMO Open*. 2017;2:e000150. doi: 10.1136/esmoopen-2016-000150.

152. Ács B, Madaras L, AM Tőkés, Kovács AK, Kovács E, Ozsvári-Vidákovich M, Karászi A, Birtalan E, Dnk M, Szász AM. PD-1, PD-L1 and CTLA-4 in pregnancy-related—and in early-onset breast cancer: a comparative study. *The Breast*. 2017;35:69-77.

153. Bottai G, Raschioni C, Losurdo A, Tommaso L Di, Tinterri C, Torrisi R, Reis-Filho JS, Roncalli M, Sotiriou C, Santoro A. An immune stratification reveals a subset of PD1/LAG-3 double-positive triple-negative breast cancers. *Breast Cancer Research*, 2016;18:121.

154. Buisseret L, Garaud S, Wind A de, Eynden G Van den, Boisson A, Solinas C, Gu-Trantien C, Naveaux C, Lodewyckx JN, Duvillier H. Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/PD-L1 expression are linked in breast cancer. *Oncoimmunology*. 2017;6:e1257452.,

155. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human. Cilt papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007;370:890-907.

156. De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:453-459.

157. <https://www.uicc.org/what-we-do/advocacy/cervical-cancer-elimination>
Erişim tarihi:5.1.2020.

158. Banura C, Franceschi S, Doorn LJ, Arslan A, Wabwire-Mangen F, Mbidde EK, Quint W, Weiderpass E. Infection with human papillomavirus and HIV among young women in Kampala, Uganda. *J Infect Dis*. 2008;197(4):555-62. doi: 10.1086/526792

159. Brown DR, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naive women aged 16-26 years. *J Infect Dis.* 2009;199:926-935. doi: 10.1086/597307
160. Dursun P, Senger SS, Arslan H, Kuşçu E, Ayhan A. Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among Turkish women at a gynecology outpatient unit. *BMC Infect Dis.* 2009;9:191. doi: 10.1186/1471-2334-9-191
161. Wells M, Östör AG, Crum CP, Franceschi S, Tommasino M. Tumours of the Uterine Cervix. In: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon. IARC Press. 2003;259-283.
162. Kalof N A, Cooper K. Our approach to squamous intraepithelial lesion of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 2007;60:449-455.
163. Kabayashi A, Greenblatt RM, Anastas K, et al. Functional attributes of mucosal immunity in cervical intra epithelial neoplasia and effect of HIV infection. *Cancer* 2004;64:6766-6774.
164. Gultekin M, Zayifoglu Karaca M, Kucukyildiz I, Dundar S, Boztas G, Semra Turan H, et al. Initial results of population based cervical cancer screening program using HPV testing in one million Turkish women. *Int J Cancer.* 2018;142(9):1952-1958.
165. Ernst B, Anderson KS. Immunotherapy for the treatment of breast cancer. *Current oncology reports.* 2015;17(2): 5.
166. Lafferty KJ, Cunningham AJ. A new analysis of allogeneic interactions. *Immunology and Cell Biology,* 1975. 53(1): 27.
167. Keir ME, Butter MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.,* 2008. 26: 677-704.
168. Ceeraz S, Nowak EC, Noelle RJ. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends in immunology,* 2013. 34(11): 556-563.

169. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer cell*, 2015;27(4):450-461.
170. Schütz F, Stefanovic S, Mayer L, Au A von, Domschke C, Sohn C. PD-1/PD-L1 pathway in breast cancer. *Oncology research and treatment*, 2017;40(5):294-297.
171. Jung K, Choi I. Emerging co-signaling networks in T cell immune regulation. *Immune network*, 2013;13(5):184-193.
172. Tripathi S, Guleria I. Role of PD1/PDL1 pathway, and TH17 and treg cells in maternal tolerance to the fetus. *Biomed J*, 2015;38(1):25-31.
173. Pentcheva- Hoang T, Corse E, Allison JP. Negative regulators of T- cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. *Immunological reviews*, 2009;229(1): 67-87.
174. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T- cell tolerance and autoimmunity via the CTLA- 4 and PD- 1 pathways. *Immunological reviews*, 2008;224(1):166-182.
175. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20.
176. McCluggage WG. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in cervical pathology. *Pathology*. 2007;39:97-111.
177. Schwaring R. Little missed markers markers and Ki67. *Lab Investigation*. 1993;68:597-599.
178. Tavassoli FA. General consideration. In: *Pathology of the Breast*. ed.2. Connecticut. Appelton & Lange. 1999:26-62.
179. Bai M, Agnantis NJ, Kamina S, Demou A, Zagorianakou P, Katsaraki A, Kanavaros P. In vivo cell kinetics in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2001;3:276-283.

180. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/stainski67.html> Erişim tarihi:12.01.2020.

181. Schmitt-Graeff A, Koeninger A, Olschewski M, Haxelmans S, Nitschke R, Bochaton - Piallat ML, Lifschitz - Mercer B, Gabbiani G, Langbein L, Czernobilsky B. The Ki67+ proliferation index correlates with increased cellular retinol-binding protein-1 and. Cilt the coordinated loss of plakophilin-1 and desmoplakin during progression of cervical squamous lesions. *Histopathology* 2007;51:87-97.

182. Kuo KT, Chang HC, Hsiao CH, Lin MC. Increased Ki-67 proliferative index and absence of P16INK4 in CIN-HPV related pathogenic pathways different from cervical squamous intraepithelial lesion. *Br J Ophthalmol* 2006;90:894-899.

183. Chung TK, Cheung TH, Wong FW, Wong YF. Ki67 and AgNORs staining in squamous cell carcinoma of the cervix : a comparison. *Gynecol Obstet Invest* 1994;37:127-129.

184. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003;16:665-673.

185. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, Duensing S, Sheets EE, Munger K, Crum CP. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:884-891.

186. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S, Mian C, Egarter-Vigl E. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2004;445:616-620.

187. Kruse AJ, Skaland I, Janssen EA, Buhr-Wildhagen S, Klos J, Arends MJ, Baak JP. Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high- risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability. *Int. J Gynecol Pathol* 2004;23:100-109.

188. Ma L, Fisk JM, Zhang RR, Ulukus EC, Crum CP, Zheng W. Eosinophilic dysplasia of the cervix: a newly recognized variant of cervical squamous intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1474-1484.

189. De Gruijl TD, Bontkes HJ, Peccatori F, et al. Expression of CD3-zeta on T-cells in primary cervical carcinoma and in metastasis-positive and -negative pelvic lymph nodes. *Br J Cancer*. 1999;79(7-8):1127–1132. doi:10.1038/sj.bjc.6690179
190. Nurkkala M, Wassén L, Nordström I, Gustavsson I, Slavica L, Josefsson A, Cilt Eriksson K. Conjugation of HPV 16 E7 to cholera toxin enhances the HPV-specific T-cell recall responses to pulsed dendritic cells in vitro in women with cervical dysplasia. *Vaccine*. 2010;28:5828-5836. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.06.068
191. Sakaguchi S: Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self tolerans and negative control of immune responses. *Ann Rev Immunol*. 2004;22:531-562.
192. Colman N, Birley HD, Renton AM. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* 1994;102:768–774.
193. Park TK, Kim SN. Cell-mediated immunity in patients with invasive carcinoma of the cervix. *Yonsei Med J*. 1989;30(2):164-72.
194. Kohaar I, Hussain S, Thakur N, Tiwari P, Nasare V, Batra S, Singh V, Bhambani S, Das BC, Sarkar DP, Bharadwaj M. Association between human leukocyte antigen class II alleles and human papillomavirus-mediated cervical cancer in Indian women. *Hum Immunol*. 2009;70:222-229. doi:10.1016/j.humimm.2009.01.003
195. Alvaro T, Lejeune M, Escrivá P, Pons LE, Bosch R, Jaén J, López C, Salvadó MT, de Sanjosé S. Appraisal of immune response in lymphoproliferative syndromes: a systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009;70(2):103-113. doi:10.1016/j.critrevonc.2008.09.013
196. Williams MA, Bevan MJ: Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 2007;25:171.
197. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, et al: PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006;443:350.
198. Jin HT, Ahmed R, Okazaki T: Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011;350:17.

199. Currie AJ, Prosser A, McDonnell A, et al. Dual control of antitumor CD8 T cells through the programmed death-1/ programmed death ligand 1 pathway and immunosuppressive CD4 T cells: regulation and counterregulation. *J Immunol.* 2009;183:7898–908.
200. Thompson R Houston, Dong Haidong, Lohse Christine M, Leibovich Bradley C, Blute Michael L, Cheville John C, Kwon Eugene D. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clinical. cancer research.* 2007;13:1757-1761.
201. Reiss K, Forde P, Brahmer J. Harnessing the power of the immune system via blockade of PD-1 and PD-L1: a promising new anticancer strategy. *Immunotherapy,* 2014;6(4): 459-475.
202. Rodig N, Ryan T, Allen JA, Pang H, Grabie N, Chernova T, Greenfield EA, Liang SC, Sharpe AH, Lichtman AH. Endothelial expression of PD- L1 and PD- L2 down- regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. *European journal of immunology,* 2003;33(11):3117-3126.
203. Wang J, Yoshida T, Nakaki F, Hiai H, Okazaki T, Honjo T. Establishment of NODPcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 2005;102(33):11823- 11828.
204. Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, Ishida M, Hiai H, Matsumori A, Minato N. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nature medicine,* 2003;9(12):1477.
205. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity.* 1999;11(2): 141-151.
206. Chang TT, Jabs C, Sobel RA, Kuchroo VK, Sharpe AH. Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine.* 1999;190(5):733-740.

207. Dorfman DM, Brown JA, Shahsafaei A, Freeman GJ. Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *The American journal of surgical pathology*, 2006;30(7):802.

208. Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita D, Morelli AE, Thomson AW. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4⁺ CD25⁺ resting regulatory T cells from activated T cells. *The Journal of Immunology*, 2006;176(5): 2808-2816.

209. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, Higuchi T, Yagi H, Takakura K, Minato N. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumorinfiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National. Academy of Sciences*. 2007;104:3360-3365.

210. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, Greenfield EA, Freeman GJ. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *The Journal of Immunology*, 2003;170(3):1257-1266.

211. Shimauchi T, Kabashima K, Nakashima D, Sugita K, Yamada Y, Hino R, Tokura Y. Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non- neoplastic CD4⁺ T- cells in adult T- cell leukemia/lymphoma. *International journal of cancer*. 2007;121:2585-2590.

212. M. Ghosh, M. Rodriguez-Garcia, and C. R. Wira, "The immune system in menopause: pros and cons of hormone therapy, " *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2014;142:171 –175.

213. R. Solana, R. Tarazona, I. Gayoso, O. Lesur, G. Dupuis, and T. Fulop, "Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans" *Seminars in Immunology*. 2012;24(5):331 –341.

214. Hinselmann H. Verbesserung der Inspektionsmöglichkeit von Vulva, Vagina und Portio. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 1925;77:1733.

215. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Muñoz N. Epidemiology and natural history of human

papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*. 2008;26(10):K1-16. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.05.064

216. Denny L. The prevention of cervical cancer in developing countries. *BJOG*. 2005;112:1204.

217. Delvenne P, Herman L, Kholod N, Caberg JH, Herfs M, Boniver J, Jacobs N, Hubert P. Role of hormone cofactors in the human papillomavirus-induced carcinogenesis of the uterine cervix. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;264:1-5.