

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

EKTOSERVİKAL MİKROBİYOTANIN SERVİKAL
PREİNVAZİV LEZYONLAR VE HPV ENFEKSİYONU
İLE İLİŞKİSİNİN İNCELEMESİ

Dr. Alper DEMİR

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2024

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

EKTOSERVİKAL MİKROBİYOTANIN SERVİKAL
PREİNVAZİV LEZYONLAR VE HPV ENFEKSİYONU
İLE İLİŞKİSİNİN İNCELEMESİ

Dr.Alper DEMİR

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI
Prof. Dr. Tufan ÖGE

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2023-2814 nolu proje kapsamında
desteklenmiştir.

ESKİŞEHİR
2024

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Ektoservikal Mikrobiyotanın Servikal Preinvaziv Lezyonlar ve HPV Enfeksiyonu İle İlişkisinin İncelemesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı tarafından, 22 Kasım 2022 tarihinde, 58 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Alper DEMİR'e ait "Ektoservikal Mikrobiyotanın Servikal Preinvaziv Lezyonlar Ve Hpv Enfeksiyonu İle İlişkisinin İncelemesi" adlı çalışma jürimiz tarafından Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:.....

Jüri Başkanı Prof.Dr. Tufan ÖGE
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Üye Prof.Dr. Ömer Tarık YALÇIN
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Üye Doç.Dr. Melih VELİPAŞAOĞLU
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun/...../.....
Tarih ve/.... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Atilla Özcan ÖZDEMİR
Dekan

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca harcadığı zaman ve ilgiden dolayı başta tez danışmanım Prof. Dr. Tufan ÖGE'ye, kıymetli hocalarım Prof. Dr. Ahmet Başar TEKİN'e, Prof. Dr. Ömer Tarık YALÇIN'a, Prof. Dr. Hüseyin Mete TANIR'a, Doç. Dr. Melih VELİPAŞAOĞLU'na, Doç. Dr. V. Yavuz TOKGÖZ'e, Dr. Öğr. Gör. Elçin TELLİ'ye, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Ener Çağrı DİNLEYİCİ'ye ve uzmanlık eğitimim boyunca desteklerini hiç esirgemeyen araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve tüm desteklerinden ötürü sevgili aileme teşekkür ederim. Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2023-2814 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

Demir A. Ektoservikal Mikrobiyotanın Servikal Preinvaziv Lezyonlar Ve Hpv Enfeksiyonu İle İlişkinin İncelemesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2024.

Serviks kanseri tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olup başlıca nedeni human papillomavirüs virüs(HPV) enfeksiyonudur. Servikovajinal mikrobiyota kompozisyonu ile kalıcı HPV enfeksiyonu arasında ilişkiyi gösteren çalışmalar olmasına rağmen preinvaziv servikal epitelyal lezyonu olan kadınlarda çalışmaların sayısı kısıtlıdır. Bu çalışmada HPV pozitif olan ve güncel smear testlerinde negatif, düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonları (LSIL) ve yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonları (HSIL) olan hastalar ile HPV negatif olup güncel smear testi negatif, atipik skuamöz hücreler (ASCUS), LSIL olan hastaların servikal mikrobiyota kompozisyonunun karşılaştırılması planlandı. Bu çalışma servikal mikrobiyota için örnek alınan 42 kadın hastada yapıldı. Çalışmada HPV pozitif olan 21 olgu ve HPV negatif 21 olguda metagenomik analizlerle mikrobiyota kompozisyonu değerlendirildi. Filum düzeyinde, HPV negatif ve HPV pozitif gruplarda Firmicutes filumu en sık saptanmıştır. HPV pozitif grupta Firmicutes azaldığı, Actinobacteria artışı saptandı. HPV negatif ve HPV pozitif gruplarda cins düzeyinde en sık *Lactobacillus*, tür düzeyinde ise en sık *Lactobacillus iners* (CST III) saptanmıştır. HPV pozitif ve negatif olgularda cins ve suş düzeyinde farklılıklar saptandı. HPV pozitif olgularda, HSIL grubunda *Prevotella copri* ve *Atopobium vaginae*; LSIL grubunda *Gemmiger formicilis*, *Veillonella dispar*, *Prevotella copri* ve *Faecalibacterium prausnitzii*; NSIL grubunda, *Prevotella melaninogenica* sık olarak gözlemlendi. Çalışmamızda HPV negatif grupta da ASCUS, LSIL ve NSIL gruplarında özellikle suş düzeylerinde farklılıklar mevcuttu. SIN durumuna göre gruplarda en sık saptanan suş, *Lactobacillus iners* olup, LSIL olgularında mikrobiyota kompozisyonunda %87.9 düzeyinde saptandı. HPV pozitif NSIL olgularında cins düzeyinde *Parabacteroides*, tür düzeyinde ise *Blautia obeum*, *Parabacteroides_s*, ve *Peptostreptococcus_s* baskın olarak saptandı. HPV negatif NSIL olgularında ise *Paracoccus marcusii* türü baskın olarak saptandı. NSIL olgularında HPV pozitif olgularda *Blautia obeum*, HPV negatif olgularda *Paracoccus marcusii* saptanması, HPV pozitifliğin mikrobiyota kompozisyonunda aynı patolojik durumdaki farklılığını göstermektedir. Özellikle HPV pozitif olgularda *Blautia obeum* baskınlığının daha büyük kohortlarda gösterilmesi faydalı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: serviks kanseri, HPV, mikrobiyota, mikrobiyom, servikal mikrobiyota

Destekleyen Kurum: Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2023-2814 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Demir A. Investigation of the Relationship of Ectocervical Microbiota with Cervical Preinvasive Lesions and Hpv Infection. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Speciality Thesis, Eskişehir, 2024. Cervical cancer is a significant global health issue that is predominantly caused by infection with the human papillomavirus (HPV). While there is evidence linking the cervico-vaginal microbiota to persistent HPV infection, research on women with pre-invasive cervical epithelial lesions is limited. The objective of this study was to analyze and compare the composition of cervical microbiota in patients who tested positive for HPV and had low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) or high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL), with patients who tested negative for HPV and had negative results for both current smear tests with atypical squamous cells (ASCUS) and LSIL. The investigation was conducted on a sample of 42 female patients, who were examined for cervical microbiota. Metagenomic analysis was used to assess the composition of the microbiota in a group of 21 patients who tested positive for HPV and another group of 21 patients who tested negative for HPV. The Firmicutes phylum was the most commonly observed at the phylum level in both the HPV negative and HPV positive groups. The abundance of Firmicutes decreased while the abundance of Actinobacteria increased in the group of individuals who tested positive for HPV. *Lactobacillus* and *Lactobacillus iners* (CST III) was the predominant genus and species in both the HPV negative and HPV positive groups. Distinct variations were seen in at genus and species level between HPV positive and negative group. In HPV positive cases, at species level *Prevotella copri* and *Atopobium vaginae* in the HSIL group, *Gemmiger formicilis*, *Veillonella dispar*, *Prevotella copri*, and *Faecalibacterium prausnitzii* in the LSIL group, and *Prevotella melaninogenica* in the NSIL group, have been observed. We also observed differences at species level among the ASCUS, LSIL, and NSIL groups in HPV negative group. Based on the SIN status, the predominant species was *Lactobacillus iners*, 87.9% in the microbiota composition of LSIL patients. Parabacteroides at the genus level and *Blautia obeum*, *Parabacteroides_s*, and *Peptostreptococcus_s* at the species level were more abundant in HPV positive NSIL group. *Paracoccus marcusii* was more abundant in HPV negative NSIL group. The presence of *Blautia obeum* in HPV positive NSIL cases and *Paracoccus marcusii* in HPV negative cases in NSIL cases indicates that the microbiota composition differs based on HPV status in the same pathological condition. Displaying the prevalence of *Blautia obeum*, particularly in HPV positive patients, in larger groups would be beneficial.

Key Words: cervical cancer, HPV, microbiome, microbiota, cervical microbiota

Supporting Institution: This study was supported by Eskişehir Osmangazi University Scientific Research Projects Coordination Unit within the scope of project number TTU-2023-2814.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Serviks Anatomisi ve Histolojisi	4
2.2. Serviks Kanseri Taraması ve Smear Testi	10
2.3. Servikal Sitoloji Sonuçları ve Yorumlanması	16
2.4. Human Papilloma Virus (HPV) Tanımı ve Tiplendirilmesi	19
2.5. HPV Enfeksiyonunun Doğal Seyri	23
2.6. Mikrobiyota ve Servikovaginal Mikrobiyotanın Özellikleri	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIS	Adenokarsinoma in situ
AGC	Atipik glandüler hücreler
AGC-EC	Endoservikal hücrelerden kaynaklanan atipik glandüler hücreler
AGC-EM	Endometrial hücrelerden kaynaklanan atipik glandüler hücreler
AGC-NOS	Sınıflandırılmayan atipik glandüler hücreler
AGUS	Önemi bilinmeyen atipik glandüler hücreler
ASC	Atipik skuamöz hücreler
ASC-US	Önemi bilinmeyen atipik skuamöz hücreler
ASC-H	Yüksek dereceli intraepitelyal lezyonun dışlanmadığı atipik skuamöz hücreler
BV	Bakteriyel vajinozis
CIN	Servikal intraepitelyal neoplazi
CST	The Vaginal Community State Types (Vajinal Bakteri Topluluğu)
DNA	Deoksiribonükleik asit
ESOGÜ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HPV	Human Papilloma Virüs
HPV DNA	Human Papilloma Virüs

HRHPV	Yüksek Riskli Human Papilloma Virüs
HSIL	Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
Ig	İmmünglobilin
IL	İnterlökin
LAST	Alt Anogenital Skuamöz Terminoloji Projesi
LRHPV	Düşük Riskli Human Papilloma Virüs
LSIL	Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
NILM	İntraepitelyal Lezyon veya Malignite Açısından Negatif
OKS	Oral kontraseptif
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
SCJ	Skuamokolumnar bileşke
SIL	Skuamöz intraepitelyal lezyon
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1 Serviksin anatomisi	5
2.2 Ektoservikal alandaki skuamöz epitel ve tabakaları	6
2.3 Skuamokolumnar Bileşkenin Çeşitli Durumlara Göre Konumu	7
2.4 Transformasyon Zonu	8
2.5 Skuamokolumnar Bileşke ve Metaplazi Alanı	9
2.6 Servikal Fırçalar ve Sıvı Temelli Sitolojik Değerlendirme Kiti	12
2.7 Pap Smear Tekniği	13
2.8 HPV-16 Genomunun ~8000 Bp'lik Haritası Ve Genlerin Temel İşlevleri	20
2.9 CST'lerin Etnik Gruplara Göre Dağılımları	28
2.10 Vajinal mikrobiyota CST haritası (CST: community state type)	30
2.11 Servikovajinal mikrobiyotanın HPV enfeksiyonu ile potansiyel ilişkisi	31
4.1 42 kişilik Çalışma Grubunun Yaş Değişkenleri	41
4.2 Çalışma Grubunun Korunma Yöntemleri	42
4.3 HPV pozitif ve HPV negatif örneklerde Chao1 indeksi karşılaştırması	44
4.4 HPV pozitif ve HPV negatif örneklerde Shannon indeksi karşılaştırması	45
4.5 HPV pozitif ve HPV negatif örneklerde observed OTU indeksi karşılaştırması	45
4.6 HPV pozitif ve HPV negatif örneklerde Simpson indeksi karşılaştırması	46

4.7	HPV Pozitif ve HPV Negatif Olgularda Mikrobiyota Kompozisyonu	46
4.8	HPV negatif ve HPV pozitif örneklerin mikrobiyota analizlerinin filum düzeyinde karşılaştırması	47
4.9	HPV negatif ve HPV pozitif örneklerin mikrobiyota analizlerinin cins düzeyinde karşılaştırması	48
4.10	HPV negatif ve HPV pozitif örneklerin mikrobiyota analizlerinin tür düzeyinde karşılaştırması	49
4.11.	HPV negatif ve HPV pozitif örneklerinde LEfSe analizi	50
4.12	HPV negatif ve HPV pozitif örneklerinde radyal filogenetik ağacın her bir halkasının farklı bir taksonomik seviye olduğunu gösteren bir kladogram	51
4.13	HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında Chao1 indeksi karşılaştırması	52
4.14	HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında Shannon indeksi karşılaştırması	53
4.15	HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında observed OTU indeksi karşılaştırması	53
4.16	HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında Simpson indeksi karşılaştırması	54
4.17	HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında Bray Curtis (A), Jaccard (B), Weighted Unifrac (C) ve Unweighted Unifrac (D) temel koordinat analizleri (PCoA)	54

- 4.18 HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında filum düzeyinde karşılaştırması 56
- 4.19 HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında cins düzeyinde karşılaştırma 57
- 4.20 HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında tür düzeyinde karşılaştırması 58
- 4.21 HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında örneklerinde LEfSe analizi. 59
- 4.22 HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında örneklerinde radyal filogenetik ağacın her bir halkasının farklı bir taksonomik seviye olduğunu gösteren kladogram. 60

TABLÖLAR

		Sayfa
2.1	Bethesda Sistemi Sitoloji Sonuç Raporu Bileşenleri	14
2.2	Smear Testinde Epitel Hücre Anormallikleri	15
2.3	HPV tiplerinin risk gruplarına göre dağılımı	19
4.1	HPV Durumlarına Göre Grupların Korunma Yöntemleri	42
4.2	HPV Durumlarına Göre Grupların Alkol Kullanımı	43
4.3	HPV Durumlarına Göre Grupların Sigara Alışkanlıkları	43

1.GİRİŞ

Serviks kanseri dünyada kadınlarda en sık görülen dördüncü kanserdir (1). Serviks kanseri çoğu zaman human papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu ile birlikte dir. Epitel hücrelerini enfekte eden 200'den fazla farklı HPV tipi tanımlanmıştır (2). Malignite potansiyellerine bağlı olarak HPV tipleri düşük riskli (lr-HPV) ve yüksek riskli (hr-HPV) olarak ayrılır. Düşük riskli HPV tipleri genellikle anogenital siğillerin gelişiminde etkilidir. Yüksek riskli HPV tipleri ise çoğunlukla servikal intraepitelyal lezyonlar ve serviks kanseri ile ilişkilidir. Cinsel olarak aktif kadınların %80'inin 50 yaşına kadar bir noktada HPV ile enfekte olacağı tahmin edilmektedir (3).

HPV enfeksiyonu kendi başına serviks kanserine yol açmak için yeterli olmasa da kalıcı HPV enfeksiyonun gelişimi hastalarda servikal lezyonun ilerlemesi ve sonucunda kanser gelişimi için önemli bir faktördür. HPV ile enfekte olmuş kadınların çoğunda serviks kanseri gelişmez, çünkü immün sistem yanıtı servikal preinvaziv lezyon gelişimini ve kansere ilerlemesini önler (4). HPV ile enfekte olan kadınların küçük bir bölümünde HPV enfeksiyonu baskılanamaz ve HPV virüsünün kalıcılığı sonucunda servikal preinvaziv lezyonlar ve serviks kanseri gelişir. Bu durum, HPV enfeksiyonu dışında diğer eşlik eden faktörlerin de servikal preinvaziv lezyonların serviks kanserine ilerlemesini veya gerilemesini etkilediğini düşündürmektedir. Virüsün kalıcılık oranlarıyla ilişkili olduğu düşünülen faktörler yaş, immün yetmezlik, sigara kullanımı, oral kontraseptif (OKS) kullanımı ve *Chlamydia trachomatis* enfeksiyonudur(5).

Genitoüriner sistem mikrobiyotanın bir parçası olan servikal mikrobiyotada da onkojenik HPV enfeksiyonlarının kalıcılığında çok önemli bir rol oynar. Servikal mikroçevre immün hücrelerden ve lokal immün yanıtları modüle eden spesifik servikal mikrobiyotadan oluşmaktadır (6). Büyük bölümünü bakteriler oluşturmak üzere çok sayıda farklı mikroorganizma serviks mikrobiyotasını oluşturmaktadır. Bu mikroorganizma türlerin tipleri ve göreceli oranlarındaki değişiklikler hastalıklara neden olabildiği gibi, hastalıklara karşı olan savunma mekanizmasında da önemli rol oynamaktadır.

Mikrobiyota kompozisyonun değerlendirilmesi amacı ile kullanılan yeni nesil metagenomik analizler ile reproduktif çağdaki sağlıklı kadınlarda servikovajinal mikrobiyotada tipik olarak *Lactobacillus* cinsinin baskın olduğu bulunmuştur. Tür düzeyinde ise coğrafi ve yaşı ile farklılıklar göstermekle birlikte en sık saptanan bakteriler *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii* ve *Lactobacillus gasseri*'dir (7). Laktobasiller dışında düşük oranda *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus spp.*, koagülaz negatif stafilokoklar, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, mikoplazma ve üreaplazma suşları ile mayalar bulunabilmektedir. Postmenapozal dönemde laktobasillerin hakimiyeti azalır, yerini Enterobacteriaceae ailesine bırakır (8).

Servikovajinal mikrobiyota kompozisyonunda yer alan bakterilerin servikal ve vaginal epitel hücrelerine yapışmaları, antimikrobiyal bileşikler üretmeleri ve diğer patojenler ile yarışmaları ile, enfeksiyonlara karşı yanıtta immün sisteme katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu bakterisidal bileşikler, vajinal pH için gerekli olan laktik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin benzeri maddeleri içerir (9). Servikovajinal mikrobiyota kompozisyonunda laktobasillerin azalması ile mikroorganizma çeşitliliği artması, bakteriyel vajinozise neden olabilmektedir. Bu durumda ortaya çıkan anaerobik mikroorganizmalar patojenlere karşı koruyucu servikal mukozayı bozacak yan ürünler ile savunma sisteminde bir defekt oluşturur. Bakteriyel vajinozis halinde mikroorganizmalarca salgılanan aktif sialidaz enzimleri ve salgılanan musin tabakası servikal epiteli bozma yeteneğine sahiptir. Bakteriyel sialidaz, lokal immünoglobulinleri ve lokal immün savunmayı bozabilir. Bu nedenle laktobasillerin hakimiyetinden uzak polimikrobiyal bir servikovajinal ortam, HPV enfeksiyonu için daha duyarlı ve kalıcı HPV enfeksiyonuna neden olabilir (10,11).

Mevcut literatür çalışmaları servikovajinal mikrobiyota kompozisyonu çeşitliliğinin artmasının kalıcı HPV enfeksiyonu gelişmesinde rol oynadığını göstermesine rağmen preinvaziv servikal epitelyal lezyonu olan kadınlar üzerindeki etkisini değerlendiren çalışma sayısı kısıtlıdır (10). Bu çalışmada kliniğimiz polikliniğine başvuruş hastalarda HPV pozitif olan ve güncel smear testlerinde negatif, düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (LSIL) ve yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (HSIL) olan hastaların servikal mikrobiyota

numunesi ile HPV negatif olup güncel smear testi negatif, atipik skuamöz hücreler (ASC), düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (LSIL) olan hastaların servikal mikrobiyota kompozisyonun karşılaştırılması planlandı.

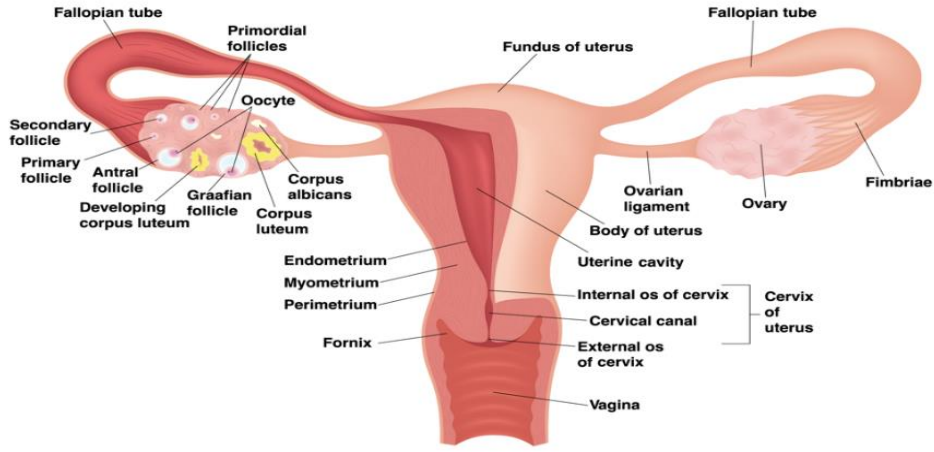


2.GENEL BİLGİLER

2.1. Serviks Anatomisi ve Histolojisi

Serviks uterus istmusu ile vajen arasında yer alan uterusun alt üçte birlik oluşturan 2-4 cm uzunluğunda fiçı şeklinde bir organdır. Kadının doğum sayısı, hormonal durumu ve yaşı bağlı olarak şekli ve büyüklüğü değişir. Vajinal yolla doğum yapmış bir kadında, serviks genellikle büyüktür ve eksternal os enine geniş bir yarık olarak görülür. Doğum yapmamış bir kadında eksternal os yuvarlak iğne deliği şeklinde küçük bir açıklığa benzemektedir. Serviks portio vaginalis ve portio supravaginalis olmak üzere iki bölüme ayrılır. Serviksin uterin kaviteye açılan servikal kanal bölümü servikal internal os, vajene açılan kısmı ise servikal eksternal os olarak adlandırılır. Bu iki kısım arasında yer alan 2-3 santimetrelilik servikal kanal bölümüne de endoservikal kanal adı verilir. Spekulum ile inceleme sırasında kolayca görülebilen eksternal osun dış kısmından başlayan serviks bölgesi ise ektoserviks olarak adlandırılır. Anterior forniks, serviks ile vajenin ön kısmı arasındaki bölüm olarak isimlendirilirken, posterior forniks ise serviks ile vajenin arka duvarı arasındaki bölüm, lateral forniks ise serviks ile vajenin lateral duvarı arasındaki bölüm olarak isimlendirilmektedir.

Serviksin damarları, lenfatikleri ve sinir yapıları yoğun fibro-müsküler dokudan oluşan servisk stromasından geçerler. Servikal arterler internal iliak arterlerden uterin arterlerinin servikal ve vajinal dallarından köken alır. Serviksin dış yüzünde, saat 3 ve 9 yönünde inerler. Arterlere paralel olarak seyreden venöz damarlar ise hipogastrik venöz ağa dökülürler. Serviksin lenfatik damarları ise ana iliak nodlara, internal iliak ve eksternal iliak nodlara, obturator nodlara ve parametrial nodlara drene olur. Servikal innervasyonunu sağlayan sinirler ise öncelikle hipogastrik pleksustan köken almaktadır. Endoservikal bölgede duysal sinir liflerinin uçları yoğun olarak bulurken ancak ektoservikal bölgede çok az sayıda bulunmaktadır. Bu sebeple kadınlarda biyopsi ve kriyoterapi gibi girişimsel işlemler lokal anestezi ve analjezi yapılması gerekmeden iyi tolere edilmektedir. Serviks ön yüzünde mesane ile komşudur. Serviksin parametrium içinde seyreden üreterlerle de yakın komşuluğu bulunmaktadır (12,13).



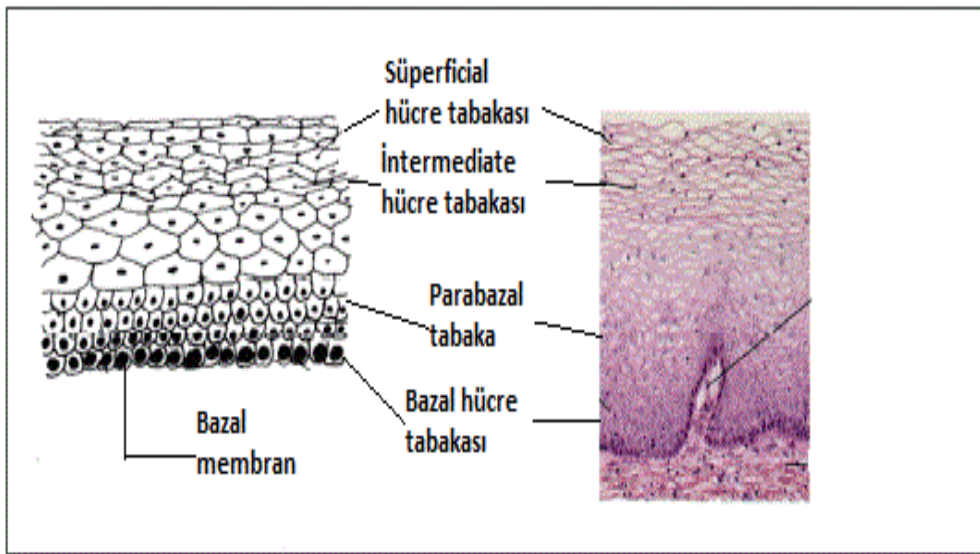
Şekil 2.1 Serviks Anatomisi

Ektoserviks kısmında servikal mukoza yassı epitel ile örtülü iken endoservikal kanalda boyunca kolumnar epitel ile örtülüdür. İki epitelin karşılaştığı bu yer ise skuamokolumnar bileşke (SCJ) olarak isimlendirilmektedir.

Ektoservikal alandaki skuamöz epitel; glandüler yapı içermeyen nonkeratinize çok katlı yassı epiteldir ve 4 tabakadan (süperfisyel, intermediyer, parabazal ve bazal tabaka) oluşmakta olup opak ve gözle muayenede soluk pembe renkli görünür. En alt kısımda yer alan bazal tabaka; büyük nükleuslu, dar sitoplazmalı ve koyu boyanan, tek katlı hücrelerden oluşur ve mitoz yeteneği ile epitelin rejenerasyonunu sağlar. Bazal tabaka skuamöz epitel ile altındaki servikal stromayı birbirinden ayırır. Bazal hücreler parabazal, intermediate ve superficial tabakaları oluşturmak üzere bölünür ve farklılaşırlar. Bazal tabakanın üzerinde yer alan parabazal tabaka; polihedral görümlü düzensiz dağılan hücrelerden oluşur. İntermediyer tabaka glikojenden zengin, küçük çekirdekli, daha iyi diferansiye hücrelerden oluşur. Süperfisyel tabaka; glikojen içeriği yüksek, sitoplazması geniş ve küçük çekirdekli yassı uzun hücre tabakasından oluşmaktadır. Bazal tabakadan en üstte bulunan superficial tabakaya

doğru gidildikçe en üst yüzeyde bulunan hücrelerde sitoplazmada artış ve çekirdek büyüklüğünde azalma gelişmektedir (13).

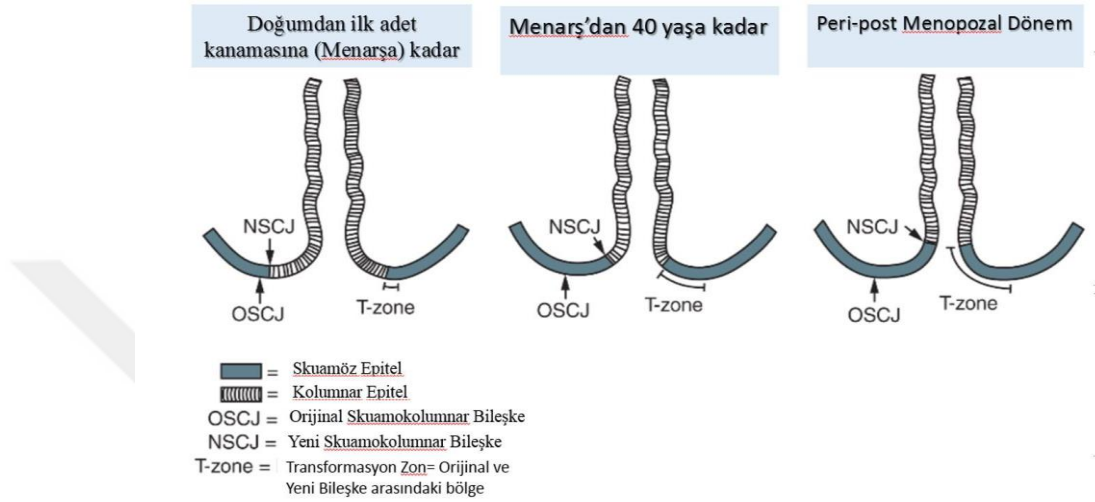
Östrojen etkisiyle epitel kalınlığı ve glikojen artmaktadır. Postmenopozal kadınlarda, epitel hücreleri parabazal tabakadan ilerisine olgunlaşamadıklarından superficial ve intermediate hücreler gibi çok katlı epitel şeklinde birikemezler. Bunun sonucunda skuamöz epitel atrofiye bağlı olarak incelik, soluk ve subepitelyal peteşilerin görüldüğü, travmaya meyilli ve çok kırılğan bir halde görünür.



Şekil 2.2 Ektoservikal alandaki skuamöz epitel ve tabakaları

Endoservikal kanalın kolumnar epiteli ise çekirdekleri koyu boyanan, tek katlı silindirik-glandüler yapı içeren hücrelerle döşenmiştir. Muayenede damar yapıları seçilen, kırmızı renkli bir alan şeklinde görünür çünkü tek katlı ince hücre tabakası, alttaki stromanın renginin kolayca görünmesine olanak tanır. Kolumnar epitel serviks stromasına invajinasyonlar yapar ve bunun sonucunda endoservikal kripleri (bezleri) oluşturur, buradan serviksi ve vajinayı ıslatan mukus salgılanır. İnvajinasyonlarda tıkanıklık olması halinde Nabothi kistleri denen yoğun mukus içerikli kistler meydana gelir.

Endoservikal epitel üst sınırdan uterusun endometrial epitelini ile kaynaşır, alt sınırdan ise serviksın skuamöz epitelini ile karşılaşır. Eksternal osu göre skuamokolumnar bileşkenin konumu yaşa, hormonal duruma, doğum travması öyküsüne ve gebelik durumuna bağılı olarak değışik gösterir (14).

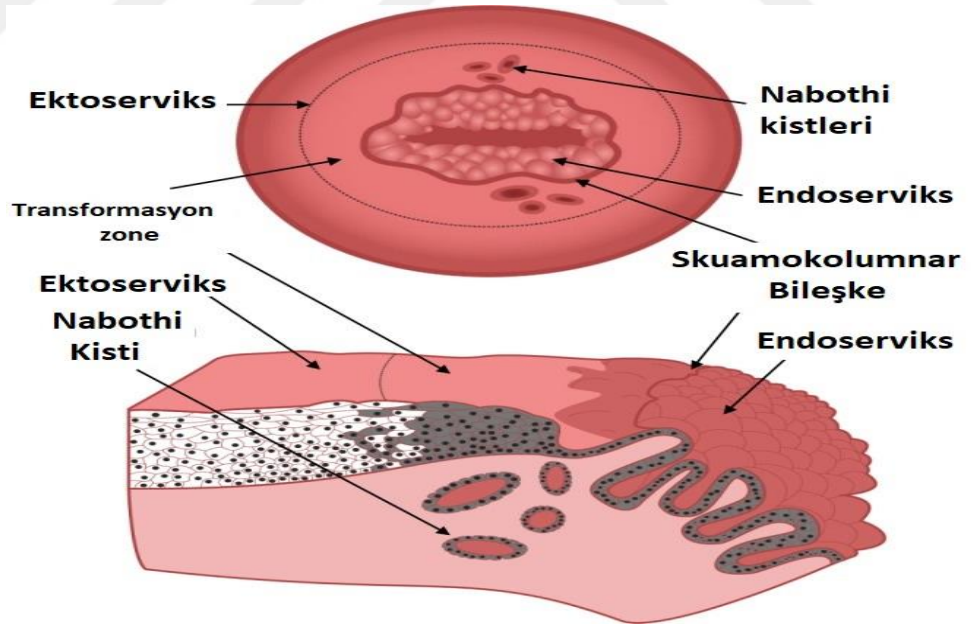


Şekil 2.3 Skuamokolumnar Bileşkenin Çeşitli Durumlara Göre Konumu

Skuamokolumnar bileşke çocuklukta ve perimenarşta, eksternal os seviyesinde veya çok yakınındadır. Puberte sonrası ve reproduktif dönemde, kadın genital organları östrojen salgısının etkisi altında büyür. Böylece servikte büyür ve endoservikal kanal uzar. Bu olay, ektoservikste ki kolumnar epitelin, özellikle ön ve arka dudaklarda eversiyonuna (dışa dönme) yol açar ve ektropiyon ile sonuçlanır. Bu nedenle, reproduktif çağda ve gebelik sırasında skuamokolumnar bileşke ektoservikste eksternal ostana uzakta yerleşmiştir. Dışa dönen kolumnar epitel asidik vajen ortamı ile karşılaştığında kolumnar epitelin harabiyetine yol açar ve metaplastik skuamöz epitel tarafından nihai olarak yerinin alınmasına yol açar. Metaplazi, olgun bir epitel tipinin bir diğeri epitel tipine değışmesi olgusudur. Bir kadın reproduktif dönemden perimenopozal döneme ilerlerken, skuamokolumnar bileşkenin konumu ektoserviksten eksternal osu doğru çekilmeye başlar. Buna bağılı olarak, ektoservikal kolumnar epitelin etkilenen bölümlerinde metaplastik yeni bir skuamöz epitel artarak oluşur ve sonuçta eksternal ostana değışken uzaklıklarda yer alır. Perimenopozal dönem ve sonrasında menopozun başlaması ile serviks, östrojen eksikliği sonucu atrofiye

uğrayarak küçülür ve böylece skuamokolumnar bileşkenin eksternal osa ve endoservikal kanalın internal kısmına doğru yer değiştirmesi giderek hızlanır. Postmenopozal kadınlarda, skuamokolumnar bileşke endoservikal kanalın içinde yerleşmiş olup ve sıklıkla muayenede görülememektedir (15).

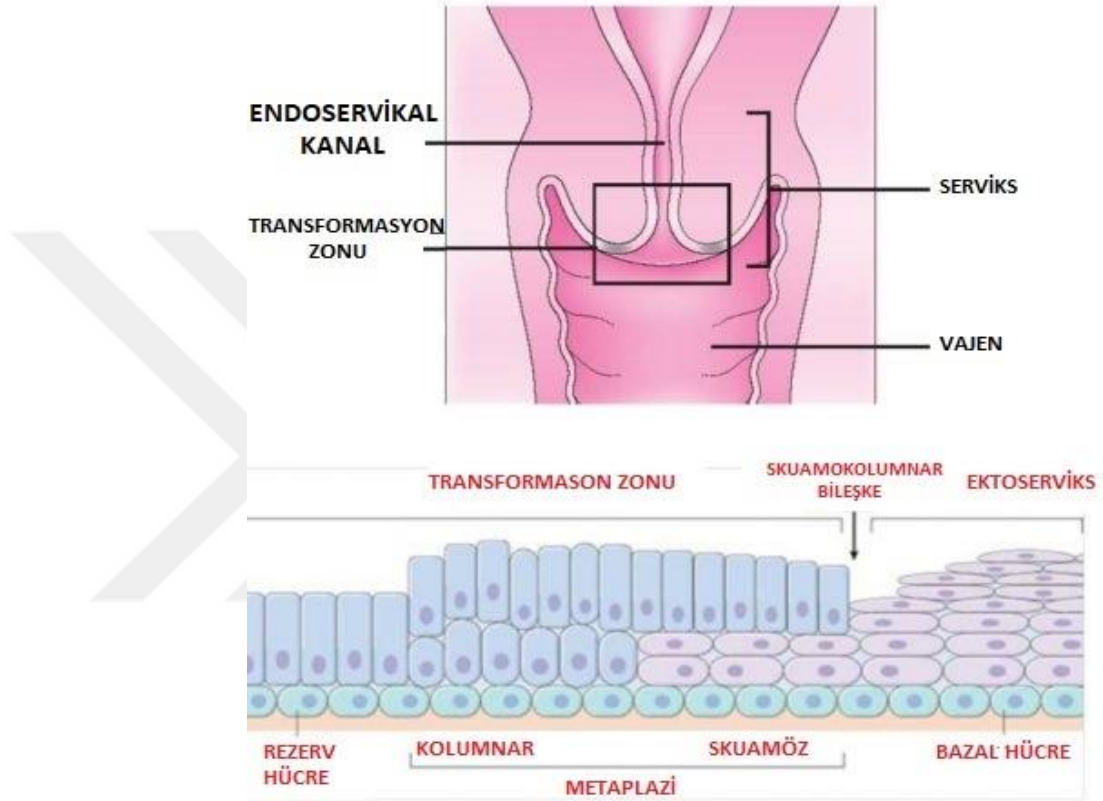
Kolumnar epitelin metaplazik skuamoz epitel ile değiştirildiği ve/veya değiştirileceği serviks alanına transformasyon zonu olarak isimlendirilir. Muayenede transformasyon zonunun iç sınırı skuamokolumnar bileşkeyi izleyerek ve dış sınırı en uzaktaki naboth kistlerinin gözlenmesi veya kript ağzlarını belirleyerek tanımlanabilmektedir. Transformasyon zonu, premenopozal kadınlarda öncelikle ektoservikte yer alır. Menopozla beraber ileri yaşlara doğru azalan östrojen seviyeleri ile serviks atrofiye uğrayarak küçülür. Sonuçta transformasyon zonu endoservikal kanalın içine doğru giderek çekilir. Neredeyse tüm servikal neoplaziler öncelikle bu bölgede, skuamokolumnar bileşke yakınında gelişir.



Şekil 2.4 Transformasyon Zonu

Skuamoz metaplazide gerçekleşen ilk olay kolumnar epitelin ekspoz alanlarında, rezerv hücre adı verilen küçük, yuvarlak, subkolumnar hücrelerin ortaya

çıkışıdır. Bu rezerv hücreler çoğalırlar ve ince, tabaka oluşturmeyen, çok hücreli immatür skuamöz epitel adı verilen bir epitel oluşturmak için farklılaşırlar. İmmatür skuamöz metaplastik epiteldeki hücreler glikojen oluşturmazlar ve bu nedenle lugol solüsyonu ile kahverengi veya siyah boyanmazlar. Aynı anda bir çok immatür skuamöz metaplazi odakları ortaya çıkabilir (16).



Şekil 2.5 Skuamokolumnar Bileşke ve Metaplazi Alanı

Yeni oluşan immatür metaplastik epitelin sonraki gelişimi iki yolun herhangi birine doğru olabilir. Kadınların büyük çoğunluğunda; matür, sıralı, glikojen oluşturan, pratik olarak her bakımdan ektoservikte bulunan skuamöz epitele benzeyen skuamöz metaplastik epitel gelişir. Bu nedenle, Lugol solüsyonu uygulanması sonrası kahverengi veya siyaha boyanır. Naboth kistleri adı verilen birçok kist, matür metaplastik skuamöz epitelde gözlenebilir. Bunlar üstlerini örten metaplastik skuamöz epitel tarafından sıkıştırılan kolumnar epiteldeki kriptlerin ağızlarının tıkanması sonucu gelişen retansiyon kistleridir. Kistlerin içine gömülen kolumnar epitel mukus

salgılamaya devam edebilir böylece kistleri büyütebilir. Kapalı kalan mukus gözlem muayenesinde kiste fildişi beyazı bir renk verir.

Kadınların küçük bir azınlığında ise immatür skuamoz metaplazi, bazı HPV tipleri ile enfeksiyon sonucu displastik bir epitele (prekanseroz hücresel değişiklikler gösteren epitel) dönüşebilir.

2.2. Serviks Kanseri Taraması ve Smear Testi

Dünya genelinde serviks kanseri kadınlar arasında en sık görülen kanserlerden biri olmaya devam etmektedir. Kadınlar arasında meme, kolorektal ve akciğer kanserinden sonra en sık görülen dördüncü kanser serviks kanseridir. Yeni vakaların ve ölümlerin çoğunluğu düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmekte olup, bu ülkelerde kadınlar arasında en sık görülen üçüncü kanser türüdür. Serviksin kolayca görselleştirilebilmesi ve servikal numune alınabilmesi imkanı, serviks kanserinin doğal seyirinin çok erken anlaşılmasına katkıda bulunmuştur (17).

Serviks kanseri çoğu zaman HPV enfeksiyonu ile birlikte dir. Serviks kanseri öncelikle 15 yüksek riskli HPV türünden biri veya birkaçının servikal epitel hücreleri üzerinde kalıcı enfeksiyonunun uzun vadeli bir sonucu olarak gelişmektedir. Kalıcı HPV enfeksiyonu, 6-12 ay sonra tekrarlanan numunelerde aynı tipe özgü HPV DNA'nın varlığı ile gösterilir. Zaman içinde takip edilen kadınların %80'inden fazlası en az bir yüksek riskli HPV enfeksiyonuna yakalanacaktır, bu da HPV enfeksiyonun yaygın olduğunu ve bulaşma kolaylığını göstermektedir. Bununla birlikte, tüm enfeksiyonların yalnızca onda biri kalıcı hale gelir ve bu kadınlarda servikal kanser öncesi lezyonlar gelişebilir. Dünya çapında her yıl tahmin edilen 604.000 yeni serviks kanseri vakasından HPV 16 ve HPV 18 vakaların %71'ini oluşturmaktadır; HPV tipleri 31, 33, 45, 52 ve 58 ise rahim ağzı kanseri vakalarının %19'unu oluşturmaktadır (18).

Yeni HPV enfeksiyonlarının yaklaşık %90'ının enfeksiyonun kazanılmasından itibaren 2 yıllık bir süre içinde temizlendiği ve kadınların yalnızca yaklaşık %10'unda devam ettiği iyi bir şekilde belgelenmiştir. Virüsün tamamen temizlenip

temizlenmediği veya bazı durumlarda yeniden aktivasyon potansiyeli ile bazal hücrelerde latent kalıp kalmadığı tartışmalıdır (19).

Serviks kanser taraması serviks kanserinin küresel olarak ortadan kaldırılmasında önemli bir stratejidir. Servikal kanser taraması preinvaziv lezyonların erken saptanması veya tedavi imkanına sahip erken evre servikal kanseri tespit etmeyi sağlar. Servikal preinvaziv lezyonlar her zaman gözle görülemeyip tarama yöntemleri sayesinde saptanması mümkündür. Tarama HPV DNA testlerinin de eklenmesi ile servikal smear sitoloji ve HPV DNA ile yapılabilmektedir.

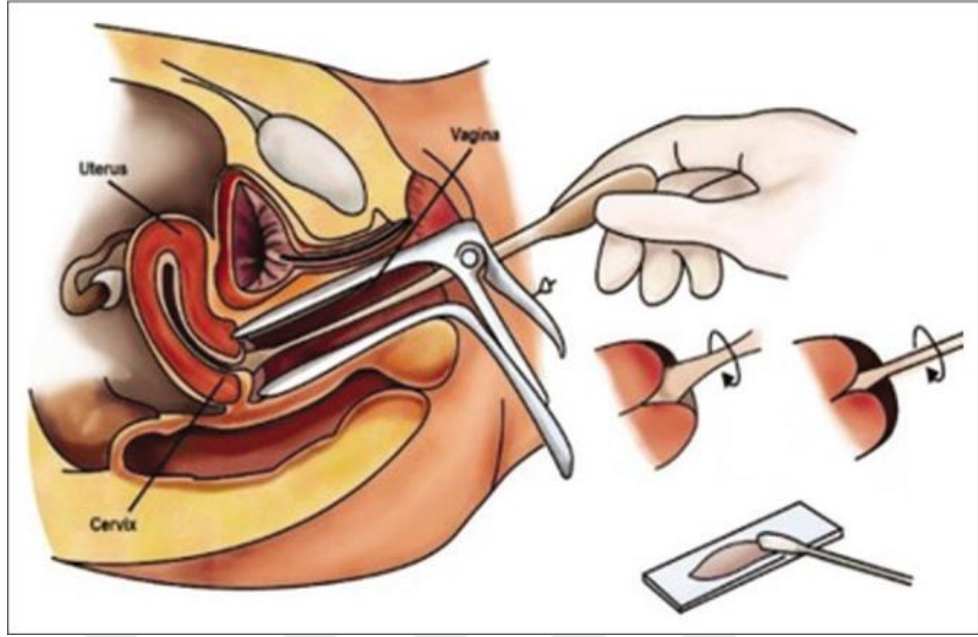
Sitoloji değerlendirmesi skuamokolumnar bileşkedeki servikal hücrelerin değerlendirilmesi ile yapılmaktadır. Servikal hücrelerin elde edilmesi iki yöntemle yapılabilmektedir. Konvansiyonel yöntemde hasta litotomi pozisyonunda iken spekulum yardımı ile servikal inspeksiyon yapılır. Servikal fırça ile skuamo-kolumnar bileşkeden hücreler elde edilir. Servikal fırça yumuşak plastik filamentlerden oluşan süpürge benzeri bir cihazdır. Süpürgenin merkezi kılları endoservikal kanala sokulurken, yan kıllar ektoservikse doğru bükülür. Elde edilen hücreler lama sürülerek fikse edildikten sonra boyanır ve incelenir.

Diğer yöntem olarak sıvı temelli sitolojik değerlendirme ise Thinprep Pap test ve Surepath Pap test gibi özel kitler yardımı ile yapılabilir. Sitobrush, endoservikal kanaldan hücre numunesi almak için kullanılan narin kıllarla kaplı dar bir ucu olan ve endoservikal kanala yerleştirilmesi kolay bir fırçadır. Servikal hücreler sitobrush yardımı ile elde edilip sitolojik numuneler için koruyucu metanol bazlı bir taşıma kiti içerisinde saklanır. Bu yöntem ile elde edilen numunelerden HPV tiplendirmesinde yapılabilmektedir (20).



Şekil 2.6 Servikal fırçalar ve sıvı temelli sitolojik değerlendirme kiti

İdeal bir smear testi için hasta mens sonrası dönemde veya en iyisi mensin 14. ve 28. günleri arasında (mens öncesi dönem) olmalı, numune aktif vaginal kanaması varken alınmamalıdır ve mensin özellikle ilk 3-4 gününden kaçınmak gereklidir. Son 24 saat içerisinde vaginal muayene yapılmamış olmalı, sperm gibi semen materyali ile kontaminasyon nedeniyle önceki iki gün cinsel ilişkiden kaçınılmalı ve herhangi bir antiseptik solüsyonla duş alınmamış olmalı, devam eden bir tedavinin parçası olarak vaginal uygulanan ilaç kullanılmamalı, son altı hafta içinde servikal biyopsi veya kriyoterapi veya başka bir servikal işlem yapılmamış olmalıdır.



Şekil 2.7 Pap Smear Tekniği

Smear numunesi alınırken hasta litotomi pozisyonunda, ideal olarak pelvik muayene masasında iken steril bir spekulum vajinaya yerleştirilir ve spekulumun hafif manevrasıyla serviks ortaya çıkarılır. Servikal fırçanın ucu endoservikal kanala yerleştirilip nazikçe fakat sıkı bir şekilde sabitlendikten sonra saat yönünde 2-3 kez 360° döndürülür. Fırçasının işlem sırasında ters yönde döndürülmesi kesinlikle önerilmemektedir çünkü önceki rotasyonlarda toplanan hücrelerin geride kalmasına neden olabilir. Toplanan hücreler cam lamın kenarlarını boş bırakacak şekilde merkezi 2/3 alanında doğrusal bir şekilde yayılır. Eğer sıvı bazlı sitolojik inceleme yöntemi kullanılacaksa sitobrush fırçası numune alındıktan sonra kırılır veya çubuktan çıkarılır ve fırçanın ucu fiksatif içeren kendi şişesine yerleştirilir (20).

Önemli olan noktalardan biri ise konvansiyonel smear derhal alkolde fikse edilir. Fiksasyondaki gecikme havayla kuruma artefaktlarına neden olabilir ve morfolojik ayrıntılarda bulanıklık oluşur. Alınan pap smear testinin sonuç raporunda ise numune türü, yeterlilik, genel kategori ve yorumlama olmak üzere dört bileşen vardır (21).

Tablo 2.1: Bethesda sistemi sitoloji sonuç raporu bileşenleri

Numune türü	<ul style="list-style-type: none"> • Konvansiyonel smear • Sıvı bazlı preparat • Diğer
Numune yeterliliği	<ul style="list-style-type: none"> • Değerlendirme için tatmin edici (endoservikal/transformasyon bölgesi bileşenlerinin varlığı/yokluğu ve diğer kalite göstergeleri tanımlanır.) • Değerlendirme için yetersiz • Reddedilen/işlenmeyen örnekler • Örnekler işlendi ve incelendi, ancak bir nedene bağlı olarak epitelial anormalliğin değerlendirilmesi için yetersiz.
Genel sınıflandırma	<ul style="list-style-type: none"> • İntraepitelial lezyon veya malignite açısından negatif (NILM) • Epitel hücre anormalliği • Diğer
Yorum/sonuç	<ul style="list-style-type: none"> • İntraepitelial lezyon veya malignite açısından negatif • Neoplastik olmayan bulgular (Skvamöz metaplazi, Keratotik değişiklikler, Tubal metaplazi, Atrofi, Gebelikle ilişkili değişiklikler, Onarım dahil iltihaplanma, Lenfositik servisit • Organizmalar (<i>Trichomonas vaginalis</i>, Morfolojik Olarak <i>Candida</i> ile uyumlu fungal organizma, Bakteriyel vajinozu düşündüren mikrobiyota değişikliği, Bakteriler morfolojik olarak <i>Actinomyces spp.</i> ile uyumlu, Herpes simpleks virüsüyle uyumlu hücresel değişiklikler, Sitomegalovirüsle uyumlu hücresel değişiklikler) • Diğer

Servikal sitolojinin epitelyal patolojileri temel olarak skuamokolumnar bileşkede bulunan iki hücre tipinden kaynaklanır: epitelyal ve glandüler. Epitel hücre patolojisi artan bir şekilde derecelendirilir.

Tablo 2.2 Smear Testinde Epitel Hücre Anormallikleri

Skuamöz hücre	
	<p>Atipik skuamöz hücreler (ASC)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Atipik skuamöz hücreler önemi bilinmeyenler (ASC-US) • Yüksek dereceli lezyonların dışlanamadığı atipik skuamöz hücreler (ASC-H)
	LSIL (hafif displazi, CIN 1'i kapsar)
	HSIL (orta ve şiddetli displaziyi kapsar, CIN 2 ve CIN 3)
	Skuamöz hücre karsinoması
Glandüler hücre	
	<p>Atipik glandüler hücreler (AGC)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Endoservikal hücreler • Endometriyal hücreler • Sınıflandırılmayan atipik glandüler hücreler
	Adenokarsinoma in situ (AIS)
	Adenokarsinom

Kadınların küçük bir azınlığında ise immatür skuamöz metaplazi, bazı HPV tipleri ile enfeksiyon sonucu displastik bir epitele (prekanseroz hücrel değişiklikler gösteren epitel) dönüşebilir.

2.3. Servikal Sitoloji Sonuçları ve Yorumlanması

Alınan servikal numunelerin yorumlanmasında standart terminolojinin kullanılması için 2002 yılında Bethesda sistemi geliştirilmiştir. Mart 2012'de Amerikan Patologlar Koleji ile Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patoloji Derneği, 35 paydaş kuruluşun iş birliğiyle Alt Anogenital Skuamöz Terminoloji Projesi (LAST) adı verilen bir konsensüs konferansı düzenledi ve servikal histopatolojiye ilişkin revize edilmiş terminoloji geliştirilmiş oldu. Sitolojik değişiklikler için SIL (Skuamöz intraepitelyal lezyon), histolojik değişiklikler için ise CIN (Servikal intraepitelyal neoplazi) terimleri kullanılmaya başlanmıştır (22).

Anormal pap smear testlerinde tanımlanan morfolojik değişiklikler arasında multinükleasyon, hiperkromazi ve perinükleer sitoplazmik vakuolizasyon yer alır. Anormal hücrelerin çekirdekleri normal hücre çekirdeğinin yaklaşık üç katına kadar büyüyebilir. Diğer nükleik özellikler arasında daha yüksek düzeyde keratinizasyon bulunur ancak nükleol yokluğu mevcuttur. Skuamöz hücrelerin geçirdiği bu değişiklikler koilositoz olarak sınıflandırılır.

Bethesda sistemine göre potansiyel olarak premalign lezyonlar üç kategoriye ayrılır:

- 1) Atipik skuamöz hücreler (ASC)
- 2) Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (LSIL)
- 3) Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (HSIL)

Atipik skuamöz hücreler önemi bilinmeyenler (ASC-US) ve yüksek dereceli lezyonların dışlanamadığı atipik skuamöz hücreler (ASC-H) olmak üzere iki kategoriye ayrılır.

Önemi Belirlenmemiş Atipik Skuamöz Hücreler (ASC-US): Bu en yaygın anormal pap smear tanısıdır. Bu tanı genellikle HPV enfeksiyonu ile ilişkilidir. Bu teşhis, hücrelerdeki kanser öncesi değişiklikleri yansıtabilir ancak aynı zamanda inflamasyondan veya travmaya yanıt olarak da kaynaklanabilir.

Yüksek Dereceli Lezyonların Dışlanamadığı Atipik Skuamöz Hücreler (ASC-H): Bu tanı son derece nadirdir ve gerçekten yüksek dereceli intraepitelyal lezyonların olmadığını gösterebilmek için kolposkopi gerektirir.

Düşük dereceli Skuamöz İntraepitelyal Lezyonlar (LSIL): Bu tanım skuamöz hücreli karsinoma ilerleme potansiyeli olan skuamöz hücrelerdeki değişiklik spektrumunu kapsar. Bu bulgu yüksek oranda HPV enfeksiyonuna işaret etmektedir. Bu isimlendirme servikal intraepitelyal neoplaziyi (CIN) 1 ve hafif displaziyi içerir. Bu bulgu tüm pap smear testlerinin %2'sinde mevcutken, LSIL'in 2 yılda gerileme oranı %85'in üzerindedir (23).

Yüksek Dereceli Skuamöz İntraepitelyal Lezyonlar (HSIL): Bu tanım serviks kanserine ilerleme riski yüksek olan skuamöz hücrelerdeki anormalliklere verilen genel bir başlıktır. Bu bulgu yüksek oranda HPV enfeksiyonuna işaret etmektedir. HSIL kategorisi CIN 2 ve CIN 3'ü (orta dereceli displazi, şiddetli displazi ve karsinoma in situ) içerir. CIN 2 epitelin alt 2/3'ünde sınırlı olan orta derecede atipik hücre değişikliğini ifade eden yüksek dereceli bir lezyondur. CIN 3 epitelin 2/3'ünden fazlasında görülen ciddi atipik hücre değişikliğini ifade eder ve tam kat tutulum mevcuttur (23).

Skuamöz hücreli karsinom: Bu nadiren pap smear ile teşhis edilir. Bu durum yalnızca serviks kanserinin önemli ölçüde ilerlemesiyle ortaya çıkar.

Atipik Glandüler Hücreler (AGC): Bu hücre tipi endoserviksten ve endometriyumdan kaynaklanabilmekte olup tüm pap smear testlerinin %0,3'ünde teşhis edilir. AGC, geçici inflamatuvar değişikliklerin ötesine geçmiş ancak adenokarsinom tanısı alacak kadar displazik olmayan hücreleri tanımlar. AGC tanılarının %31'inde patolojiye eşlik eden skuamöz anormallikler bulunabilir ve 35 yaşın altındaki hastalarda ortaya çıkma olasılığı daha yüksektir. AGC tanısı kadın genital sistemi boyunca kanser görülme riskini artırır.

- Endoservikal hücrelerden kaynaklanan atipik glandüler hücreler (AGC-EC): Bu tanının endometrial kanserle ilişkili olma olasılığı en düşüktür.
- Endometrial hücrelerden kaynaklanan atipik glandüler hücreler (AGC-EM): Bu tanının büyük olasılıkla endometriyal kanserle ilişkili olduğu düşünülmektedir.
- Sınıflandırılmayan atipik glandüler hücreler (AGC-NOS)

Adenokarsinoma in Situ (AIS): Bu tanı son yıllarda daha sık hale gelmiştir. Prevalans 100.000'de 11,2'dir ve büyük ihtimalle 30 ila 40 yaş arasındaki hastalarda teşhis edilir. AIS genellikle skuamöz lezyonla ilişkilidir. Diğer anormal pap smear bulguları gibi HPV'nin yüksek riskli serotipleri de bir risk faktörüdür.

Adenokarsinom: Bu tanı geçiş bölgesinde bulunabilen ancak servikal kanalda ortaya çıkması daha yaygın olan AIS'nin invaziv versiyonudur. Bu durum aynı zamanda endometriyumun glandüler hücrelerinden de kaynaklanır. LSIL bulgularının dörtte birinden azı HSIL'e ilerleyecektir (23).

Anormal pap smear testleri herhangi bir semptom olmadan ortaya çıkabilmektedir ya da hastaların ara kanama, menstrüel döngüde değişiklik, anormal vajinal akıntı, disparoni gibi şikayetleri bulunabilir. Anormal pap smear testinin en yaygın nedeni HPV enfeksiyonlarından kaynaklanmaktadır.

2.4 Human Papilloma Virüs (HPV) Tanımı ve Tiplendirmesi

Human papilloma virüs, *Papillomaviridae* ailesine ait çift sarmallı, dairesel, 8000 baz çifti içeren, zarfsız bir DNA virüsü olup bugün için yüzden fazla tipi tanımlanmıştır. HPV enfeksiyonları esas olarak cinsel yolla bulaşır ve prevalansı 25 yaşın altındaki kadınlarda %17 olarak görülür (24). Partner sayısı, ilk ilişki yaşı ve partnerin HPV pozitif olması önemli risk faktörleridir.

HPV tipleri tutulum bölgelerine göre kutanöz tip ve mukozal tip olarak ikiye ayrılırlar. Onkojenik özelliklerine göre ise düşük, orta ve yüksek riskli olarak gruplandırılmaktadırlar (25). Günümüzde HPV'nin ağız, farinks, akciğer ve anogenital kanserlerin bir nedeni olduğu düşünülmektedir. Alt tiplerden 6 ve 11 düşük risklidir ve genellikle siğil ve düşük dereceli kanser öncesi lezyonların oluşumuyla ilişkilidir. HPV alt tiplerinden 16 ve 18 yüksek risklidir ve maligniteye ilerleyen yüksek dereceli intraepitelyal lezyonlardan sorumludur.

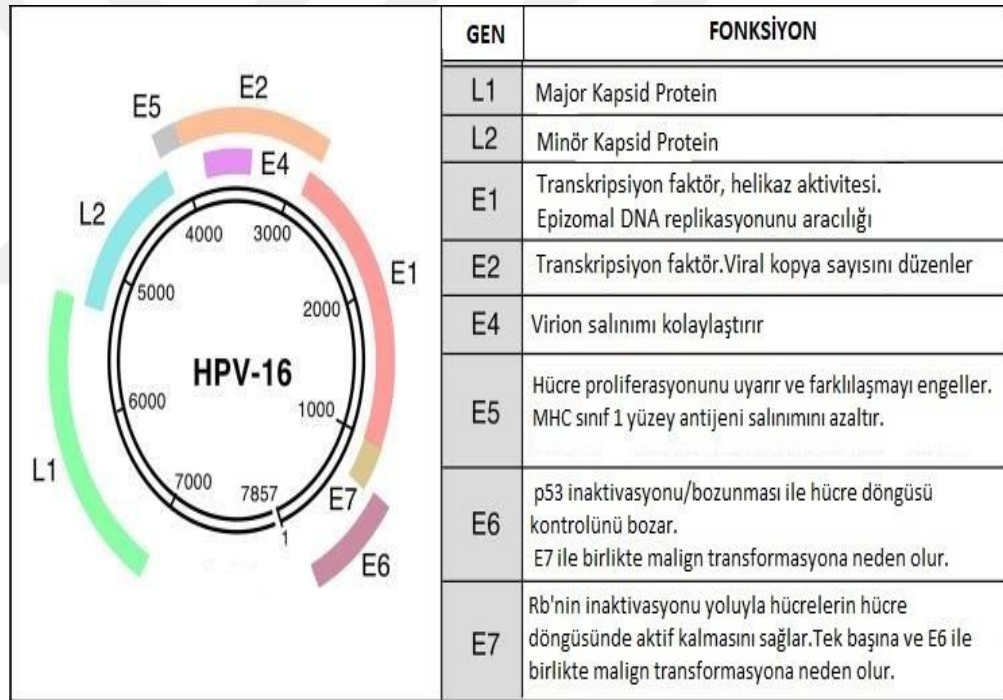
Tablo 3.3 HPV tiplerinin risk gruplarına göre dağılımı

	HPV tipleri
Düşük Riskli	6, 11 , 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81
Orta Riskli	26, 34, 53, 57, 66, 83
Yüksek Riskli	16, 18 , 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82

Epitelin hasarlanmış bölgesinden girerek bazal tabakadaki hücrelerde enfeksiyon oluştururlar ancak enfeksiyonda immün cevap oranları azdır ve enfeksiyonunun semptomu neredeyse hiç yoktur. Enfeksiyonların bir kısmı klirens uğrarken, diğer bir kısmı persiste ederek genital siğillere veya servikal prekanseröz lezyonlara neden olabilir ve bu da vulva, vajina, penis ve anüs dahil olmak üzere çeşitli bölgelerde kanser gelişme riskini artırır. Yine bu lezyonların bir kısmı regrese olurken, bazı hastalarda preinvaziv ve invaziv sürece progresyon görülür. Tüm dünyadaki servikal kanserlerin %70'inden tip 16 ve 18'in sorumlu olduğu düşünülmektedir.

HPV genomunda viral çoğalma için gerekli yedi erken faz (*E*) ve iki geç faz (*L*) geni bulunur. Viral DNA, konağın genomuna entegre olmadan önce bir süre bağımsız bir epizom olarak konak hücrede kalabilir.

E1, viral genomun devamı ve replikasyonunu, E2 transkripsiyonu düzenleyen proteinleri, E5 epidermal büyüme faktörünü uyararak hücre büyümesini artırırken p21 tümör süpresör genini baskılayarak hücrenin kontrol sistemini bozar. E6 ve E7 majör onkojenik genlerdir ve E6 p53'ü inaktive ederken, E7 ise aktif retinoblastoma genini inaktive eder. Ayrıca hücre siklusunu düzenleyen diğer birçok faktörle de integrasyona girerek tümöral büyümeyi sağlarlar. L1 ve L2 viral kapsid proteinlerini kodlar (25).



Şekil 2.8 HPV-16 Genomunun ~8000 Bp'lik Haritası ve Genlerin Temel İşlevleri (26)

Enfeksiyonun başlangıcında bulaşıcı virionların ektoserviks gibi çok katmanlı tabakalı epitelde bazal laminaya erişmesine izin veren bir mikrotravmanın varlığının gerektiği düşünülmektedir. Enfekte olmuş bazal hücreler enfeksiyonun rezervuarını oluşturur ve bu hücrelerde viral genom, düşük kopya numaralı bir epizom olarak

korunur. Bu hücreler bölündükçe epitel yüzeyine doğru, üst katmanlara doğru itilen hücreler üretirler. Bu geçiş sırasında virüsün yaşam döngüsündeki farklı olaylar farklı aşamalarda tetiklenir. Yüksek riskli HPV tiplerinin neden olduğu lezyonlarda alt katmanlardaki hücreler E6 ve E7'yi eksprese eder ve hücre döngüsü bölünmek üzere uyarılır. Orta katmanlarda, genom amplifikasyonu için gerekli proteinler bu hücrelerde yükselerek genom amplifikasyonunun gerçekleşmesine olanak tanır. Bu hücreler viral E4 proteinini eksprese eder ve tipik olarak hücre döngüsünün S veya G2 fazlarındadır. Üst epitel katmanlarında hücreler hücre döngüsünü terk eder ve E4-pozitif hücrelerin bir alt kümesinde, güçlendirilmiş viral genomların paketlenmesine olanak tanıyan viral L1 ve L2 proteinleri üretilir. Servikal transformasyon zonunda ve endoservikste HPV'nin aynı zamanda kolumnar epitel hücrelerini, epitel rezerv hücrelerini ve skuamo-kolumnar bileşkedeki hücreleri de enfekte edebileceği düşünülmektedir. Bu hücre tiplerinin enfeksiyonu, farklı hastalık ilerleme modelleri ve adenokarsinom gelişimi ile ilişkili olabilir (27).

Enfekte hücreler yüzey epiteline ulaşana kadar hücre yüzeyinde değişiklik olmaz ve de böylece immün sistemden korunurlar. Ayrıca E6 ve E7 proteinleri birçok faktörle etkileşerek immün yanıtın oluşmasını önlerler. Yüksek riskli tiplere karşı antikor cevabı geç gelişirken (1 yıl kadar sonra), düşük riskli tiplere karşı hemen oluşmaktadır. Kandaki antikor titreleri ise 10-15 yıl boyunca aynı seviyede bulunmaktadır. Deneysel enfeksiyon modeli oluşturulduğunda önce IgM ve IgA oluşur, sonra hızla IgM kaybolur ve IgA titreleri azalır, bu sırada IgG saptanmaya başlanır. Servikal mukusta IgA ve IgG tespit edilmiştir. IgG hayat boyu seksüel partner sayısı ile korelasyon gösterirken HPV DNA'sı yakın zamandaki partnerlerle ilişkilidir. Antikor üretimi enfeksiyonun yayılımını ve tekrarlamasını önlemede önemlidir. Viral klirensi ise hücresel immünite sağlar (25).

İnsan papillomavirüslerinin bağışıklık sisteminden kaçmak için birkaç mekanizması vardır: interferon ekspresyonunu azaltır ve interlökin (IL)-10'u ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β 1'in düzeylerini arttırarak lokal bir bağışıklık baskılayıcı ortama yol açar; enfekte hücrelerde yüzey antijenlerinin değişikliği ile birlikte bu ortam, antitümör immün yanıtı bloke eden immünoşüpresif bir ortam oluşturur. Servikste yüksek riskli HPV enfeksiyonu olan ve SIL'li hastalarda, IL-10 ve

TGF- β 1'in varlığı lezyonda immünsüpresif bir mikroçevreyi teşvik eden koşullar yaratabilir ve bu da hücreyel immün yanıtı olumsuz yönde etkileyebilir. Oluşan bu ortam, virüslerin kalıcılığına neden olabilir ve serviks kanserine yol açabilir. Özetle yapılan çalışmalarda HPV enfeksiyonunun, konakçının immün yanıtını ortaya çıkarmaktan kaçınmak için immünosüpresif sitokin transkripsiyonunu başlattığı gösterilmiştir (28).

HPV geleneksel hücre kültürlerinde yetiştirilemez. HPV enfeksiyonunun sonucunda virüsün ana kapsid proteinine karşı humoral bir bağışıklık tepkisi gelişmesine karşılık oluşan antikorlar uzun yıllar boyunca tespit edilebilir durumda kaldığından, serolojik testler o andaki mevcut veya geçmişteki enfeksiyonları ayırt etmek için uygun değildir. Sonuç olarak, HPV enfeksiyonunun doğru tanısı viral nükleik asidin yani HPV DNA'nın saptanmasına bağlıdır (28).

Diğer birçok virüsün aksine HPV'ler, antijenik yapılarından çok DNA yapısına göre sınıflandırıldığından serotipler yerine genotipler olarak ve keşfedildikleri sıraya göre numaralandırılmaktadır. HPV'lerin sınıflandırılmasında tür orijini ve DNA hibridizasyonu ile tespit edilen viral genomlar arasındaki homolojinin derecesi önemlidir. Papilloma virüslerin tiplerinin, alt tiplerinin ve varyantlarının taksonomik sınıflandırılmasında ise major viral protein L1 gen bölgesinin homolojisi göz önünde bulundurulmuştur. Birbirinden en uzak tipler de dahi %40 benzerlik görülmektedir (29).

Bir HPV izolatu, L1 gen dizisinin daha önce bilinen herhangi bir HPV genotipinden %10'dan fazla farklılık göstermesi durumunda yeni bir genotip olarak tanımlanır. Bir genotip içerisinde, %2 ila %10 arasındaki homolojik farklar bir alt tipi, %2'den az homoloji ise bir varyantı tanımlar. İntragenomik ve intergenomik rekombinasyonlar nadir olduğundan genotipler, viral genomun yalnızca bir kısmının analizi ile güvenilir bir şekilde sınıflandırılabilir (30). Günümüzde toplum bazlı taramalarda HPV-DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) testi kullanılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu nükleik asitlerin in-vitro koşullarda replikasyonu için geliştirilmiş çok yaygın olarak kullanılan bir test sistemidir. Hedef DNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna izin verir. PCR amplifikasyonu sonunda hedef DNA

logaritmik olarak artar ve 30 döngü sonrasında 1 milyondan fazla hedef DNA oluşturulur.

2.5 HPV Enfeksiyonun Doğal Seyri

İnsan papilloma virüsü genital sisteminin en yaygın viral enfeksiyonudur ve dünya çapında cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların en yaygın nedenlerinden biridir. Her ne kadar en sık cinsel yolla bulaşsa da HPV bulaşması penetratif cinsel ilişki gerektirmez. Ciltten cilde genital temas bir bulaşma şeklidir. Cinsel açıdan aktif kadın ve erkeklerin %70'inden fazlası hayatlarının bir noktasında enfekte olacaktır ve hatta bazıları birden fazla kez enfekte olabilir. HPV enfeksiyonuna yakalanmanın en yoğun olduğu dönem cinsel olarak aktif hale geldikten kısa bir süre sonradır (31).

HPV, mukokutanöz membranın bazal epitel hücrelerini enfekte edebilir ve düşük riskli lezyonlardan kansere kadar çeşitli klinik durumlarla ilişkilidir. Bu enfeksiyonların çoğu iyi huyludur ve onkojenik değildir; ellerde, ayaklarda ve anogenital bölgelerde kutanöz siğiller gibi lezyonlara neden olur. Siğiller, keratinle dolu hipertrofik cilt bölgeleridir ve esas olarak kozmetik bir rahatsızlıktır; genellikle 1 ila 5 yıl içerisinde kendiliğinden düzelirler. HPV türlerinin neden olduğu enfeksiyonların yalnızca küçük bir kısmı kalıcı olabilir ve orofaringeal, serviks, vulvar, vajinal ve penis kanseri gibi kansere ilerleyebilir (31).

Enfeksiyon en çok 18 ila 30 yaş arasındaki cinsel açıdan aktif genç kadınlar arasında görülür ve 30 yaşından sonra görülme sıklığı keskin bir düşüş gösterir. Serviks kanserinin 35 yaş ve üzeri yaşlı kadınlarda daha yaygın olmasına rağmen, bu durum enfeksiyonun daha genç yaşta ortaya çıktığını ve ileri yaşlarda kansere yavaş bir ilerleme gösterdiğini düşündürmektedir. HPV enfeksiyonunun kalıcılığı, yüksek riskli veya onkogenik tiplerde daha yaygındır ve bu, invaziv serviks kanserinin gelişiminde önemli bir rol oynar. Serviks kanseri, sürekli metaplastik değişikliklerin meydana geldiği, ektoserviksın skuamöz epiteli ile endoserviksın kolumnar epiteli arasındaki bölge olan transformasyon bölgesinde ortaya çıkar. Metaplastik aktivitenin en yüksek olduğu dönem, HPV enfeksiyonu riskinin en yüksek olduğu dönemle örtüşmektedir ve bu puberte döneminde ve gebelikte meydana gelir (31).

HPV bulaşması esas olarak cinsel temas yoluyla gerçekleşir ve neoplastik dönüşümü başlatma potansiyeli olan enfeksiyona en duyarlı organlar serviks transformasyon bölgesidir. Prognozu belirleyen faktörler ise viral tip, tekrarlanan incelemelerde enfeksiyonun kalıcılığı ve hücre başına viral yük ve ayrıca viral DNA'nın hücresel DNA'ya entegrasyonudur. HIV enfeksiyonu, özellikle immün baskılanma dönemlerinde, neoplastik ilerlemenin yanı sıra enfeksiyon için de bir risk faktörü oluşturur. Ek belirlenmiş ilerleme faktörleri arasında uzun süreli oral kontraseptif kullanımı, yüksek doğum sayısı ve tütün içimi yer almaktadır. Olası faktörler arasında beslenme, özellikle meyve ve sebzelerden fakir beslenme ve *Chlamydia trachomatis* ve *Herpes Simplex Virus* tip 2 gibi cinsel yolla bulaşan diğer ajanların neden olduğu ko-enfeksiyon yer alır (32).

HPV enfeksiyonun latent, subklinik ve klinik olmak üzere 3 evresi bulunmaktadır. Latent evre; hastalığa ait bulgunun olmadığı yalnızca tarama programlarında HPV pozitifliğinin saptandığı evreyi temsil etmektedir. Subklinik evre; HPV virüsüne bağlı olarak ortaya çıkan servikal intraepitelyal neoplazilerin (CIN) tespit edildiği evredir. Klinik evre ise genital bölgede HPV'ye bağlı oluşan siğil veya invaziv kanser gibi makroskopik olarak tespit edilebilen lezyonların olduğu evredir.

HPV enfeksiyonları öncelikle asemptomatik ilerlemekte olup bazense değişik klinik tablolar ile ortaya çıkabilir. Değişken klinik tablo, virüs tipi (invaziv karsinomla yakın ilişkili HPV 16 ile HPV 18 gibi), lezyonun bulunduğu bölge (respiratuvar papillomatozis gibi), hastanın immünolojik durumu (immün yetmezlik durumunda daha ağır tablo) ve epitelin doğası (serviks transformasyon bölgesindeki metaplazik skuamöz epitel, HPV veya diğer kofaktörlerin onkojenik etkilerine daha yatkındır) bağlıdır. Genital bölgedeki siğiller birkaç ayda gözlemlenirken, serviks kanseri gelişimi yıllara yayılabilmektedir. HPV enfeksiyonlarının çoğu asemptomatik olup sadece HPV DNA testi ile tespit edilmektedir.

Virüs ilk olarak bazal laminaya yakın stratum germinativumdaki hücreleri enfekte eder, bu da en çok cinsel ilişkiye bağlı mikrotravmaların olduğu bölgede oluşur. Latent dönemde hastalığın sitolojik ya da morfolojik hiçbir bulgusu yoktur,

sadece PCR teknikleri ile HPV DNA'sı gösterilebilir. Subklinik dönemde HPV'ye bağlı sitolojik-mikroskopik değişiklikler veya kolposkopi gibi büyütme yöntemleri uygulanarak görülebilen lezyonlar söz konusudur. Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) ve intraepitelyal neoplaziler genelde bu döneme oluşur. Genital kondilom ya da invaziv kanser gibi gözle görülebilen lezyonların ve belirtilerin bulunduğu dönem ise klinik dönemi oluşturur. İmmünolojik kontrolün kaybıyla virüs genomu replike olur ve buna bağlı olarak da ortaya çıkan büyüme faktörlerinin etkisiyle epitel proliferasyonu, intermediyer hücre hiperplazisi ve hiperkromazi oluşmaktadır. Normalde CIN, subklinik bir enfeksiyon olup, kapiller ve stromal proliferasyon gözle görülebilecek bir kondilom yapacak düzeyde değildir. Ancak olguların %30'unda bu proliferasyon aşırı olup, servikte gözle görülebilir ekzofitik kondilom gelişebilir. Ayrıca epitel tabakası üst sıralarında HPV enfeksiyonunun karakteristik bulgusu olan "koilositoz" ortaya çıkmaktadır. Koilositler malign dönüşüm gösteremeyen, ölü ya da ölmekte olan stratum granulosum hücreleridir. Koilosit nükleusu düzensiz ve virüs partikülleri ile dolu olduğu için hiperkromatiktir. Sitoplazmada çekirdeğin hemen üzerinde vakuol bulundurmaktadır. Bu koilositler aslında daha çok düşük risk grubundaki HPV enfeksiyonlarının belirteci olarak görülmektedir (29).

Sitomorfolojik olarak normal olup yüksek riskli HPV saptanan hastaların %15-30'unda takibeden 4 yıl içerisinde CIN 2 veya 3 gelişmektedir. ASC-US veya hafif displazisi olan hastalarda yüksek riskli HPV negatif ise CIN 2 veya 3 gelişme riski düşüktür. Servikal kanser ile HSIL, CIN 2 ve 3 arasındaki HPV pozitifliği karşılaştırıldığında HPV tip 16, 18 ve 45'in kanserli olgularda daha fazla olduğu saptanmış olup özellikle invaziv süreçte bu 3 tipin çok önemli olduğu bilinmektedir. Longitudinal izlem çalışmaları etik olmadığından ve hastalık en geç CIN 3 düzeyinde tedavi edilmesi gerektiğinden bunlar serviks kanseri ile HPV enfeksiyonunun ilişkisini araştıran çalışmalar için sınırlandırıcı faktörlerdir.

2.6 Mikrobiyota ve Servikovajinal Mikrobiyotanın Özellikleri

Mikrobiyota "vücut alanını paylaşan kommensal, simbiyotik veya patojenik mikroorganizmalardan oluşturduğu ekolojik topluluk" olarak tanımlanmaktadır (33). Doğumdan hemen sonra cilt yüzeyi, ağız boşluğu ve bağırsaklar gibi vücudun tüm

anatomik bölgelerinde çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından kolonize edilir. Mikrobiyota kompozisyonun büyük bölümünü bakteriler oluşturmaktadır. Bununla birlikte mikrobiyota kompozisyonunda bakterilerin yanında virüsler, mantarlar ve arkealar da yer almaktadır. Mikrobiyotanın temel fonksiyonu sindirim sistemin sağlanması, immün sistemin oluşumu ve geliştirilmesi, patojenlerin dokulara ulaşmasının engellenmesi olup, bunun yanında santral sinir sistemi dahil olmak üzere tüm sistemlerin bağırsak mikrobiyotası ile iletişimi bulunmaktadır (34).

Vücutta tüm sistemler ve anatomik bölgelerinde yer alan mikrobiyota elemanları konakçıyla karşılıklı bir ilişki içindedir. Mikrobiyota kompozisyonu çevresel koşullara ve konakçı ile ilgili faktörlere bağlıdır ve bu nedenle anatomik bölgelerde de farklılıklar gösterir. Genitoüriner sistem mikrobiyota hem kadın sağlığı açısından hem de gebelik ve doğumda bebek açısından büyük önem taşımaktadır. Vajinal mikrobiyota kompozisyonu, bakteriyel vajinoz, mantar enfeksiyonları, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar ve idrar yolu enfeksiyonları gibi bir çok enfeksiyon hastalığının önlenmesinde koruyucu özelliklere sahiptir. Mikrobiyota kompozisyonun bu fonksiyonunda belirleyici bakteri laktobasillerdir. Laktobasillerin, laktik asit üretimi ile vajinal pH'ı düşürerek ve çeşitli bakteriyostatik/bakterisidal bileşikler üreterek vaginal enfeksiyonlar üzerinde önemli koruyucu rol oynadıkları düşünülmektedir. Kültürden bağımsız yeni nesil metagenomik analizlerin ve testlerin kullanılmaya başlanması ile, vajinal mikrobiyota kompozisyonun daha detaylı değerlendirilmesi mümkün olmuştur (35).

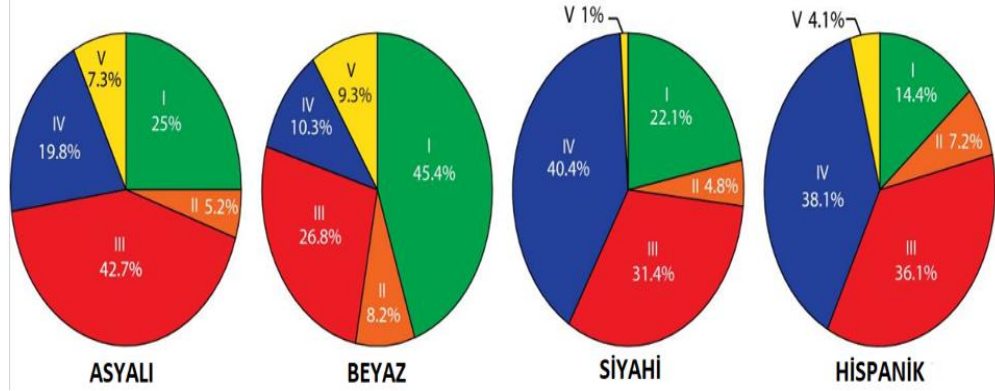
Vajinal mikrobiyotada baskın olarak bulunan laktobasiller ile konakçı arasındaki ilişki, fırsatçı patojenlerin kolonizasyonuna karşı ilk savunma hattını sağlar. Kadınların vajinal mikrobiyota kompozisyonu yaş ile değişikliğe uğrar. Ergenlik ve menopoz gibi dönemlerde belirgin değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Bu dönemlerde vajinal mikrobiyota konak üreme fizyolojisini etkileyebildiği gibi konak fizyolojisinden de etkilenebilir (36).

Üreme çağındaki kadınlarda vajinal mikrobiyota kompozisyonundaki bakteri türlerinin bileşimini ve bolluğunu inceleyen çalışmalarda *Community State Types* (CST) olarak adlandırılan en az beş farklı tür olduğunu göstermiştir. Bu CST'lerden

dördüne *Lactobacillus crispatus* (CST-I), *L. gasseri* (CST-II), *L. iners* (CST-III) veya *L. jensenii* (CST-V) hakim iken CST-IV için baskın mikroorganizma laktobasiller değildir. CST-IV tanımlaması bir miktar laktobasil içermesine rağmen bunlara eşlik eden artmış oranda *Gardnerella*, *Atopobium*, *Mobiluncus*, *Prevotella* cinslerinin türlerini ve *Clostridiales* takımındaki diğer taksonları içeren katı ve fakültatif anaerobların polimikrobiyal bir karışımından oluşur. CST'lerin sıklığı etnik gruplar arasında farklılıklar göstermektedir. Özellikle CST-IV siyahi ve İspanyol kökenli kadınlarda yaklaşık %40 daha yaygındır (35).

Dört etnik grubu (beyaz, siyah, Hispanik ve Asyalı) temsil eden 396 asemptomatik Kuzey Amerikalı kadının incelendiği bir çalışmada CST'ler beş gruba ayrıldı. Bu CST'lerden dört tanesi *Lactobacillus iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* veya *L. jensenii* tarafından domine edildi, beşinci grupta ise daha düşük oranlarda laktobasiller ve daha yüksek oranlarda zorunlu anaerobik organizmalar vardı. Laktik asit üretiminin tüm topluluklarda korunduğu görülmüştü. Her topluluk grubunun oranları dört etnik grup arasında değişiklik gösteriyordu ve bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıydı. Üstelik, farklı etnik gruplardaki kadınların vajinal pH'ı da farklıydı ve İspanyol (pH 5.0 ± 0.59) ve siyahi (pH 4.7 ± 1.04) kadınlarla, Asyalı (pH 4.4 ± 0.59) ve beyaz (pH 4.2 ± 0.3) kadınlar karşılaştırıldığında vajinal pH daha yüksekti. Farklı etnik gruplardaki kadınların kendi içindeki ve arasındaki doğal farklılıklar, normalde sağlıklı kadınlarda bulunan bakteri topluluklarının daha ayrıntılı bir şekilde tanımlanmasını ve bireyler arasındaki farklılıkların risk değerlendirmesinde ve hastalık teşhisinde dikkate alınabilmesi için tespit edilmesi ihtiyacını güçlü bir şekilde savunmaktadır. Çalışma kabaca eşit sayıda, kendilerini tanımlayan dört etnik gruptan (beyaz, Asyalı, siyahi ve Hispanik) oluşuyordu ve etnik köken ile vajinal bakteri topluluğu bileşimi arasındaki ilişkiyi değerlendirme fırsatı sundu. Etnik gruplar içinde veya arasında yaş ve topluluk türleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmedi. *Lactobacillus* türlerinin baskın olduğu vajinal bakteri toplulukları (grup I, II, III ve V) Asyalı ve beyaz kadınların sırasıyla %80.2 ve %89.7'sinde bulunurken, İspanyol ve siyahi kadınların sırasıyla yalnızca %59,6 ve %61,9'unda bulundu. Hispanik ve siyahi kadınlar, Asyalı ve beyaz kadınlarla karşılaştırıldığında hispanik ve siyahi kadınlarda daha yüksek ortalama vajinal pH değerleri, *Lactobacillus sp.*'nin

hakim olmadığı CST-IV topluluğunun bu kadınlarda daha yüksek yaygınlığını yansıtmaktadır. Bu önemlidir çünkü yüksek sayıda laktobasil oluşumu ve pH <4,5 "sağlıklı" ile eşanlamı hale gelmiştir (35).



2.9 CST'lerin Etnik Gruplara Göre Dağılımları (35)

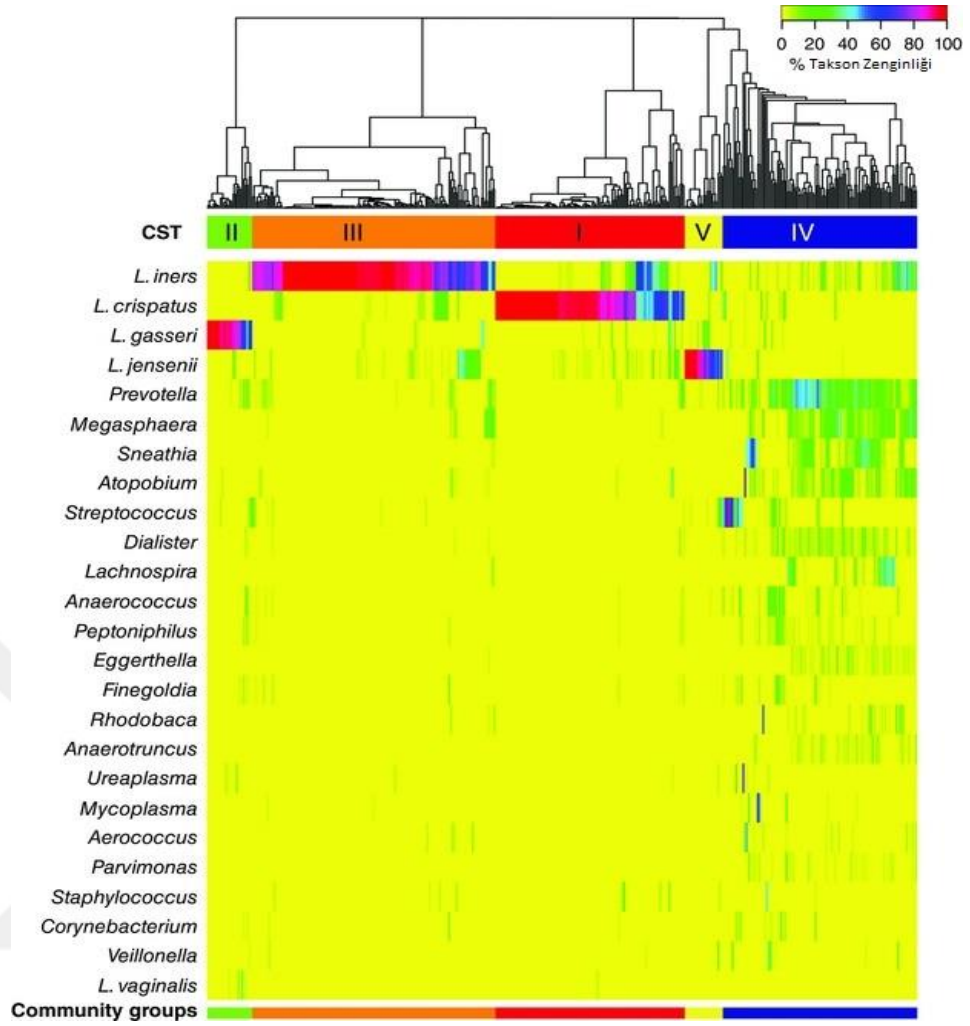
Büyük kohort çalışmalarından elde edilen kanıtlar, etnik köken/ırkın vajinal mikrobiyotayı etkilediğini göstermektedir. Servikovajinal mikrobiyota çalışmalarının çoğunluğu Batı popülasyonları ve ağırlıklı olarak Kafkasyalı (Beyaz) kadınları oluşturan Avrupa kökenli popülasyonlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar, üreme çağındaki Beyaz kadınların %70'inden fazlasının, *Lactobacillus* türlerinin, özellikle de *L. crispatus*'un baskın olduğu vajinal mikrobiyotaya sahip olduğunu bulmuştur. Buna karşılık, üreme çağındaki Afrikalı kadınların önemli bir kısmının (%23-63) *Lactobacillus* eksikliği olan ve esas olarak bakteriyel vajinozis (BV) ile ilişkili bakterilerden oluşan çeşitli ve heterojen popülasyonlarla karakterize edilen servikovajinal mikrobiyotayı barındırdığı rapor edilmiştir. Bu, bazı araştırmacıların Afrikalı kadınların vajinal polibakteriyel rahatsızlıklara ve cinsel yolla bulaşan enfeksiyonları içeren patojenlerin istilasına daha yatkın olmalarının nedeninin bu olabileceğini öne sürmelerine yol açmıştır (37).

Hastalık Kontrol Merkezleri aracılığıyla yürütülen Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Araştırması, Nugent'in puanlamasına göre 3739 kadının %29.2'sinin BV olduğunu ve bu durumun BV'yi en yaygın vajinal hastalık haline getirdiğini ortaya çıkardı. Bu çalışma, İspanyol olmayan Afrikalı Amerikalıların BV'ye sahip olma ihtimalinin, İspanyol olmayan beyazlara (yaygınlık %23.2) göre iki kat daha fazla

olduğunu (yaygınlık %51.4) göstermiştir. Daha da önemlisi BV, kadınların pelvik inflamatuvar hastalık, HIV ve diğer cinsel yolla bulaşan hastalıklara yakalanma ve bulaşma riskinde artış gibi ciddi sağlık sorunlarına ve intrauterin enfeksiyon, abortus, erken membran rüptürü ve erken doğum dahil olmak üzere olumsuz gebelik sonuçları için artan risk oluşturduğunu göstermiştir (38).

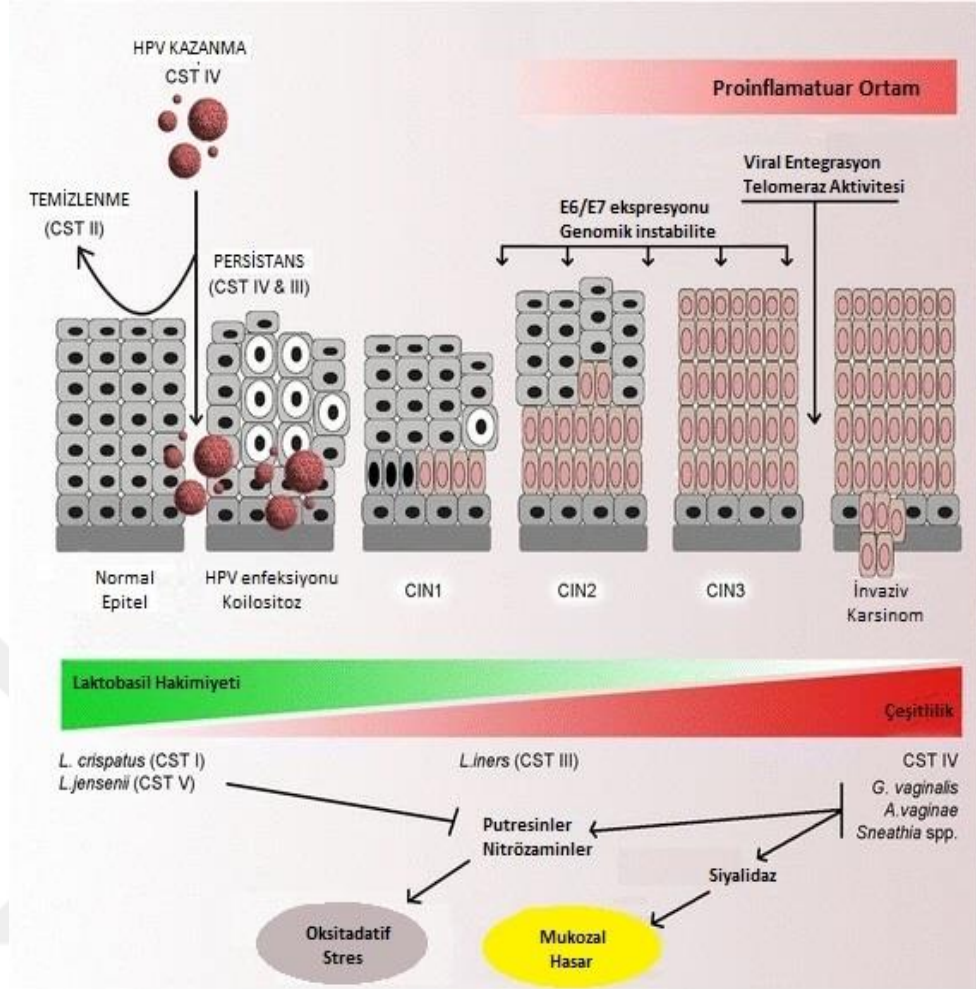
Vajinal mikrobiyom üzerine yapılan önceki çalışmalar, Afrika kökenli Amerikalı ve Avrupalı kökenli kadınlar arasında önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Morfolojik tipe göre mikrobiyal profilleri değerlendirmek için mikroskopi kullanan daha önceki çalışmalar, Afrika kökenli Amerikalı kadınların daha yüksek Nugent puanlarına sahip olduğunu ve laktobasiller tarafından kolonize edilme olasılıklarının Avrupa kökenli kadınlara göre daha düşük olduğunu buldu. Bu çalışmalar 16S rRNA gen profili oluşturma yoluyla genişletildi. Vajinal mikrobiyom profillerinin tipik olarak beş ana gruptan birine uyduğunu buldu. Bu gruplardan dördüne laktobasiller hakimdi: grup I, *Lactobacillus crispatus* ; grup II, *Lactobacillus gasseri*; grup III, *Lactobacillus iners*; grup V, *Lactobacillus jensenii*. Grup IV, zorunlu anaeroblardan oluşan heterojen bir gruptu. Grup I, Avrupalı kadınlar arasında en yaygın grup, grup IV ise Afrika kökenli Amerikalı kadınlarda en yaygın grup olarak bulunmuştu(39).

Laktobasillerin baskın olduğu vajinal mikrobiyal topluluklar, bol miktarda laktik asit üretimi ve dolayısıyla düşük pH (< 4.5) ile karakterizedir ve fizyolojik olarak sağlıklı bireyleri işaret etmektedir (40).



Şekil 2.10 Vajinal mikrobiyota CST haritası (41) (CST: community state type)

Vajinal mikrobiyota kompozisyonundaki CST'lerin zamansal dinamikleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Menstrüal dönem, cinsel davranışlar, vaginal kayganlaştırıcılar ve kişisel hijyen uygulamaları gibi faktörlere karşı değişim gösterip göstermedikleri hakkında bilgiler kısıtlıdır (42). Ayrıca vajinal mikrobiyota kompozisyonu dinamiktir ve CST'ler arasında geçiş meydana gelebilir. Vajinada gözlemlenen en yaygın geçiş CST III'ten CST IV'e geçiştir, bu da *L. iners*'in zorunlu anaerobların ve patolojik mikroorganizmaların kolonizasyonunu diğer *Lactobacillus spp.*'ye kıyasla daha az inhibe edebildiğini düşündürmektedir (43).



Şekil 2.11 Servikovajinal mikrobiyotanın HPV enfeksiyonu ile potansiyel ilişkisi

CST-IV ile insan immün yetmezlik virüsü (HIV) de dahil olmak üzere cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlara yönelik artan risk arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, bazı kadınlarda CST-IV normal (asemptomatik) olsa da, potansiyel riskler açısından izlenmesi önerilmektedir (44). CST-IV aynı zamanda laktobasil sayısının azaldığı ve buna eşlik eden polimikrobiyal vaginal bir ortamın oluşarak anaerob ve zorunlu anaerobların varlığına eşlik eden akıntı, koku ve tahriş gibi çeşitli klinik semptomlarla tanımlanan bakteriyel vajinozis (BV) ile benzerlik göstermektedir (41). BV, CST IV ile tutarlı bir mikrobiyal topluluk yapısı ile karakterize edilen polimikrobiyal bir hastalıktır; yani *Lactobacillus spp.* seviyelerinin azalmasıyla ve anaerobların, özellikle de *Gardnerella*, *Prevotella* ve *Peptostreptococcus* türlerinin aşırı çoğalmasıyla ilişkilidir (45). BV daha önce HPV

enfeksiyonunun daha yüksek insidansı, prevalansı ve kalıcılığı ve CIN gelişimi ile ilişkilendirilmiştir ancak bu durum net olarak açıklanamamıştır (46,47).

Mikrobiyal çeşitlilik vücudun birçok bölgesinde sağlığın bir işareti olarak kabul edilirken, yüksek düzeyde çeşitlilik gösteren vajinal mikrobiyota sıklıkla atipik veya bir disbiyoz durumu olarak kabul edilir ve hastalık durumlarıyla ilişkilendirilir. Vajinal mikrobiyotada *Lactobacillus spp.*'lerinin düşük pH ve bakteriyosin üretiminin korunması yoluyla bakteriyel vajinozla ilişkili bakteri türlerinin kolonizasyonunu önlediği kabul edilir. Bu, HPV'nin bazal keratinositlere girişini engelleyen servikal epitelyal bariyer fonksiyonunun sürdürülmesi için önemlidir (48). BV ile ilişkili zorunlu anaeroblar kolonize olduklarında bu bariyeri zayıflatarak HPV'nin bazal hücrelere girişini kolaylaştırabilecek enzimler ve metabolitler üretirler. Buna bağlı olarak kalıcı bir HPV enfeksiyona ve ardından patolojik lezyonların gelişimi ve bunların ilerlemesine olanak tanıyan çeşitli hücresel yollar üzerinde de etki gösterirler (49). Laktik asit tarafından teşvik edilen düşük pH'lı bir ortamın genel olarak koruyucu olduğu düşünülse de HPV enfeksiyonu ve CIN gelişimi ayrıca laktik asit molekülünün kimyasal yapısından da etkilenebilir. Laktik asit, D ve L izomerine sahip bir bileşiktir; ilki ağırlıklı olarak *L. jensenii*, *L. crispatus* ve *L. gasseri* tarafından üretilir. Ancak laktik asidin L izomeri *L. iners* ve disbiyoz ile ilişkili çeşitli anaeroblar tarafından üretilir (50).

Laktobasil varlığının azalması, mikrobiyal çeşitliliğin artması ve atipik, anaerobik bakterilerin artan baskınlığı ile BV'nin bu farklı özellikleri, enfeksiyonlara karşı bağışıklık ve mukozal savunma tepkisinin genel olarak zayıflamasında ve müsin parçalayıcı enzimlerin salınması, bozulmuş vaginal pH, sitokin modülasyonu ve kronik inflamasyon dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla HPV gibi patojenlerin kalıcılığında veya temizlenmesinde rol oynar (51).

Vajinal mikrobiyota, HPV'nin neden olduğu enfeksiyonların kontrolünde önemli bir faktördür ve bileşimine bağlı olarak vajinal mukozadaki mikroortamı viral enfeksiyonlara karşı modüle edebilir. Etnik ve sosyodemografik faktörler, farklı kadın popülasyonlarında HPV enfeksiyonu ve rahim ağzı kanseri ile bağlantılı disbiyotik kalıpların temelini oluşturan vajinal mikrobiyom kompozisyonundaki farklılıkları

etkilemektedir. Bir çalışma kapsamında SIL geliştirmemiş ancak HPV pozitif olan 35 katılımcı incelenmiş ve HPV enfeksiyonu ile SIL yokluğu arasındaki ilişki karşılaştırılmış. Servikal intraepitelyal lezyonu olan HPV pozitif numuneler ile servikal intraepitelyal lezyonu olmayan numuneler arasında beta veya alfa çeşitliliği açısından hiçbir fark tespit edilmemiş. Tespit edilen vajinal mikrobiyota değişimlerinin öncelikle HPV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu ve bunun da çoğu durumda servikal intraepitelyal lezyonlara yol açtığı öne sürülmüştür. Servikal intraepitelyal lezyonların vajinal mikrobiyota üzerindeki etkisini daha fazla araştırmak için yüksek dereceli servikal intraepitelyal lezyonlu kadınlardan alınan örnekleri düşük dereceli servikal intraepitelyal lezyonlu kadınlardan alınan örneklerle karşılaştırmış ve sonuçta alfa veya beta çeşitliliğinde herhangi bir fark tespit edilmemiştir. Bu durum vajinal mikrobiyota üzerinde HPV enfeksiyonunun servikal intraepitelyal lezyonlara göre daha güçlü bir bağlantıya sahip olduğunu düşündürmüştür (52).

Serviks kanseri uzun bir sürece yayılan bir hastalıktır ve kanser öncesinde, lokal immünsüpresyon durumuna yol açan vajinal pH ve sitokin düzeni de dahil olmak üzere servikal ve vajinal ortam koşullarının değiştiği aşamalar vardır. Laktobasillerin varlığı, düşük vajinal pH (< 4.5) ve antimikrobiyal peptitler, vajinal mikroçevrede mevcut savunma mekanizmalarının bir parçasıdır. Vajinal savunma mekanizmasında bir dengesizlik meydana geldiğinde, fizyokimyasal değişiklikler ortaya çıkar ve vajinal mukoza ile servikal epitelde histolojik değişiklikler oluşur. Bunların tümü mikrobiyota üzerinde seçici bir baskı oluşturur. Serviks kanseri mikroortamında, immün baskılayıcı sitokinlerin (TGF- β 1, IL-10) varlığı, HPV enfeksiyonunun kalıcılığını kolaylaştırır. Kadın genital sistemi mikrobiyomu üzerine yapılan çalışmaların çoğu vajinal düzeyde gerçekleştirilmiştir ve az sayıda çalışma servikal mikrobiyota ve sitokin profillerini içermektedir. Spesifik servikovajinal mikrobiyota türlerinin, sağlıklı siyah Güney Afrikalı kadınların kadın genital kanalındaki inflamatuvar immün tepkisini modüle ettiği kanıtlandığı göz önüne alındığında, servikal mikrobiyomun, immünosüpresif sitokinlerin ekspresyonunu desteklemede rol oynaması mümkündür (53).

Servikovajinal mikrobiyom ile yüksek riskli insan papilloma virüsü (HR-HPV) arasındaki ilişki iyi gözlemlenmiştir. Ancak HR-HPV enfeksiyonunda servikal mikrobiyota ile ilgili yeterli araştırma bulunmamaktadır. HR-HPV enfeksiyonu olan 20 kadından ve kontrol grubu olarak enfekte olmayan 20 kadından alınan servikal sürüntü örnekleri analiz edilmiş. Sonuçlarda HR-HPV enfeksiyonunun servikal mikrobiyotasının bileşimi ve fonksiyonunun kontrol kadınlarından önemli ölçüde farklı olduğunu gösterilmiş. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, HR-HPV enfeksiyonu sırasında Firmicutes azalırken Actinobacteria artmış olarak bulunmuş ve cins düzeyinde *Lactobacillus* kontrol gruplarında zenginleşirken *Gardnerella* ve *Bifidobacterium* seviyeleri daha düşük bulunmuş. Tür düzeyinde *Lactobacillus crispatus*, *L. jensenii* ve *L. helveticus* kontrol kadınlarında zenginleşmiş iken bunlar iki grup arasında biyobelirteç önemine sahip ilk üç tür olarak ortaya çıkmış. Servikal mikrobiyotanın biyobelirteçleri ve değişen bakteriyel metabolik yollar ve metabolitler, HR-HPV enfeksiyonunun patojenik mekanizmasının açıklığa kavuşturulmasına yardımcı olabilir ve bu da onları HR-HPV enfeksiyonu ve servikal karsinom için klinik tedavi ve müdahale için umut verici hedefler haline getirir. Önceki çalışmaların çoğu vajinal mikrobiyotaya odaklanmıştı. Çalışmalar servikal mikrobiyom çeşitliliğinin vajinaya göre daha yüksek olduğunu ve HR-HPV enfeksiyonu olan hastalarda servikal mikrobiyomdaki değişikliklerin vajinadakilere göre daha belirgin olduğunu göstermektedir. (54)

Değişen vajinal mikrobiyotanın yerel bağışıklık fonksiyonunu nasıl etkilediğini gösteren iyi bir doğrudan veri yoktur. Bununla birlikte, vajinal mikrobiyomun stabilitesi ve bileşiminin, konakçının doğuştan gelen bağışıklık tepkisini ve enfeksiyona duyarlılığını belirlemede önemli bir rol oynamasının yanı sıra, servikal hastalığın gelişimi konusunda daha ileri düzeyde bir rol oynaması da akla yatkındır. Çeşitli çalışmalar, BV ve BV ile ilişkili bakterilerin , sitokinler/kemokinler, antimikrobiyal proteinler ve bağışıklık hücresi popülasyonları dahil olmak üzere vajina içindeki bağışıklık parametrelerini etkilediğini göstermiştir. Özellikle *L. crispatus*, *L. jensenii* ve *L. gasseri* gibi spesifik *Lactobacillus* türlerinin baskınlığı , servikovajinal ortamda nispeten inflamatuvar olmayan bir durumla ilişkilidir. Aksi durumdaki proinflamatuvar durumlar, muhtemelen HPV'nin onkogenik potansiyelini

artıran doku hasarına neden olur. DNA hasarına rağmen, E6 ve E7'nin ekspresyonu apoptozun inhibisyonu ile sonuçlanır ve hücrel proliferasyonu artırarak anöploidi ve kromatin anormalliklerini artırarak servikal displazi ve kanser gelişimine yol açar. Belirtildiği gibi *Lactobacillus* spp. birçoğu HPV ile ilgili olabilecek birçok koruyucu madde sağlar. *In vitro* çalışmalar *Lactobacillus* spp . servikal tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler gösterir. Serviks kanseri hücre hatları (Hela), *L. crispatus* ve *L. gasseri* ile tedavi edilmiş, kanser hücre hattında hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücre ölümünü önemli ölçüde daha yüksek derecede indüklediği gösterilmiştir. Bu, servikal hücreler ile mikrobiyota ve metabolitleri arasındaki olası etkileşimlerini gösterir (55).

Kore'de gerçekleştirilen ve 912 kadının katıldığı Kore Genom Epidemiyoloji Çalışması altında "Sağlıklı İkiz Çalışması" kapsamında toplanan serviko-vajinal örneklerden 23 HPV pozitif ve 45 HPV negatif olmak üzere toplam 68 kadın analiz edilmiş. HPV enfeksiyonu olan veya olmayan 45 menopoz öncesi kadının analizine dayanarak HPV enfeksiyonunun mikrobiyolojik belirteçleri olarak *Fusobacteria* (özellikle *Sneathia* spp.) kullanılabilir olduğu tespit edilmiş. HPV pozitif kadınlar, daha düşük *Lactobacillus* spp oranıyla daha yüksek mikrobiyal çeşitlilik sergilemiş. Bir başka çalışmada ise servikal sitolojisi normal olan 70 sağlıklı kadın (32 HPV negatif ve 38 HPV pozitif) incelenmiş ve HPV pozitif kadınların daha fazla biyolojik çeşitliliğe sahip olduğunu gösterilmiş. Spesifik türleri incelediklerinde HPV ile enfekte kadınlarda *L. gasseri* ve *G. vaginalis* anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüş. Bu çalışmaların her ikisi de kesitsel olup HPV'nin vajinal mikrobiyotada bir değişikliğe neden olup olmadığını veya vajinal mikrobiyotanın HPV'nin kalıcılığını etkileyip etkilemediğini belirleyememektedir. Mikrobiyom ile HPV enfeksiyonu arasındaki zamansal ilişkiyi inceleyen bir çalışmada ise 32 kadın, 16 hafta boyunca iki haftada bir seri olarak kendi vajinal sürüntü örneklerini toplamış ve çalışmanın sonucunda CST ile remisyon şansı arasında anlamlı bir ilişki belirlenmiş. Ayrıca CST'nin HPV negatif ve pozitif durumlar arasındaki geçiş üzerindeki etkisi de incelenebilmiş. Laktobasillerin azalmış olduğu CST IV ile *L. crispatus*'un baskın olduğu CST I karşılaştırdıklarında farklar anlamlı olmasa da HPV pozitifliğine geçiş oranları CST IV için daha yüksek bulunmuş. *L. gasseri* baskın CST II ile *L.*

Crispatus'un baskın olduğu CST I karşılaştırıldığında, en hızlı HPV klirensi CST II'de izlenirken, en yavaş klirens CST IV(özellikle yüksek oranlarda *Atopobium* bulunan)'te gösterilmiş. Servikovajinal bakteri popülasyonunun HPV virüsünün kalıcılığında ve daha sonra servikal preinvaziv lezyonların ortaya çıkmasında önemli bir rol oynadığını gösteren çok sayıda kanıt bulunmaktadır. Vajinal mikrobiyomun servikal karsinogenezdeki etkisini değerlendiren gelecekteki çalışmalar, mikrobiyomun klinik sonuçla ve özellikle HPV enfeksiyonu ve servikal hastalığın ilerlemesi veya gerilemesi ile korelasyonuna izin verecek mevcut biyobankalardan alınan boylamsal numunelerdeki nedensel bağlantıyı araştırmalıdır. Bu çalışmalar aynı zamanda bağışıklık fonksiyon bozukluğu ve hücre düzensizliği ile ilişkili olabilecek mikrobiyom yan ürünlerinin (yani metabolomiklerin) ölçümlerini de içermesi gerektiği görülmüş (55).

Servikal mikrobiyota kompozisyonunun HPV virüsünün kalıcılığında ve daha sonra servikal preinvaziv lezyonların ortaya çıkmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Çalışmamızda HPV pozitif ve HPV negatif olan hastaların ektoservikal mikrobiyotalarından aldığımız örnekleri analiz ederek mikrobiyotanın değişimlerinin servikal intraepitelyal lezyonlarla olan ilişkisi aydınlatmayı hedefledik.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Yeri ve Zamanı

Bu çalışma, Mart 2023 ve Eylül 2023 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2. Araştırma Evreni ve Örnekleme

Çalışma evrenini Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı jinekoloji polikliniğine başvurmuş olan 25-50 yaş arasındaki HPV testi pozitif ve negatif olan hastalar oluşturmaktadır.

Mart 2023 ile Eylül 2023 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı jinekoloji polikliniğine başvuran 42 hasta oluşturmaktadır.

3.3. Araştırma Tipi ve Değişkenleri

Hasta kayıtları, smear sonuçları ve servikal mikrobiyota analizleri ile elde edilen veriler yardımı ile “*prospektif*” olarak gerçekleştirildi. Hastaların demografik verileri ve uygulanan tetkik ve sonuçlara ait klinik bilgileri hasta dosyalarından ve klinik veri tabanından elde edildi. Olguların yaş, daha önce yaşadıkları gebelik sayıları, doğum sayıları, komorbiditeleri, geçirdikleri cerrahi operasyonları, kullandıkları ilaçları, son adet tarihleri, beden kitle indeksleri, güncel HPV tarama sonuçları, cinsel korunma yöntemleri, sigara ve alkol kullanımı, cinsel partner sayısı, son 1 hafta içerisindeki antibiyotik kullanımı, genital siğil öyküsü, koruyucu HPV aşısı yaptırmadığı ve herhangi bir jinekolojik şikayeti olup olmadığı kaydedildi.

3.4. Dahil edilme ve Dışlama Kriterleri

25-50 yaş arasında olan, HPV taraması son bir yıl içerisinde yapılmış olan, jinekolojik olarak asemptomatik olan, son 1 hafta içerisinde herhangi bir antibiyoterapi kullanımı olmayan, immünsüpresyon tedavisi almayan, HPV koruyucu aşısı yapılmamış olan gönüllüler çalışmaya dahil edilmiş olup, çalışmada uygulanması

gereken tanı ve tedavi yöntemlerini kendi rızaları ile kabul etmeyen ,25 yaşından küçük ve 50 yaşından büyük olan, HPV taraması yapılmamış veya güncel olmayan, jinekolojik semptomları olan , son 1 hafta içerisinde antibiyoterapi kullanımı olan, immünsüpresif tedavi altında olan, koruyucu HPV aşısı yapılmış olan kişiler çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.5. Verilerin Toplanması ve Veri Toplama Aracı

Çalışmada veri aracı olarak polikliniğe başvuran hastaların kayıtlarından yararlanılmıştır. Laboratuvar verilerinin toplanması aşamasında hastalardan tek kullanımlık steril spekulum ile jinekolojik muayene esnasında PAP smear testi ve servikal mikrobiyota örneği alındı. Alınan PAP smear örneği alkol ile fikse edilerek incelenmek üzere Patoloji laboratuvarına gönderildi. Alınan servikal mikrobiyota örneği -80 derece dondurulmak üzere muhafaza ünitesine götürüldü. Toplanan mikrobiyota numuneleri Diogen Biyoteknoloji Merkezine(Ankara) soğuk zincirde nakledildi.

3.6. DNA İzolasyonu

Ekstraksiyon aşamasında numuneler çözdürüldü ve vorteks ile homojen hale getirildikten sonra içerisinde 2 ml alındıktan sonra yeni mikro tüpe aktarıldı. Mikro tüp 16.000g x 15 dakika +4 C şartlarında santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet ile devam edildi. Pellet numuneleri DiaRex® Stool Genomic DNA Extraction Kit (Kat No: SD-0323, Ankara) kullanılarak yapıldı. Pellet numunesi üzerine 250µl Lizis (LBD) solüsyonu eklendi. Ardından üzerine 15mg cam ve 10 adet zirkon boncuk eklenerek homojenizatör cihazında 4000 rpm 2 x 20 saniye uygulama yapıldı. Homojenizasyondan sonra üzerine 25µl Proteinaz K (PKD) solüsyonu eklendi ve 56 °C' de 60 dakika inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda tüm içerik 5000 g' de 5 dakika santrifüj yapılarak süpernatant yeni tüpe aktarıldı. Süpernatant üzerine 200µl Stool Lizis (SLD) solüsyonu eklendi ve 70 °C' de 10 dakika inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun ardından lizata 250 µl mutlak etanol eklendi ve tüm içerik kolona aktarıldı. Kolon 8000 g x 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra yeni tüpe aktarıldı. Ardından kit protokolüne göre yıkamalar yapıldıktan sonra 100µl Elüsyon

(EBD) solüsyonu eklendi ve 2 dakika İnkübasyondan sonra 8000 g x 1 dakika santrifüj yapılarak genomik DNA elde edildi.

3.7. Amplikon Dizileme

Her bir numune için ekstrakte edilen DNA 6S V3-V4 314F-860R standart primer setleri kullanılarak amplifiye edildi. Kütüphane hazırlık için Nextera XT indexleri (illumina) kullanılarak her bir numuneye ait barkodlar ilgili bölgelere bağlandı. Hazırlanan kütüphane hedef bölge uzunluğuna uygun seçim yapılacak şekilde üreticinin protokolü takip edilerek saflaştırıldı (AMPure XP, Beckman Coulter). Saflaştırılan numuneler Miseq (Illumina) cihazına üretici protokolü takip edilerek yüklendi.

3.8. Biyoinformatik Analizler

Çift yönlü (2x250) illumina okumaları qiime2 sisteminde yüklendi. İlk olarak bütün numunelerin uygun okuma derinliğine sahip olduğu tespit edildi ve bu aşamada hiçbir numune çalışma dışı bırakılmadı. Kalite temizlemesi, kimera deteksiyonu qiime2 üzerinde DADA2 algoritması (via q2-dada2) kullanılarak gerçekleştirildi. Kalite skoru çoğunlukla 30'un altında olan kısımlar dışarıda bırakılarak ASV'ler (Amplicon Sequence Variants) oluşturuldu. Elde edilen ASV'ler Silva 138 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>) veritabanı ile haritalanarak taksonomik tablolar oluşturuldu.

3.9. Araştırma İnsan Gücü ve Bütçesi

Çalışma tez sahibi araştırma görevlisi tarafından ilgili öğretim üyesi danışmanlığında planlanmış, hasta verilerine erişilmiş, laboratuvar verilerinin analizleri yapılmış ve sonuçlar rapor haline getirilmiştir. Prospektif bir özellik taşıması bakımından, bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2023-2814 nolu proje kapsamında desteklenmiştir. Çalışmada planlanan bütçe desteği haricinde herhangi bir kuruma ek yük getirecek bir işlem uygulanmamıştır.

3.10. Etik Kurul ve Kurum İzinleri

Çalışma için T.C. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 22.11.2022 tarih ve 58 nolu kararı ile onay alınmıştır. Çalışmamızın verileri yalnızca bilimsel araştırma amacıyla kullanılmış ve hastalara ait kişisel tanımlayıcı veriler gerek araştırma raporunda gerekse üçüncü şahıs ve kurumlarla paylaşılmamıştır.

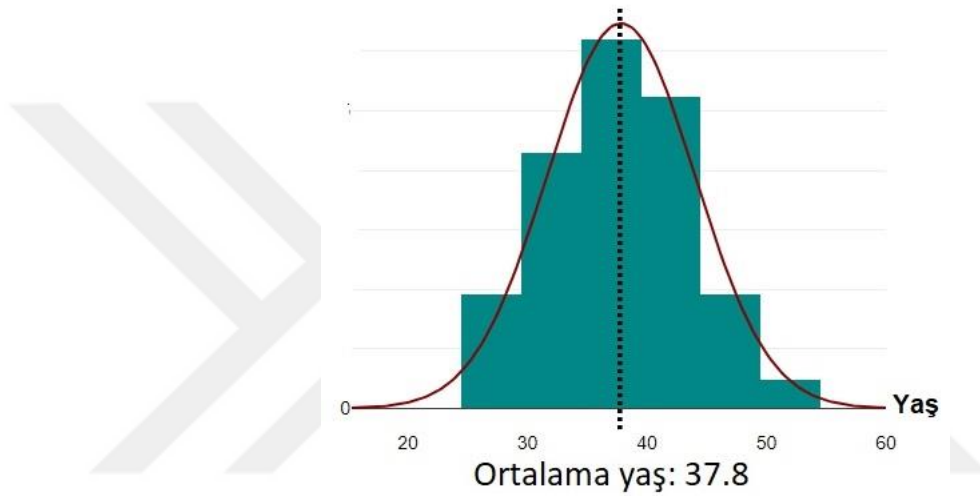
3.11. Verilerin Analizi

Mikrobiyota analizlerinde veri görselleştirme ve biyoistatistiksel analizler için qiime2 ile oluşturulan dosyalar R 4.1 programlama dili R studio kullanılarak işleme alındı. Alfa çeşitlilik, Beta çeşitlilik analizleri ile birlikte grup içi ve gruplar arası temel farklılıklar tespit edildi. Taksonomik olarak gruplar arasında farklı yoğunluklar DeSeq2 paketi kullanılarak tespit edildi. Lefse analizi ile gruplar arasındaki en temel farklılıklar LDA skoru 2'den fazla olacak şekilde tespit edildi.

4.BULGULAR

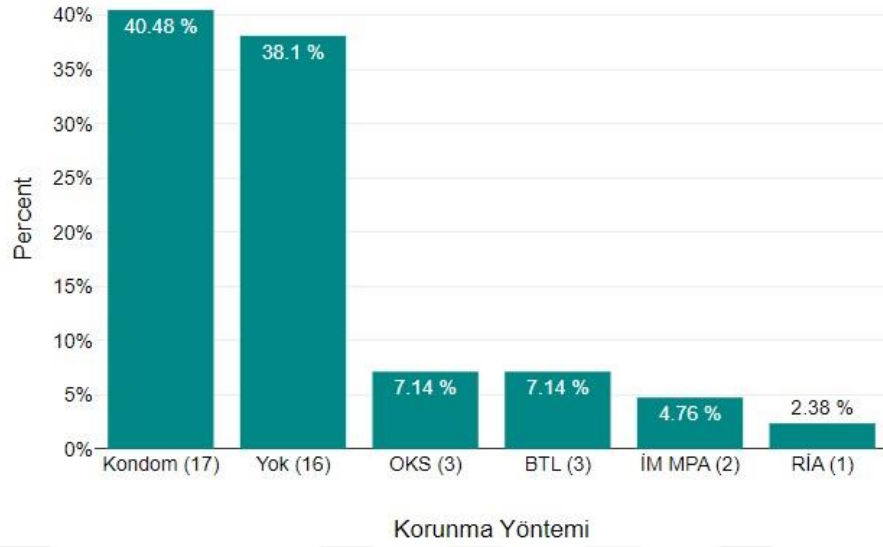
4.1. Hastaların Demografik Özellikleri

Çalışma grubunu oluşturan 42 kadının yaş aralıkları 25-50 yıl arasında olup yaş ortalaması 37.8 yıldır. Çalışmaya katılan hiçbir hasta menapozal dönemde değildir. 21 kişilik HPV pozitif hasta grubunun yaş ortalaması 36.9 yıl ve 21 kişilik HPV negatif hasta grubun yaş ortalaması 38.7 yıldır.



Şekil 4.1 42 kişilik Çalışma Grubunun Yaş Değişkenleri

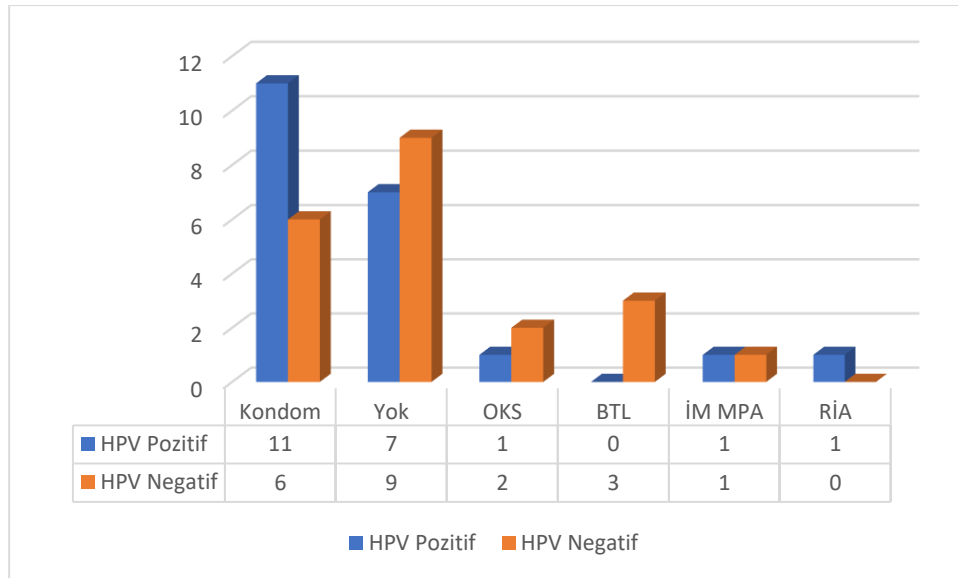
Çalışma grubunun beden kitle indeksi(BMI) hesaplamasında üst sınır 34, alt sınır 18 olmak üzere ortalama BMI 25'tir. Hastaların gebelik sayıları 0 ila 4 arasında değişirken çoğunluğun gebelik sayısı 2, çoğunluğun doğum sayısı 1 olarak belirlenmiştir. Hastaların partner sayısı sorgulandığında 42 hastadan sadece 1 hasta çoklu partner öyküsü belirtmiş, diğer 41 hasta tek partneri olduğunu belirtmiştir. Tüm hastaların HPV tarama testleri son 1 yıl içinde yapılmıştır. HPV pozitif grupta tüm hastalar yüksek riskli HPV ile enfekte iken subtipi olarak 7 hastanın HPV-16 pozitifliği, 3 hastanın HPV-18 pozitifliği ve 11 hastanın HPV-16 ile HPV-18 dışı yüksek riskli HPV tipleri(HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67, 68) ile enfekte olduğu izlenmiştir.



Şekil 4.2. Çalışma Grubunun Korunma Yöntemleri

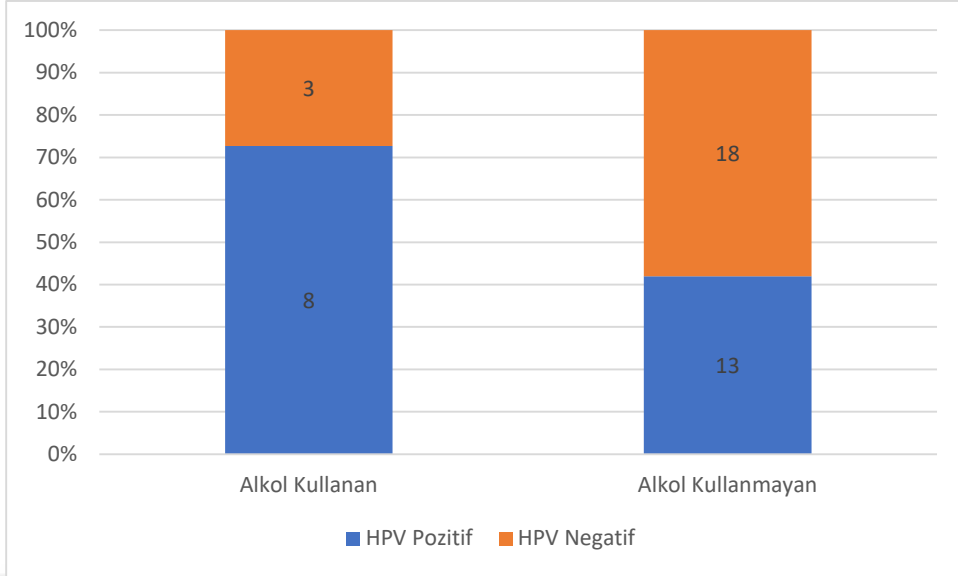
Hastaların hepsi düzenli cinsel hayatları olduğunu belirtmekte olup en sık tercih edilen korunma yöntemi kondom, en az tercih edilen ise rahim içi araç olurken, korunma yöntemi kullanmayan hasta sayısı 16'dır.

Tablo 4.1. HPV Durumlarına Göre Grupların Korunma Yöntemleri



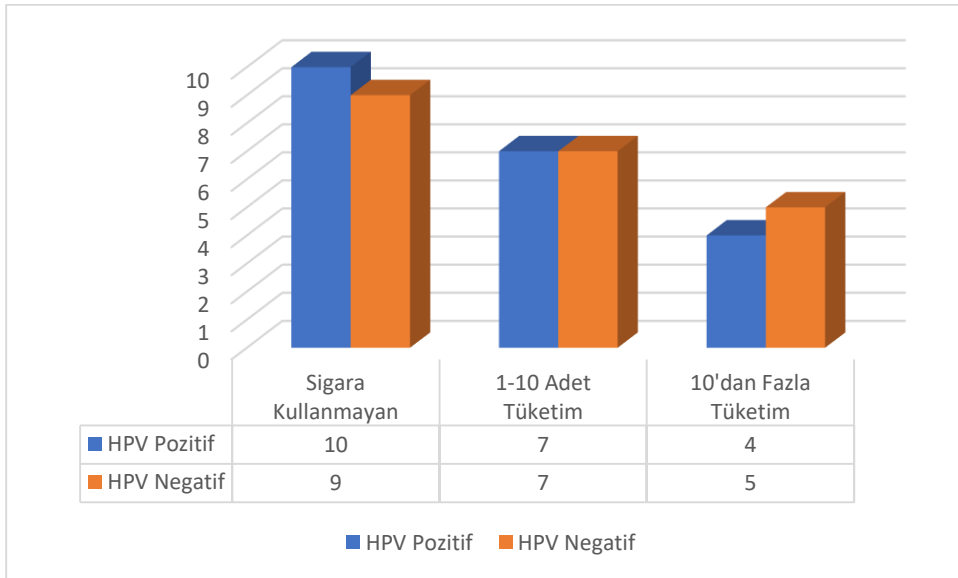
Hastaların alkol kullanım alışkanlıkları sorgulandığında 31 hasta alkol kullanımı olmadığını belirtirken, düzenli alkol kullanımı olan hasta sayısı 11'dir.

Tablo 4.2. HPV Durumlarına Göre Grupların Alkol Kullanımı



Hastaların sigara kullanım alışkanlıkları sorgulandığında 19 hasta sigara kullanımını olmadığını belirtirken, gün içerisinde 1 ila 10 adet sigara kullandığını belirten hasta sayısı 12, gün içerisinde 10 adetten fazla sigara kullandığını belirten hasta sayısı 11'dir.

Tablo 4.3. HPV Durumlarına Göre Grupların Sigara Alışkanlıkları

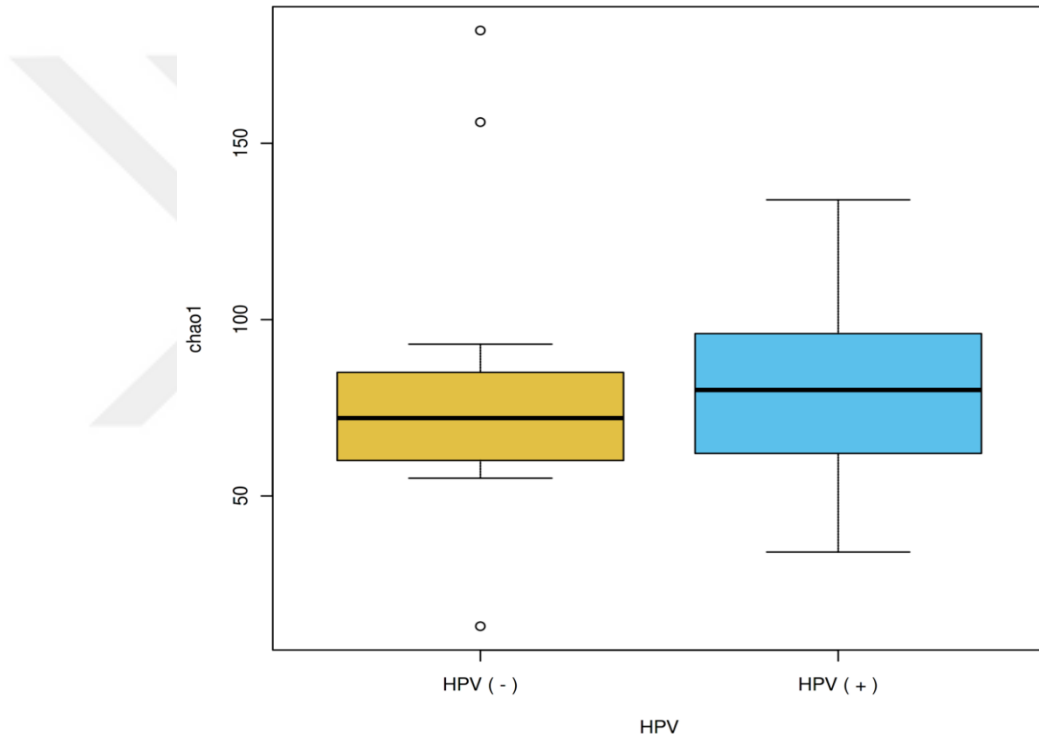


4.2. Mikrobiyota Analizinin Değerlendirilmesi

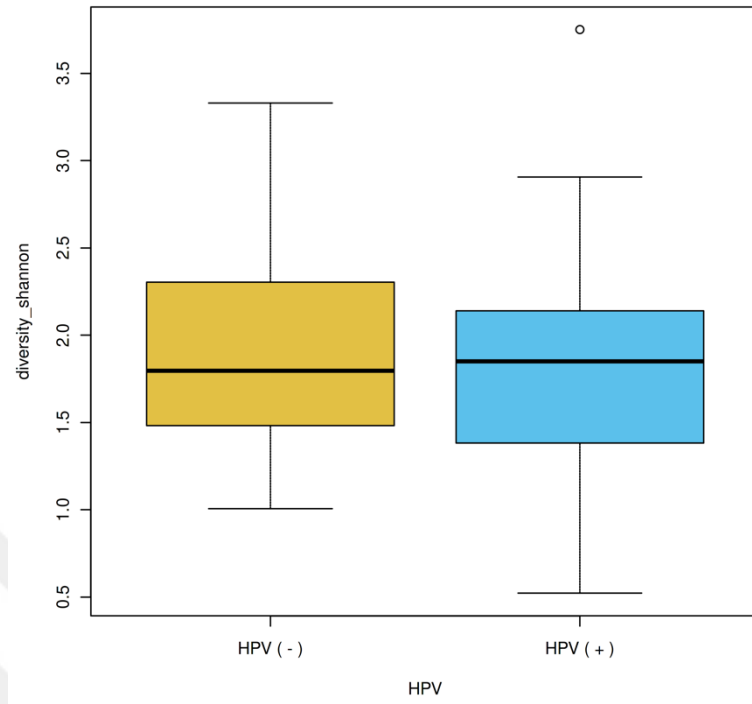
Çalışmada HPV pozitif olan olgular ve HPV negatif olgularda metagenomik analizler mikrobiyota kompozisyonu değerlendirildi.

4.2.1. Alfa çeşitlilik

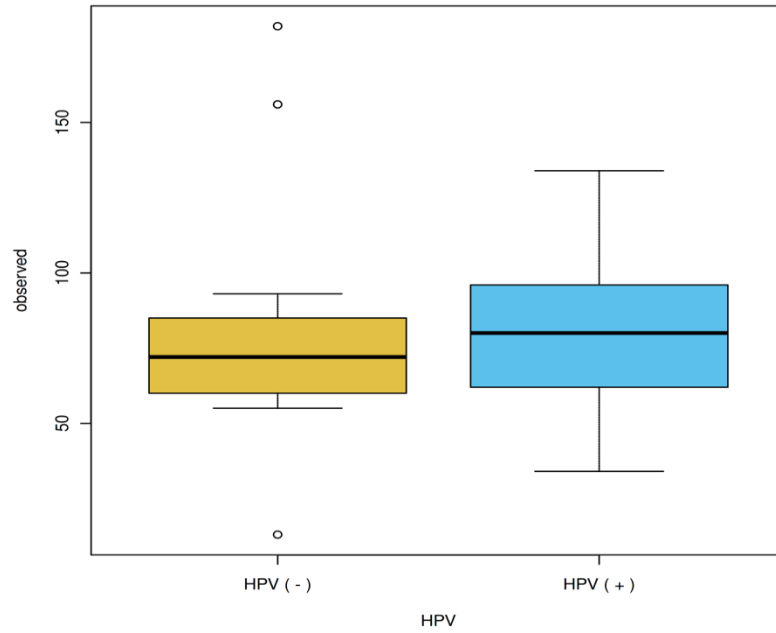
Alfa çeşitlilik ele alınan örnek içerisindeki ya da gruplanmış veri içerisindeki çeşitliliği ifade etmektedir. Çalışmamızda alfa çeşitliliğin değerlendirilmesinde observed Chao1 indeksi, Shannon, observed OUT ve Simpson indeksleri kullanıldı. Çalışmada alfa çeşitlilik parametreleri olan Chao1, Shannon, observed OTU ve Simpson indeksleri HPV pozitif ve negatif grup arasında farklılık saptanmadı (hepsi için $p>0.05$). (Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6).



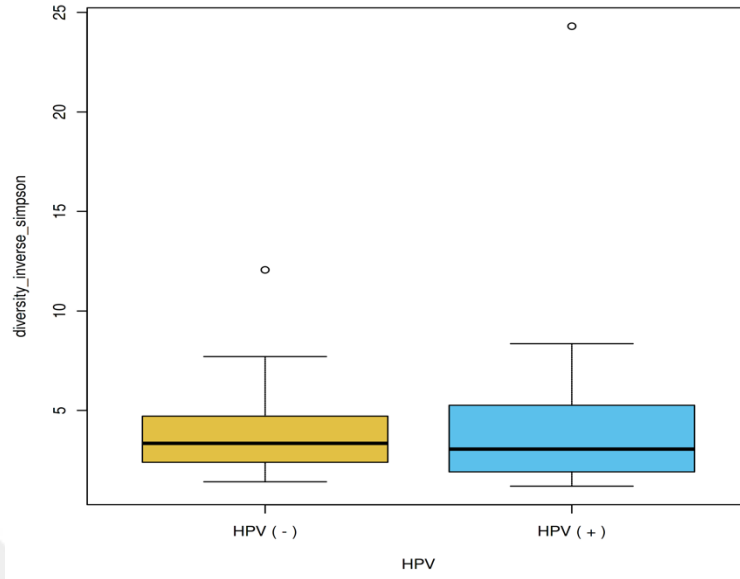
Şekil 4.3 HPV pozitif ve HPV negatif örneklerde Chao1 indeksi karşılaştırması



Şekil 4.4 HPV pozitif ve HPV negatif örneklerde Shannon indeksi karşılaştırması



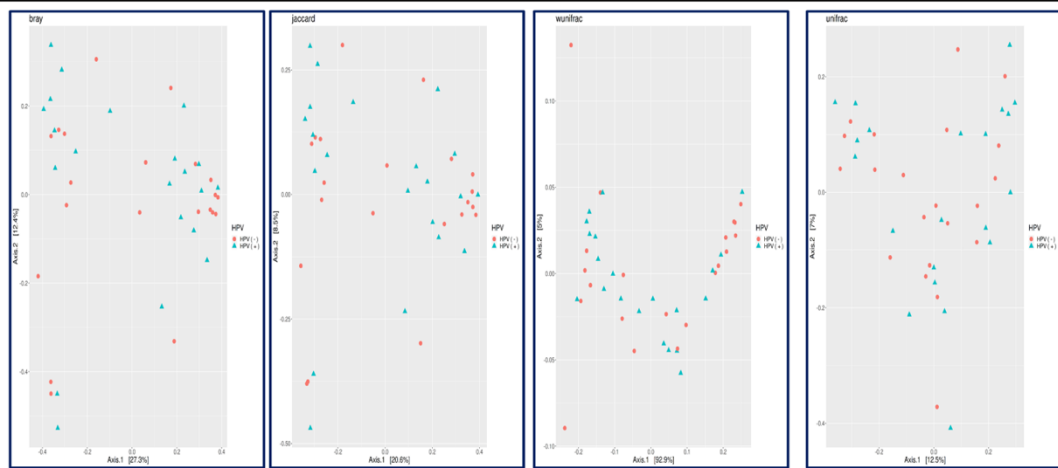
Şekil 4.5 HPV pozitif ve HPV negatif örneklerde observed OTU indeksi karşılaştırması



Şekil 4.6 HPV pozitif ve HPV negatif örneklerde Simpson indeksi karşılaştırması

4.2.2. Beta Çeşitlilik

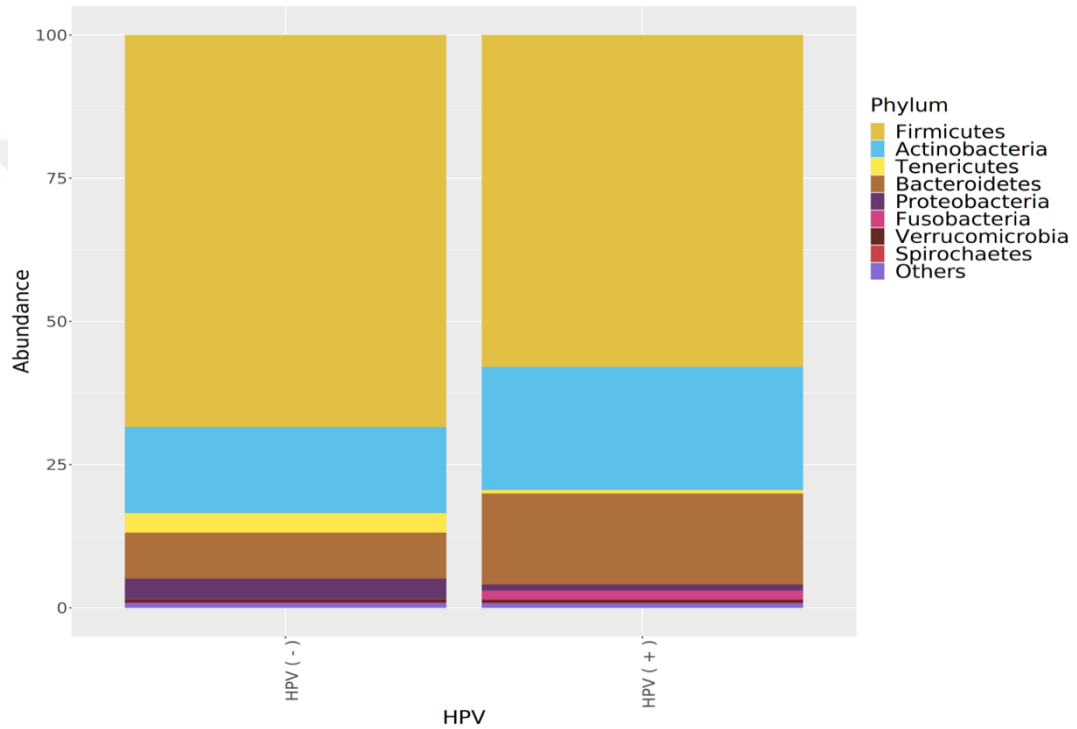
Çalışma örneklerde Bray Curtis (A), Jaccard (B), UniFrac (C) ve weighted UniFrac mesafelerinin temel koordinat analizi (PCoA) analizi sonuçlarında, HPV pozitif ve HPV örneklerin tür kompozisyonunun birbirinden farklı olmadığı saptadı ($p>0.05$) (Şekil 4.5)



Şekil 4.7 Bray Curtis (A), Jaccard (B), Weighted Unifrac (C) ve Unweighted Unifrac (D) temel koordinat analizleri (PCoA). (Her nokta bir örneği temsil eder. Kırmızı yuvarlak HPV negatif olguları, yeşil üçgen HPV pozitif olguları temsil eder.)

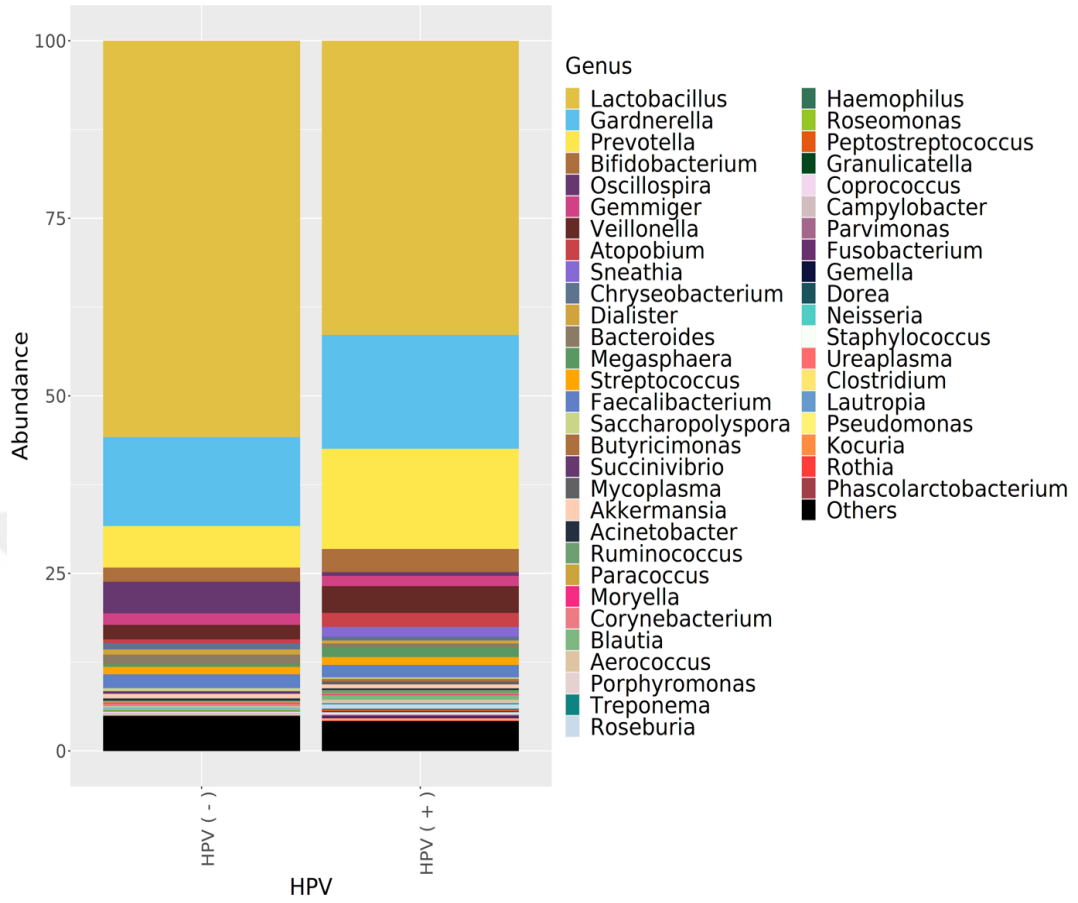
4.7 HPV Pozitif ve HPV Negatif Olgularda Mikrobiyota Kompozisyonu

Filum düzeyinde, HPV negatif ve HPV pozitif gruplarda Firmicutes filumu en sık saptanmıştır. HPV negatif grupta, filum düzeyinde *Firmicutes* (%64.3), *Actinobacteria* (%14.3), *Bacteroidetes* (%10.3), *Tenericutes* (%5.8) ve *Proteobacteria* (%3.9) diye sıralanırken; HPV pozitif grupta *Firmicutes* (%52.8), *Actinobacteria* (%21.7), *Bacteroidetes* (%20.3), *Fusobacteria* (%2.2), *Proteobacteria* (%1.2) şeklinde sıralanmaktaydı (Şekil 4.6).



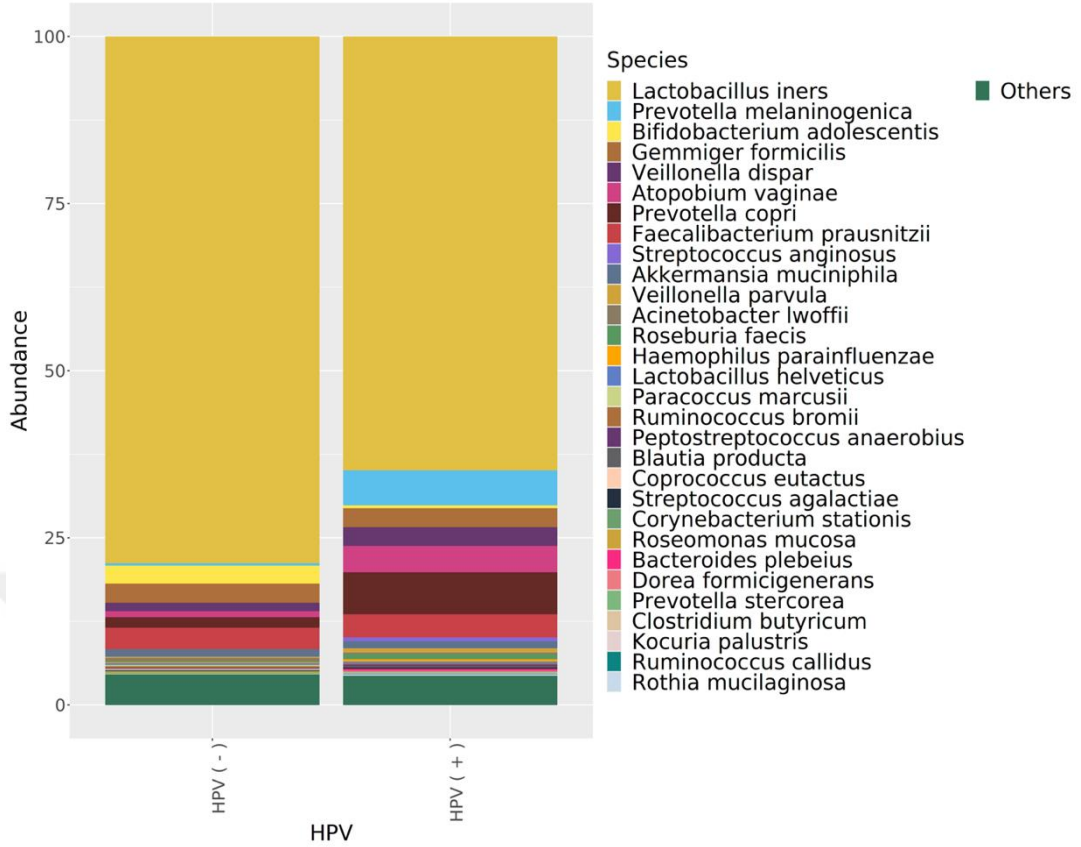
Şekil 4.8 HPV negatif ve HPV pozitif örneklerin mikrobiyota analizlerinin filum düzeyinde karşılaştırması

Cins düzeyinde, HPV negatif ve HPV pozitif gruplarda en sık *Lactobacillus* saptanmıştır. HPV negatif grupta *genus* düzeyinde *Lactobacillus* (%54.0), *Gardnerella* (%11.4), *Prevotella* (%8.4), *Oscillospira* (%3.4), *Gemmiger* (%3.1), *Faecalibacterium* (%2.5), *Bifidobacterium* (%2.1) diye sıralanırken; HPV pozitif grupta *Lactobacillus* (%35.3), *Prevotella* (%18.5), *Gardnerella* (%17.4), *Veillonella* (%4.4), *Bifidobacterium* (%2.2), *Sneathia* (%1.9) ve *Atopobium* (%1.9) şeklinde sıralanmaktaydı (Şekil 4.8).



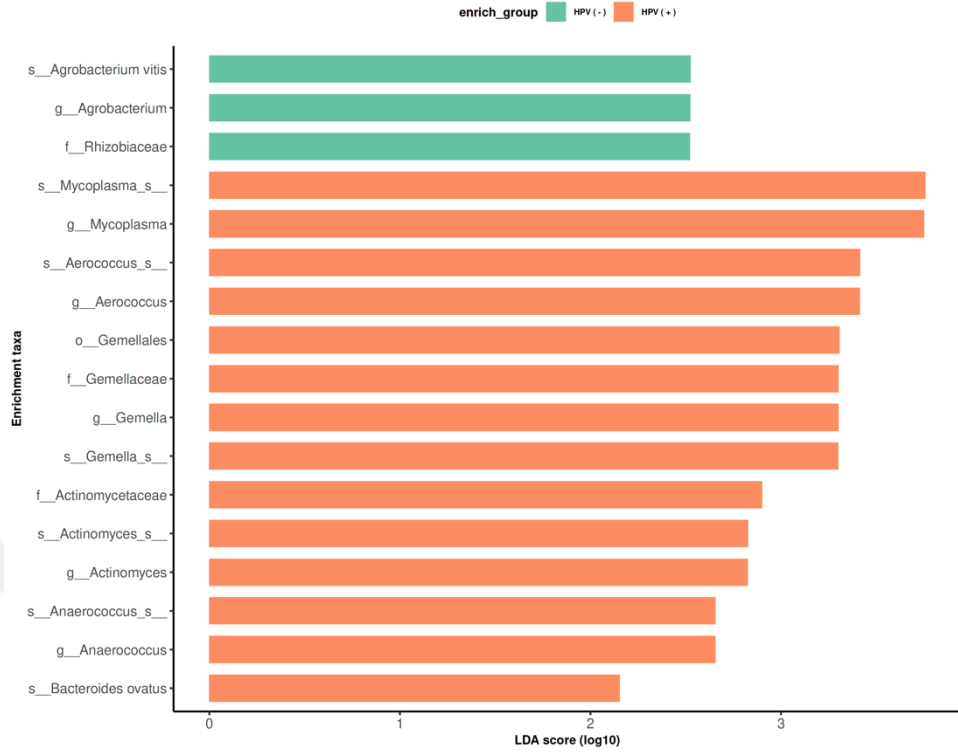
Şekil 4.9 HPV negatif ve HPV pozitif örneklerin mikrobiyota analizlerinin cins düzeyinde karşılaştırması

Tür düzeyinde, HPV negatif ve HPV pozitif gruplarda en sık *Lactobacillus iners* saptanmıştır. HPV negative grupta tür düzeyinde *Lactobacillus iners* (%75.6), *Gemmiger formicilis* (%5.6), *Faecalibacterium prausnitzii* (%4.5), *Bifidobacterium adolescentis* (%2.8), *Prevotella copri* (%2.5), *Akkermansia muciniphilia* (%1.6), *Atopobium vaginae* (%1.5) saptandı. HPV pozitif grupta ise tür düzeyinde *Lactobacillus iners* (%62.2), *Prevotella melaninogenica* (%8.6), *Prevotella copri* (%6.3), *Atopobium vaginae* (%4.1), *Faecalibacterium prausnitzii* (%3.9), *Gemmiger formicilis* (%3.2), *Veillonella dispar* (%2.2), *Akkermansia muciniphilia* (%1.2) şeklinde sıralanmaktaydı (Şekil 4.9).

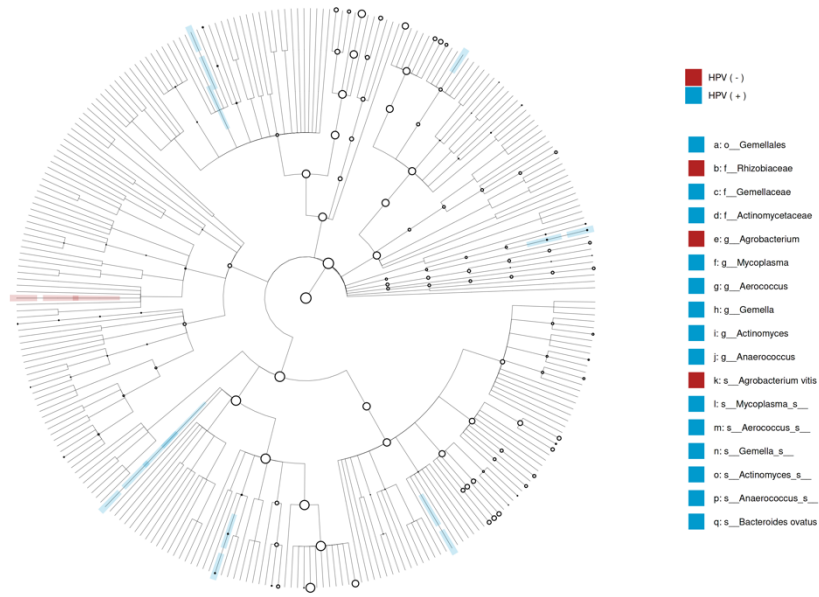


Şekil 4.10 HPV negatif ve HPV pozitif örneklerin mikrobiyota analizlerinin tür düzeyinde karşılaştırması

Çalışmada gruplar arasında anlamlı bakteri kompozisyonlarını belirlemek için LEfSe (*linear discriminant analysis effect size*) analizi (LDA eşik değeri >2 , $p < 0.05$) kullanıldı. HPV negatif ve HPV pozitif olguların LEfSe analiz sonuçları Şekil 4.10 ve 4.11’de gösterilmiştir. HPV negatif olgularda aile düzeyinde *Rhizobiaceae* ($p < 0.05$), HPV pozitif olgularda aile düzeyinde *Gemellaceae* ($p < 0.01$) ve *Actinomycetaceae* ($p < 0.01$) baskın olarak saptandı. Cins düzeyinde HPV negatif olgularda *Agrobacteria* ($p < 0.05$) baskın olarak saptandı. HPV pozitif olgularda ise *Mycoplasma* ($p < 0.01$), *Aerococcus* ($p < 0.05$), *Gemella* ($p < 0.01$), *Actinomyces* ($p < 0.05$) baskın olarak saptandı. Tür düzeyinde HPV negatif olgularda *Agrobacterium vitis* ($p < 0.05$) baskın olarak saptanırken HPV pozitif olgularda *Mycoplasma_s* ($p < 0.01$), *Aerococcus_s* ($p < 0.05$), *Gemella_s* ($p < 0.01$), *Actinomyces_s* ($p < 0.05$), *Anaerococcus_s* ($p < 0.05$) ve *Bacteroides ovatus* ($p < 0.05$) baskın olarak saptandı (Şekil 4.10, Şekil 4.11).



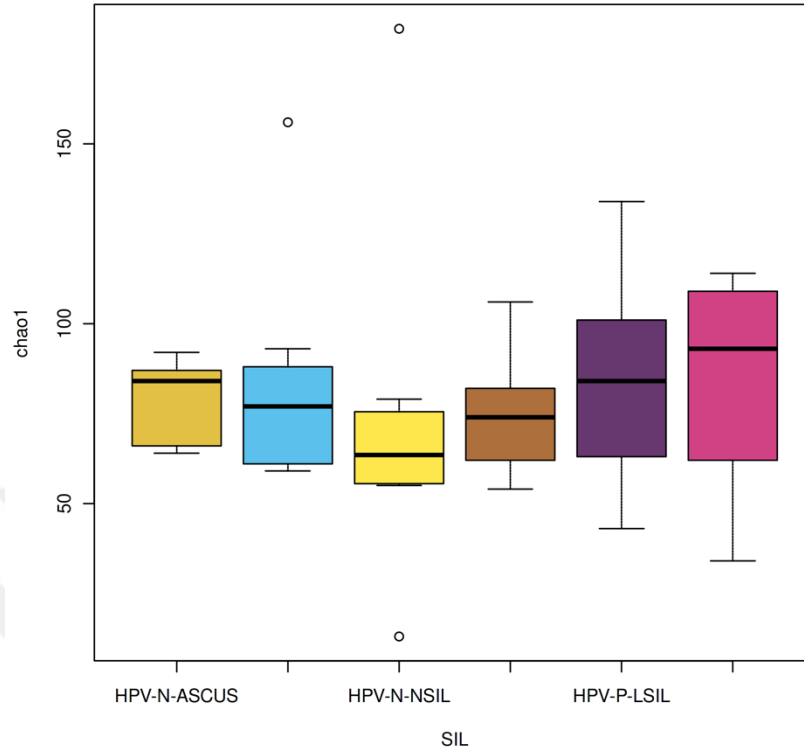
Şekil 4.11. HPV negatif ve HPV pozitif örneklerinde LefSe analizi. Yatay çubuklar, dikey noktalı çizgilerle gösterilen log₁₀ dönüştürülmüş LDA puanını temsil eder. HPV pozitif (kırmızı) HPV negatif (Yeşil) p—filum, c—sınıf, o—takım; f—aile, g—cins, s—tür



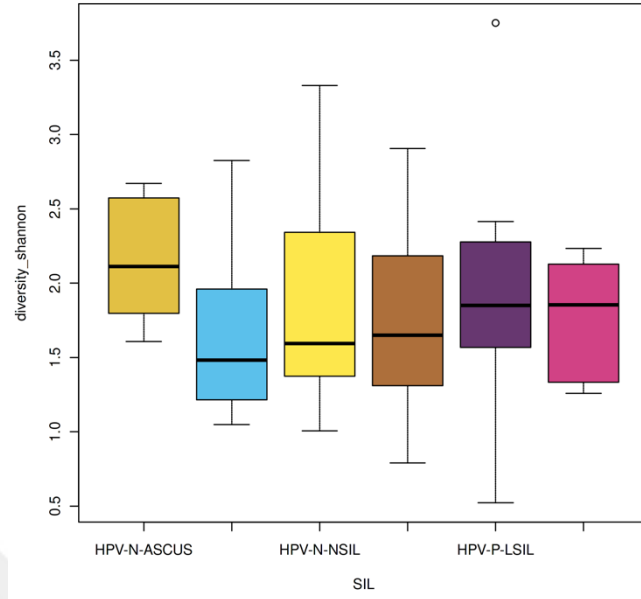
Şekil 4.12 HPV negatif ve HPV pozitif örneklerinde radyal filogenetik ağacın her bir halkasının farklı bir taksonomik seviye olduğunu gösteren bir kladogram. LEfSe analizi. Yatay çubuklar, dikey noktalı çizgilerle gösterilen log 10 dönüştürülmüş LDA puanını temsil eder. Kırmızı: HPV negatif, Mavi: HPV pozitif

4.2.3. Alfa çeşitlilik

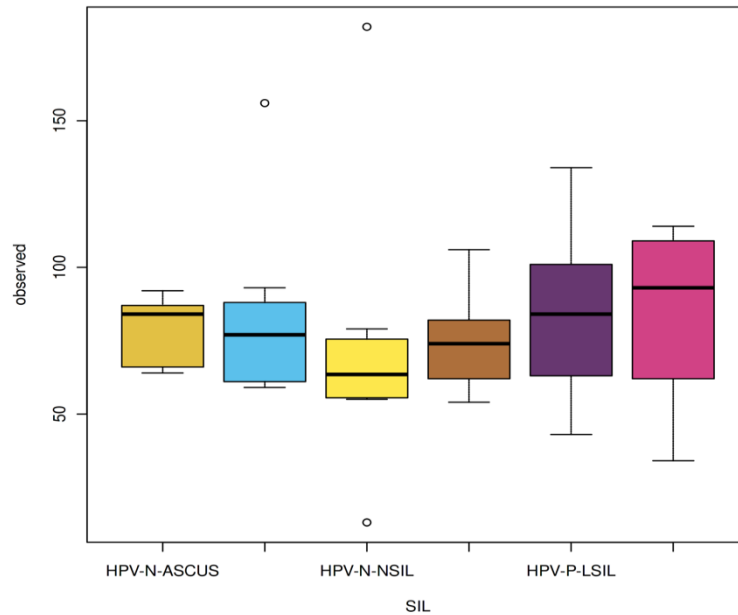
Çalışmada alfa çeşitlilik parametreleri olan Chao1, Shannon, observed OTU ve Simpson indeksleri HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında benzerdi (hepsi için $p > 0.05$). (Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15).



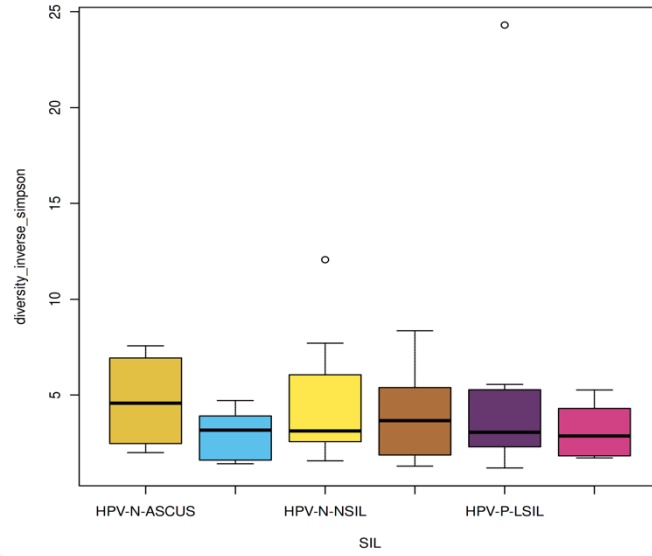
Şekil 4.13. HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında Chao1 indeksi karşılaştırması



Şekil 4.14 HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında Shannon indeksi karşılaştırması

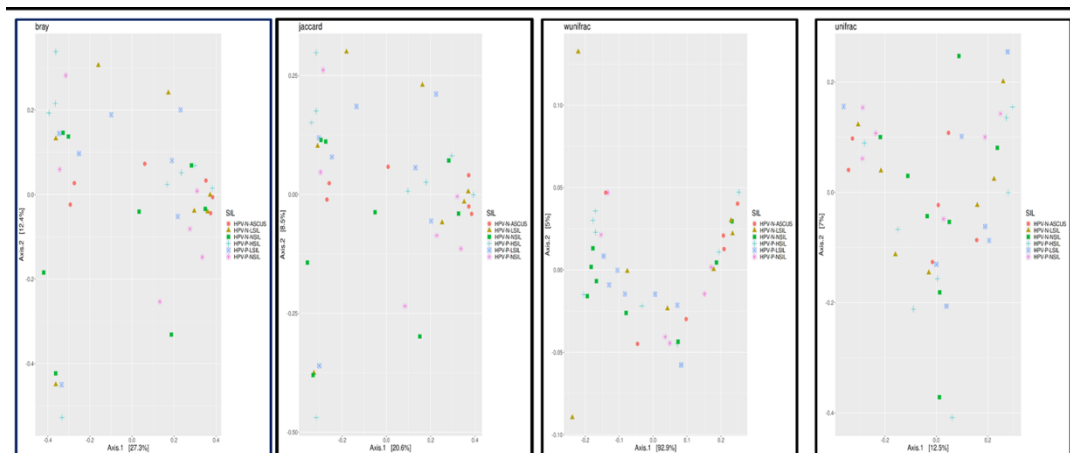


Şekil 4.15 HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında observed OTU indeksi karşılaştırması -



Şekil 4.16 HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında Simpson indeksi karşılaştırması

Çalışma örneklerde Bray Curtis (A), Jaccard (B), UniFrac (C) ve weighted UniFrac mesafelerinin temel koordinat analizi (PCoA) analizi sonuçlarında, HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında tür kompozisyonunun birbirinden farklı olmadığı saptadı ($p>0.05$) (Şekil 4.15)

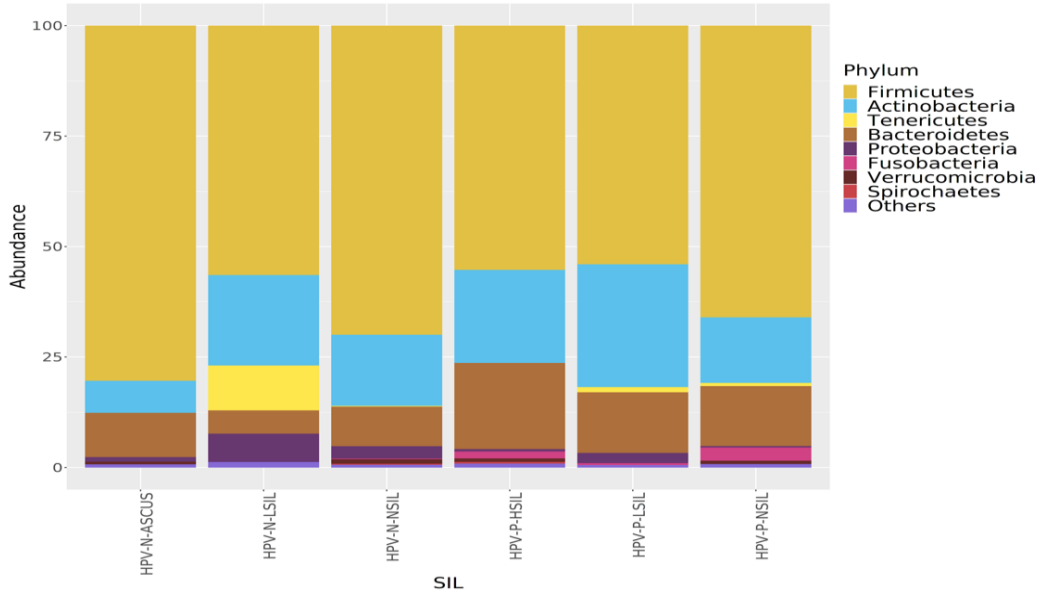


Şekil 4.17 HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında Bray Curtis (A), Jaccard (B), Weighted Unifrac (C) ve Unweighted Unifrac (D) temel koordinat analizleri (PCoA). (Her nokta bir örneği temsil eder.)

HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında mikrobiyota kompozisyonunun filum, cins ve tür düzeyinde karşılaştırması

Filum düzeyinde; **HPV negatif ASCUS grubunda** *Firmicutes* (%69.9), *Bacteroidetes* (%17.7), *Actinobacteria* (%9.9) ve *Proteobacteria* (%1.3) idi. **HPV negatif LSIL grubunda** *Firmicutes* (%53.1), *Actinobacteria* (%16.9), *Tenericutes* (%16.1), *Proteobacteria* (%6.9) ve *Bacteroidetes* (%6.4.) idi. HPV negatif NSIL grubunda *Firmicutes* (%70.8), *Actinobacteria* (%14.9), *Bacteroidetes* (%8.8) ve *Proteobacteria* (%2.9) idi (Şekil 4.17).

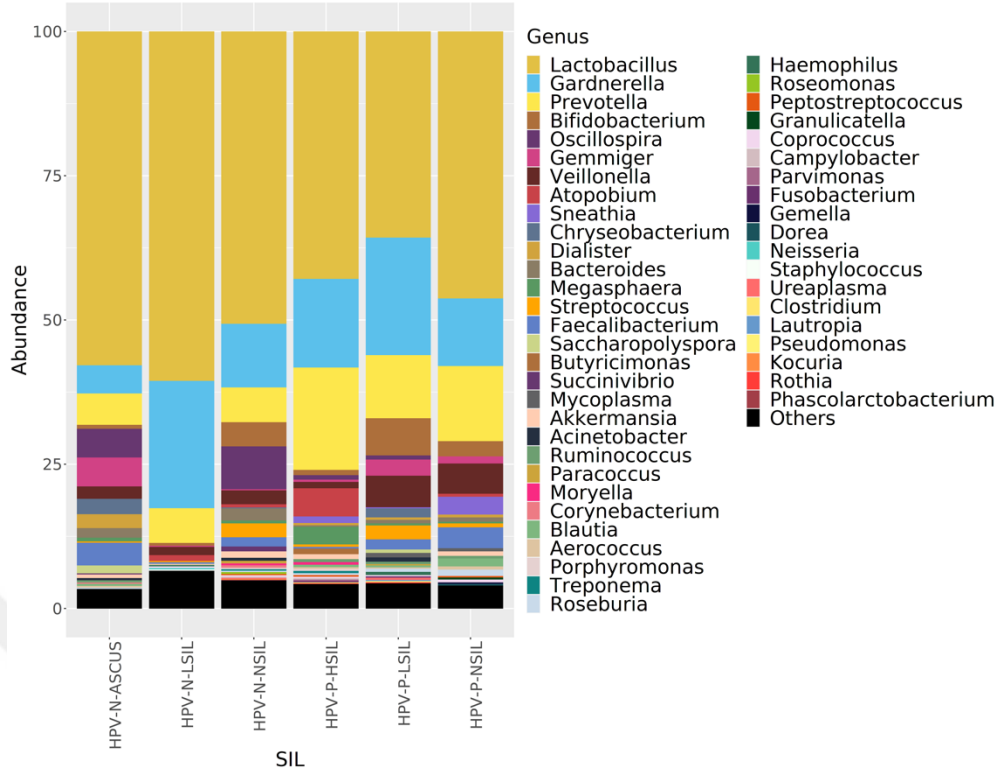
Filum düzeyinde HPV pozitif HSIL grubunda *Firmicutes* (%49.0), *Bacteroidetes* (%25.5), *Actinobacteria* (%20.3), *Fusobacteria* (%2.0) ve *Proteobacteria* (%1.0) olarak saptandı. **HPV pozitif LSIL grubunda** *Firmicutes* (%54.0), *Actinobacteria* (%27.0), *Bacteroidetes* (%15.6) ve *Proteobacteria* (%2.1) olarak saptandı. **HPV pozitif NSIL grubunda** *Firmicutes* (%56.7), *Bacteroidetes* (%18.0), *Actinobacteria* (%17.9), *Fusobacteria* (%4.5) ve *Tenericutes* (%1.3) olarak saptandı (Şekil 4.17).



Şekil 4.18 HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında filum düzeyinde karşılaştırması

Cins düzeyinde, **HPV negatif ASCUS grubunda** *Lactobacillus* (%45.5), *Prevotella* (%10.3), *Gemmiger* (%10.1), *Gardnerella* (%6.2), *Faecalibacterium* (%6.1), *Oscillospira* (%5.6), *Chryseobacterium* (%5.3), *Saccharopolysopra* (%2.6) ve *Bacteroides* (%2.1) idi. **HPV negative LSIL grubunda** *Lactobacillus* (%61.5), *Gardnerella* (%18.5), *Prevotella* (%8.0), *Atopobium* (%1.8) idi. **HPV negative NSIL grubunda** *Lactobacillus* (%54.6), *Gardnerella* (%9.9), *Prevotella* (%7.3), *Oscillospira* (%4.4), *Bifidobacterium* (%4.1), *Veillonella* (%2.9) ve *Streptococcus* (%2.6) idi (Şekil 4.18).

Cins düzeyinde HPV pozitif HSIL grubunda *Lactobacillus* (%35.4), *Prevotella* (%23.3), *Gardnerella* (%15.2), *Atopobium* (%4.2), *Megasphera* (%3.0), *Veillonella* (%2.2) ve *Sneathia* (%1.4) olarak saptandı. **HPV pozitif LSIL grubunda** *Lactobacillus* (%35.2), *Gardnerella* (%21.8), *Prevotella* (%13.0), *Bifidobacterium* (%4.3), *Veillonella* (%4.2), *Gemmiger* (%3.3), *Streptococcus* (%2.8) ve *Faecalibacterium* (%2.3) saptandı. **HPV pozitif NSIL grubunda** *Lactobacillus* (%35.1), *Prevotella* (%17.7), *Gardnerella* (%15.6), *Veillonella* (%7.7), *Sneathia* (%4.6), *Faecalibacterium* (%3.0) ve *Bifidobacterium* (%1.9) olarak saptandı (Şekil 4.18).

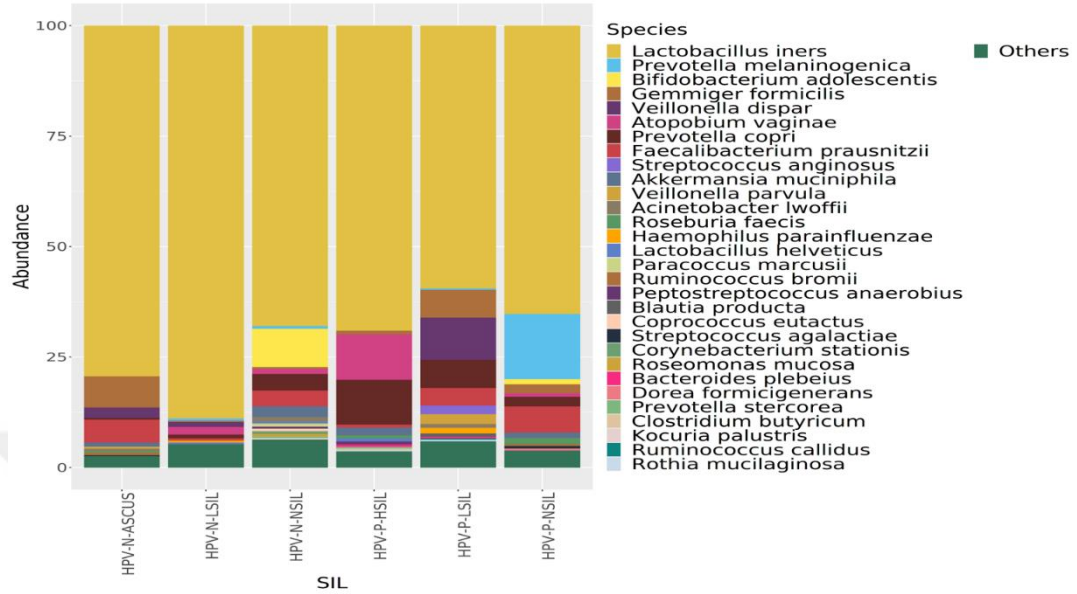


Şekil 4.19 HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında cins düzeyinde karşılaştırma

Suş düzeyinde, **HPV negatif ASCUS** grubunda *Lactobacillus iners* (%69.4), *Gemmiger formicilis* (%15.8), *Faecalibacterium prausnitzii* (%9.5), *Akkermansia muciniphilia* (%1.2) olarak saptandı. **HPV negatif LSIL** grubunda *Lactobacillus iners* (%87.9), *Atopobium vaginae* (%3.3), *Faecalibacterium prausnitzii* (%1.3), *Prevotella copri* (%1.0) olarak saptandı. **HPV negatif NSIL grubunda** *Lactobacillus iners* (%69.5), *Bifidobacterium adolescentis* (%8.4), *Prevotella copri* (%5.6), *Akkermansia muciniphilia* (%3.2), *Faecalibacterium prausnitzii* (%2.4), *Atopobium vaginae* (%1.4) olarak saptandı (Şekil 4.19).

Suş düzeyinde **HPV pozitif HSIL grubunda** *Lactobacillus iners* (%67.4), *Prevotella copri* (%11.5), *Atopobium vaginae* (%10.1), *Akkermansia muciniphilia* (%2.2), *Faecalibacterium prausnitzii* (%1.4), *Peptostreptococcus anaerobius* (%1.4) ve *Gemmiger formicilis* (%1.1) olarak saptandı. **HPV pozitif LSIL** grubunda *Lactobacillus iners* (%62.5), *Gemmiger formicilis* (%7.2), *Veillonella dispar* (%6.9), *Prevotella copri* (%5.3), *Faecalibacterium prausnitzii* (%4.9), *Streptococcus anginosus* (%3.2) saptandı. **HPV pozitif NSIL grubunda**, *Lactobacillus iners*

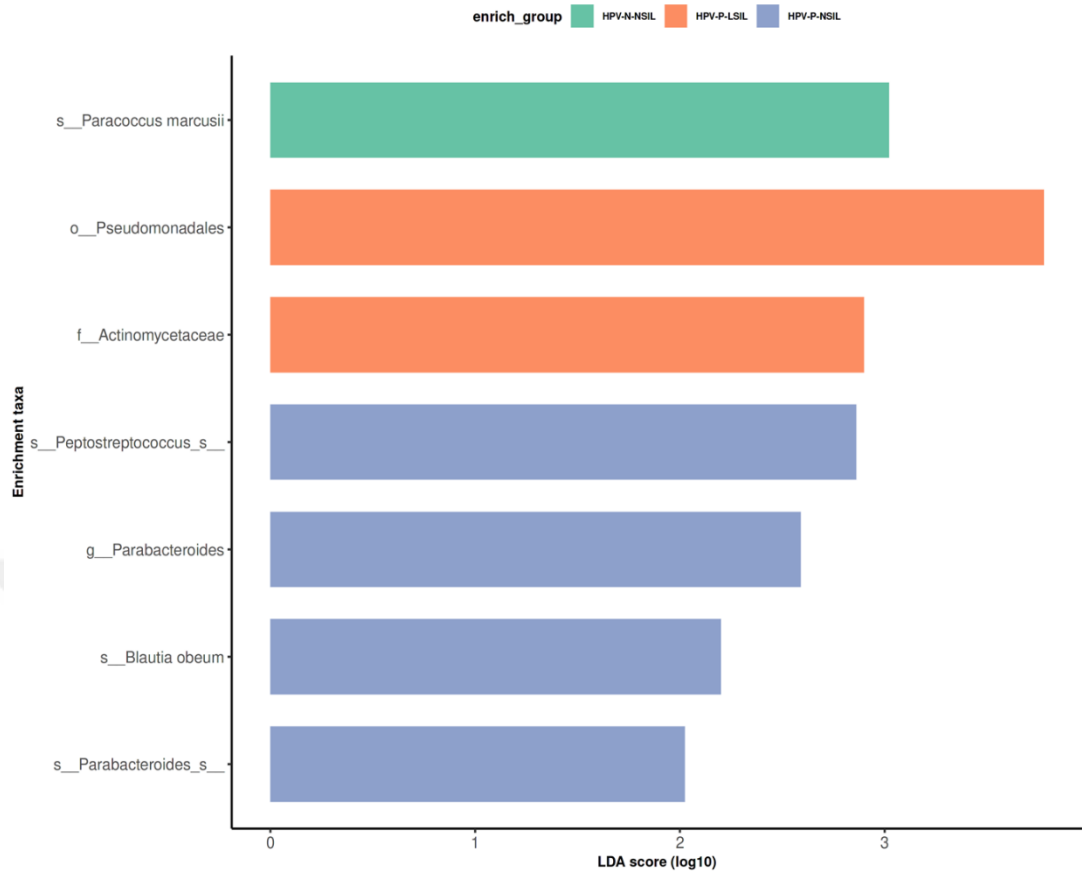
(%56.4), *Prevotella melaninogenica* (%24.7), *Faecalibacterium prausnitzii* (%5.5), *Gemmiger formicilis* (%1.9), *Prevotella copri* (%1.7), olarak saptandı (Şekil 4.19).



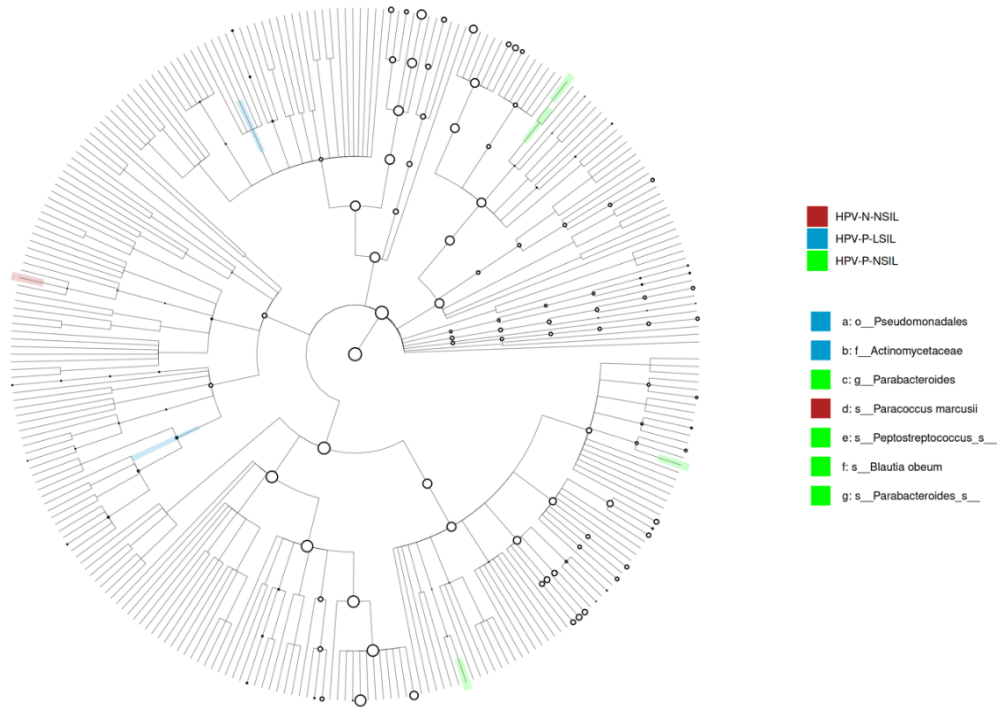
Şekil 4.20 HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında tür düzeyinde karşılaştırması

Çalışmada **HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında** anlamlı bakteri kompozisyonlarını belirlemek için LEfSe (*linear discriminant analysis effect size*) analizi (LDA eşik değeri >2 , $p < 0.05$) kullanıldı. HPV negatif ve HPV pozitif olguların LEfSe analiz sonuçları **Şekil 4.19 ve 4.20**'da gösterilmiştir.

HPV negatif NSIL olgularında *Paracoccus marcusii* ($p < 0.05$) türü baskın olarak saptandı. HPV pozitif LSIL olgularında aile düzeyinde *Actinomycetaceae* ($p < 0.05$) baskın olarak saptanırken, HPV pozitif NSIL olgularında cins düzeyinde *Parabacteroides* ($p < 0.05$), tür düzeyinde ise *Blautia obeum* ($p < 0.05$), *Parabacteroides_s* ($p < 0.05$) ve *Peptostreptococcus_s* ($p < 0.01$) baskın olarak saptandı (Şekil 4.20, Şekil 4.21).



Şekil 4.21 HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında örneklerinde LEfSe analizi. Yatay çubuklar, dikey noktalı çizgilerle gösterilen \log_{10} dönüştürülmüş LDA puanını temsil eder. HPV pozitif LSIL (kırmızı) HPV negatif NSIL (Yeşil), HPV pozitif LSIL (mavi); p—filum, c—sınıf, o—takım; f—aile, g—cins, s—tür



Şekil 4.22 HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında örneklerinde radyal filogenetik ağacın her bir halkasının farklı bir taksonomik seviye olduğunu gösteren bir kladogram. LEfSe analizi. Yatay çubuklar, dikey noktalı çizgilerle gösterilen log 10 dönüştürülmüş LDA puanını temsil eder. Kırmızı: HPV negatif NSIL, Mavi: HPV pozitif LSIL, Yeşil: HPV pozitif NSIL.

5.TARTIŞMA

Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran HPV pozitif ve HPV negatif hasta grupları ile gerçekleştirildi. Hastaların demografik özellikleri, muayene bulguları kaydedildi ve hastalardan servikal sitoloji numuneleri ve servikal mikrobiyota örnekleri alınarak analiz edildi. HPV pozitif ve HPV negatif gruplar arasındaki benzerlikler ve farklılıklar arasında karşılaştırma yapıldı. Çalışmaya dahil edilen 42 hastanın 21'inde HPV pozitif idi ve HPV pozitif grupta tüm hastalar yüksek riskli HPV idi. En sık HPV 16 ve HPV 18 saptanırken 11 hastada HPV 16/18 dışı yüksek riskli HPV tipleri HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67, 68 saptandı. HPV ilişkili enfeksiyonlar ve kanser, aşı ile korunulabilir hastalıklar olup, birçok ülkede HPV aşuları ile aşı tiplerine bağlı hastalıklarda ciddi azalma sağlanmıştır. Çalışmamızda hastalarda saptanan HPV tipleri gözden geçirildiğinde, dokuz değerli HPV aşularının büyük kısmını kapsadığı görüldü.

Çalışmamızda filum düzeyinde, HPV negatif ve HPV pozitif gruplarda Firmicutes filumu (%64.3 ve %52.8) en sık saptanırken Firmicutesi *Actinobacteria* ve *Bacteroidetes* filumları izlemekteydi. Cins düzeyinde, HPV negatif ve HPV pozitif gruplarda en sık *Lactobacillus* (%54.0 ve %35.3) saptanırken, HPV pozitif grupta *Prevotella* ve *Gardnerella* diye sıralanmakta idi. HPV negatif ve HPV pozitif gruplarda en sık *Lactobacillus iners* (%75.6 ve %62.2) saptandı. Üreme çağındaki kadınlarda vajinal mikrobiyota kompozisyonundaki *L. iners* baskınlığı, CST-III olarak tanımlanmakta olup, çalışmamızda olguların büyük bölümünün bu CST grubunda yer aldığı görüldü. Çalışmamızda cins düzeyinde HPV pozitif olgularda *Mycoplasma*, *Aerococcus*, *Gemella* ve *Actinomyces* baskın olarak saptanırken, tür düzeyinde *Mycoplasma_s*, *Aerococcus_s*, *Gemella_s*, *Actinomyces_s*, *Anaerococcus_s* ve *Bacteroides ovatus* baskın olarak saptandı. Bu durumda HPV pozitifliğinin mikrobiyota kompozisyonunda belirgin farklılığa neden olduğu görüldü. Gillet ve ark. (63) yaptığı çalışmada Laktobasillerin azalması ve anaerobik bakterilerin baskın hale gelmesiyle ortaya çıkan bakteriyel vajinosis ile HPV enfeksiyonu arasındaki ilişkiyi değerlendirdiği meta-analizinin sonucunda, BV ile servikal HPV enfeksiyonu arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiş.

Servikovajinal mikrobiyota ile HRHPV suşları arasında ilişkiyi gösteren çalışmalar bulunmaktadır ancak servikal mikrobiyotanın değerlendirdiği çalışmalar kısıtlıdır. Fang ve arkadaşları (54) HR-HPV enfeksiyonu olan 20 kadın ve HPV negatif 20 kadında servikal mikrobiyota kompozisyonun ve fonksiyonun farklı olduğu gösterilmiştir. HR-HPV enfeksiyonu olan kadınlarda, filum düzeyinde Firmicutes azalırken Actinobacteria arttığı gösterilmiştir (54). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde HPV pozitif olgularda Firmicutes azalırken, Actinobacteria'nın göreceli olarak arttığını saptadık. Gao ve ark. (62) normal servikal sitolojiye sahip toplam 70 sağlıklı kadın (32 HPV negatif ve 38 HPV pozitif) vajinal mikrobiyotasını karşılaştırmış. Özellikle *L. gallinarum* , *L. iners* ve *L. gasseri* olmak üzere *Lactobacillus* tüm kadınlarda baskın cins olarak tespit edilmiş. HPV pozitif ve HPV negatif kadınlar arasında *L. gallinarum* veya *L. iners*'in sıklığı açısından anlamlı bir fark bulunmazken, HPV pozitif grupta *L. gasseri* ve *Gardnerella vaginalis* yüksek bir sıklıkta bulunmuştur. Fang ve arkadaşları (54) HPV negatif olgularında, tür düzeyinde *Lactobacillus crispatus*, *L. jensenii* ve *L. Helveticus* olgularda baskın olarak bulunmuşlardır. Bizim çalışmamızda HPV pozitif ve HPV negatif grupta *L. iners* baskın olarak saptanmıştır. Özellikle çalışmalar arasında *Lactobacillus* suşları arasında normal popülasyonlar arasında farklılıklar gösterildiğinden, sonuçlar arasında farklılıklar görülebilmektedir. Zeng ve ark. (56) vaginal mikrobiyotanın HPV enfeksiyonu klirensi ve persistansında oynadığı rolü açığa çıkarmak için yaptıkları çalışmada HPV enfeksiyonu olan 90 hasta ile sağlıklı olan 45 hastayı karşılaştırmış ve sonuç olarak yüksek riskli HPV (Hr-HPV 16/18) enfeksiyonu olan hastaların, sağlıklı kontrolle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek alfa çeşitliliğine sahip olduğunu göstermişlerdir. HPV pozitif grupta dominant bakteri suşu bizim çalışmamızda olduğu gibi *Lactobacillus iners* (%54.4) olarak bulunmuştur. Persiste HPV enfeksiyonu olan hastalarda *Bacteroidaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Helicobacteraceae*, *Neisseriaceae*, *Streptococcaceae* (aile düzeyi) ve *Fusobacterium*, *Bacteroides* , *Neisseria* ve *Helicobacter* (cins düzeyi) düzeyleri HPV klirensi olan hastalara göre anlamlı derecede daha yüksek olarak saptanmıştır. Bir başka çalışmada ise servikal sitolojisi normal olan 70 sağlıklı kadını (32 HPV negatif ve 38 HPV pozitif) mikrobiyota kompozisyonu incelenmiştir. HPV ile enfekte kadınlarda *L. gasseri* ve *G. vaginalis* anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Bu çalışmaların her ikisi de kesitseldir ve HPV

enfeksiyonu ile vajinal/servikal mikrobiyota arası ilişkide net sonuç göstermemektedir. Mikrobiyom ile HPV enfeksiyonu arasındaki zamansal ilişkiyi inceleyen bir çalışmada ise 32 kadın, 16 hafta boyunca iki haftada bir seri olarak kendi vajinal sürüntü örneklerini toplamış ve çalışmanın sonucunda hastalarda saptanan CST ile remisyon şansı arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Laktobasillerin azalmış olduğu *CST IV* ile *L. Crispatus'un* baskın olduğu CST I gruplarını karşılaştırdıklarında HPV pozitifliğine geçiş oranları *CST IV* için daha yüksek bulunmuş ancak istatistiksel fark saptanmamıştır. *L. gasseri* baskın CST II ile *L. crispatus'un* baskın olduğu CST I karşılaştırıldığında, en hızlı HPV klirensi CST II’de izlenirken, en yavaş klirens CST IV’te gösterilmiştir. (55). Bizim çalışmamızda baskın suş *L. iners* olup, olgular CST-III grubundadır. CST III olgularında HPV klirensi ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Lee ve ark. (59) HPV ile enfekte veya enfekte olmayan 68 kadın ikizinin ve ailelerinin vajinal mikrobiyotasını değerlendirmişlerdir. HPV pozitif kadınların mikrobiyota sonuçlarının hem menopoz öncesi kadınlardan hem de HPV negatif ikizlerden alınan vajinal mikrobiyota sonuçlarına göre anlamlı derecede daha yüksek mikrobiyal çeşitliliğe ve daha düşük *Lactobacillus spp.* oranına sahip olduğunu göstermişlerdir. HPV enfeksiyonu, başta Fusobakteriler olmak üzere (özellikle *Sneathia spp*) daha yüksek olarak bulunmuştur. *Sneathia spp.* dahil olmak üzere Fusobakteriler, HPV enfeksiyonuyla ilişkili olası bir mikrobiyolojik belirteç olarak tanımlanmıştır. Bizim çalışmamızda da *Sneathia* cins düzeyinde %1.9 iken, HPV negatif grupta %1’in altında saptanmıştır ancak gruplar arasında istatistiksel fark saptanmamıştır.

Nieves-Ramirez ve arkadaşları (52) HPV pozitif 35 kadında; HPV enfeksiyonu ile SIL yokluğu arasındaki ilişkiyi mikrobiyota analizi ile değerlendirmişlerdir. SIL olan HPV pozitif numuneler ile SIL olmayan numuneler arasında alfa ve beta çeşitliliği açısından fark saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda HPV pozitif ve negatif olgular arasında da SIL olan ve olmayan olgularda da alfa ve beta çeşitliliği açısından fark saptanmamıştır. Vajinal ve servikal mikrobiyota, gayta mikrobiyotasına göre daha az çeşitlilikte bakteri cinsleri içerdiğinden, çalışmalarda genellikle alfa çeşitliliğinde fark saptanmamaktadır. Audirac-Chalifour ve ark. (53) yaptıkları çalışmada servikal mikrobiyota çeşitliliği ile serviks kanserinin her aşamasının histopatolojik tanısı

arasındaki ilişkiyi değerlendirmiştir. HPV negatif ve servikal lezyonu olmayan kadınlar ile skuamöz intraepitelyal lezyonları (SIL) ve serviks kanseri olanlar karşılaştırıldığında mikrobiyota çeşitliliğinde anlamlı bir fark bulunmuştur. Normal sitolojiye sahip kadınlarda baskın türler *L. crispatus* ve *L. iners* iken servikal intraepitelyal lezyonu olanlarda ise *Sneathia* spp. ve serviks kanseri için *Fusobacterium* spp. olarak gözlenmiş. Bu sonuçlar serviks mikrobiyotasının serviks kanseri patolojisinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Mitra ve ark. (57) 16S rRNA gen dizilme yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada LSIL, HSIL ve invaziv serviks kanseri olan kadınların vajinal mikrobiyotasını değerlendirmişlerdir. Yüksek tür çeşitliliği ve düşük *Lactobacillus* spp. seviyeleri ile karakterize edilen mikrobiyota kompozisyonunun HPV durumuna bakılmaksızın artan hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. HSIL'deki vajinal mikrobiyom, LSIL ile karşılaştırıldığında daha yüksek seviyelerde *Sneathia sanguinegens*, *Anaerococcus tetradius*, ve *Peptostreptococcus anaerobius* ve daha düşük *Lactobacillus jensenii* seviyeleri ile karakterize olduğu gösterilmiştir. Sonuçta, servikal intraepitelyal lezyonun şiddetinin artmasının, artan vajinal mikrobiyota çeşitliliği ile ilişkili olduğunu ve viral kalıcılığın ve hastalığın ilerlemesinin düzenlenmesinde rol oynayabileceğini gösterilmiştir. Çalışmalarda HPV pozitif ve SIL pozitif olan olgularda saptanan mikrobiyota değişimlerinin, HPV enfeksiyonuna mı bağlı, SIL lezyonuna mı bağlı olduğunu söylemek genelde güçtür (52). Ancak çalışmamızda NSIL olgularında HPV pozitif olgularda *Blautia obeum*, HPV negatif olgularda *Paracoccus marcusii* saptanması, HPV pozitifliğin mikrobiyota kompozisyonunda aynı patolojik durumda farklılığını göstermektedir ve belirleyicinin HPV enfeksiyonu olduğunu düşündürmektedir.

Kwasniewski ve ark. (58) 250 kadından servikal mikrobiyota analizini değerlendirdikleri çalışmada, sağlıklı olgular, LSIL, HSIL değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda sağlıklı kadınlardan alınan sürüntü örneklerinde *Lactobacillus crispatus*, *L. iners* ve *Lactobacillus taiwanensis* düzeylerinde artış olduğu gözlenmiş, ancak *Gardnerella vaginalis* ve *Lactobacillus acidophilus* izlenmemiş. LSIL hastalarının CST'sinde baskın bakteri türü *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus iners* olarak saptanmıştır. HSIL tanısı olan kadınların CST'sinde bol miktarda *Gardnerella vaginalis* ve *Lactobacillus acidophilus* saptanmıştır. Sağlıklı kadınlardan alınan numunelerin sonuçlarında ise *Lactobacillus acidophilus* bolluğu, LSIL'li kadınlar ile

benzer bulunmuştur. Bu çalışmanın bulguları, vajinal mikrobiyota ile HPV enfeksiyonu arasında olası bir etkileşimin yanı sıra bu etkileşim ile klinik servikal neoplazi arasındaki ilişkiyi de ortaya koymuş. *Gardnerella vaginalis*'in baskınlığı ve buna eşlik eden *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners* ve *Lactobacillus taiwanensis*'in azlığı ile karakterize edilen bakteriyel disbiyozun, servikal neoplazi gelişimi için HPV'ye bağımlı bir kofaktör olabileceği gösterilmiştir. Oh ve ark. (60) Kore'de CIN'li 70 kadının ve 50 sağlıklı kadınının servikal mikrobiyotası incelemesinde *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*'un baskınlığı ile karakterize edilen paternin CIN riski ile ilişkilendirmişlerdir. Bu durum, bakteriyel disbiyozun ve onun onkogenik HPV ile kombinasyonunun servikal neoplazi için bir risk faktörü olabileceğini düşündürmüştür. Sonuçta bu çalışma, *A. vaginae* , *G. vaginalis* ve *L. iners*'in baskınlığıyla karakterize edilen servikal mikrobiyal bileşimin, *L. crispatus*'un azlığıyla birlikte daha yüksek bir CIN riskiyle ilişkili olduğunu göstermiş. *A. vaginae*'nin baskınlığı bu riske önemli bir katkıda bulunmuştur. Piyathilake ve ark. (61) Hr-HPV ile enfekte olgularda servikal mikrobiyota ile yüksek dereceli servikal intraepitelyal neoplazi (CIN 2+) arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda servikal mikrobiyom çeşitliliği ile CIN şiddeti veya oksidatif DNA hasarı arasında bir ilişki gösterilememiş olsada *L. iners* baskınlığıyla karakterize edilen servikal bir mikrobiyomun, Hr-HPV ile enfekte kadınlarda CIN 2+ ile ilişkili olduğuna dair anlamlı kanıtlar sağlamış.

Hem HPV pozitif olgular hem HPV negatif olgularda farklı patolojik durumlarda mikrobiyota kompozisyonunu değerlendirme ve karşılaştırma olanağı bulduk. Servikal mikrobiyotanın kompozisyonu dışında değişen bakteriyel metabolik yollar ve metabolitlerin saptanması HR-HPV enfeksiyonunun patojenik mekanizmasının açıklığa kavuşturulmasına yardımcı olabilir (54).

Çalışmamızın kısıtlılığı konusunda HPV pozitif ve HPV negatif yeterli sayıda örnek almış olmamıza ve HPV pozitif grubumuzun tümü yüksek riskli HPV tipinde olmasına rağmen, HPV alt tiplerine göre mikrobiyota analizi yapabilmek için dengeli şekilde dağılmış yeterli sayıda örneğimiz yoktu. HPV pozitif olan grubu SIL gruplarına ayırarak karşılaştırmak üzere grupladığımızda aynı şekilde SIL grupları

içinde HPV alt tiplerine bağlı olarak karşılaştırma yapabilmek için yeterli sayıda örnek sayımız olmadı.

Önceki yapılmış olan çalışmalarda üreme çağındaki kadınların vaginal mikrobiyota analiz sonuçları 5 farklı CST grubunda sınıflandırılmış olup bizim çalışmamızda HPV pozitif ve negatif grupta ve alt gruplarda en sık *Lactobacillus iners* saptanmış ve kadınlarda vajinal mikrobiyota kompozisyonundaki *L. iners* baskınlığı, CST-III olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızda olguların çoğunluğunun CST-III grubunda yer alması üzerine önceki çalışmalarda yapılabildiği gibi HPV enfeksiyonuna bağlı olarak vaginal mikrobiyotanın baskın diğer CST grupları birbiri ile karşılaştırılmadı.

HPV pozitif ve HPV negatif gruplardaki tüm hastaların SIL durumları pap smear testi ile servikal sürüntü örneklerinin sitolojik değerlendirilmesi yapılarak tespit edildi ve hastaların SIL durumlarına göre alt gruplandırma yapıldı. Bilindiği üzere servikal lezyonların tespitinde servikal lezyonlardan alınan histopatolojik doku biyopsisi, pap smear testine göre daha üstün ve geçerli olarak kabul edilmektedir. Bu konuda öncelikle HPV pozitif ve HPV negatif grupları karşılaştırırken HPV negatif gruptaki hastaların tamamından servikal biyopsi alınarak histopatolojik değerlendirilme yapılması hem endikasyon dışı bir uygulama olarak görüldü hem de bu konuda etik kaygılar oluşacağından bu yöntem başvurulmadı. Hastaların servikal lezyon durumlarının histopatolojik doku biyopsisi ile tespiti yerine pap smear testi kullanılarak tespit edilmesi çalışmamızda göreceli olarak daha başarısız olarak alt gruplandırma yapılmasına yol açmış olabilir.

Çalışmamızda hastalardan alınan servikal sürüntü örnekleri ile hastaların servikal mikrobiyota kompozisyonları karşılaştırılmış olup çıkan sonuçlar hastaların o andaki mevcut kompozisyonlarının karşılaştırılmasıdır. Muhtemelen servikovajinal mikrobiyota zamansal olarak dinamiktir, hastaların kişisel hijyen alışkanlıkları, sigara ve alkol kullanımı, cinsel birliktelik sıklığı, kullandığı ilaçlar gibi pek çok iç ve dış etkenden etkilelenebilmektedir. Çalışmamız hastaların mevcut servikal mikrobiyota kompozisyonlarının öncesini ve sonrasını karşılaştırmak için uygun olmadığından hasta bazlı değişikliklerin yorumlanması yapılamamıştır. Gelecekte hastaların zaman

içinde farklı dönemlerde mikrobiyota değişikliklerinin değerlendirilebilmesi açısından uzunlamasına çalışmalar yapılmalıdır.

Her ne kadar HPV enfeksiyonu için risk faktörleri arasında birden fazla cinsel partner öyküsü, uzun süreli oral kontraseptif kullanımı, sigara ve alkol kullanımı, immün sistem yetmezliği olsa da bizim çalışmamızda hastalardan alınan bilgiler dikkate alındığında tüm hastalar içerisinde oral kontraseptif kullanımı olan toplamda 3 hasta, alkol tüketimi olan 11 hasta, sigara tüketimi olan 22 hasta bulunmaktaydı. İmmün yetmezliği olan hasta bulunmazken, birden fazla cinsel partner öyküsü olan hasta yoktu. Bu faktörler üzerinde dengeli bir dağılım olmadığından HPV enfeksiyonu ve risk faktörlerinin ileri yorumlaması yapılamamıştır.

HPV enfeksiyonu çoğu kadında özellikle ilk bir senede %70, takip eden ikinci senede ise %90 klirensе uğramaktadır. Önceki yapılmış olan çoğu çalışmada HPV pozitif grupların alt tipleri ve HPV pozitifliğinin tespiti üzerinden ne kadar süre geçtiği açıkça belirtilmemiş olup bizim çalışmamızda tüm hastaların pap smear sonuçları ve HPV sonuçları üzerinden en fazla 6 ay geçmiş olup, hastaların büyük çoğunluğunda HPV ve servikal mikrobiyota numuneleri eşzamanlı olarak toplanmış ve çalışılmıştır. Bu nedenle çalışmamızın hastaların servikal mikrobiyota kompozisyonları ile HPV ilişkisini başarılı bir şekilde gösterdiğini düşünmekteyiz.

Önceki çalışmaların bazılarında vaginal mikrobiyota tespitinde kültür bağımlı testler ya da bakteriyel vajinozis kliniğinin tanısında kullanılan Nugent skorlaması gibi görece başarısız yöntemler kullanılmış olup bizim çalışmamızda servikal mikrobiyota analizleri 16s RNA metagenomik analiz yöntemleri kullanılarak yapılmış olup mikrobiyota kompozisyonlarını objektif olarak yansıtmıştır.

Önceki çalışmaların büyük çoğunluğu vajinal mikrobiyota analizlerine dayanmakta iken bizim çalışmamızda numunelerin tamamı ektoservikal bölgeden alınmıştır. Her ne kadar vajinal mikrobiyota kompozisyonu ile servikal mikrobiyota kompozisyonu arasındaki farkları karşılaştıran çalışma sayısı yetersiz olsada öncelikli olarak HPV enfeksiyonu ve karsinogenezin servikal bölgede transformasyon zonunda gelişmesi göz önüne alındığında alınan numunenin servikal kompozisyonu en iyi şekilde temsil edebilmesi için servikal bölgeden alınması gerektiğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda servikal mikrobiyotanın, HPV pozitif ve negatif olgularda ve farklı patolojik evrelerde değiştiği gösterildi. Çalışmamızda serviks kanserinin gelişiminde anahtar rol oynayan HPV enfeksiyonunun servikal mikrobiyota ile olan ilişkisini gösterdik. Laktobasiller menapoz öncesi dönemde kadınların vajinal mikrobiyotalarına egemen olan tür olup, Laktobasillerin hakimiyetinden uzak polimikrobiyal bir ortamın varlığı HPV enfeksiyonunun kalıcılığında ve servikal intraepitelyal lezyonların ortaya çıkması ve sürecin servikal kansere ilerlemesi açısından önemlidir. Dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanserlerden biri olan serviks kanseri hastalar üzerinde ciddi mortalite ve morbiditeye neden olmakta olup serviks kanserinin önlenmesi ve tedavisinin yönetimi açısından HPV enfeksiyonu ile servikovajinal mikrobiyota arasındaki ilişkinin aydınlatılmasının potansiyel olarak ciddi bir klinik önemi vardır. Servikovajinal bakteri popülasyonunun virüsün kalıcılığında ve daha sonra servikal preinvazif hastalığın ortaya çıkmasında önemli bir rol oynadığını gösteren çok sayıda kanıt bulunmaktadır.

Mikrobiyomun servikal karsinogenezdeki etkisini değerlendiren gelecekteki çalışmalar, mikrobiyomun klinik sonuçla ve özellikle HPV enfeksiyonu ve servikal hastalığın ilerlemesi veya gerilemesi ile olan korelasyonunu değerlendirmeye olanak sağlayabilir. Bizim çalışmamızın sonucunda HPV negatif NSIL olgularında *Paracoccus marcusii* türü ve HPV pozitif LSIL olgularında aile düzeyinde *Actinomycetaceae* ve HPV pozitif NSIL olgularında *Blautia obeum* türü istatistiksel olarak anlamlı olarak saptanmış olduğundan gelecekteki çalışmalarda bu türler üzerine spesifik özellikle PCR çalışmaları yapılması anlamlı olacaktır.

Gelecek çalışmaların servikal mikrobiyotanın HPV enfeksiyonu ile ilişkisini gösterebilmek üzere mikrobiyota üyelerinin hangilerinin HPV enfeksiyonuna karşı muhtemel immün modülasyon ile immün sistem üzerindeki düzenleyici etkisi ve HPV'ye karşı konak savunmasına olan katkılarının araştırılması, aynı şekilde diğer mikrobiyota üyelerinin HPV enfeksiyonunun kalıcılığındaki etki mekanizmasını gösterebilmek adına immün sistem ile olan etkileşimin incelenmesi üzerine odaklanılması iyi olacaktır.

İleride HPV enfeksiyonu ve enfeksiyona bağlı servikal intraepitelyal lezyonların alternatif tedavi stratejileri üzerinde probiyotik kullanımı gibi

servikovajinal mikrobiyotaya yönelik girişimler gündeme gelebilecektir. Bu veriler HPV enfeksiyonunun anlaşılması açısından yeni bir yaklaşım getirmekte ve öncül bir çalışma olarak gelecek çalışmaların önünü açmaktadır. Bu nedenle bu konuda daha çok prospektif çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



6.SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmaya dahil edilen 42 hastanın 21'i HPV pozitif idi ve HPV pozitif grupta tüm hastalar yüksek riskli HPV idi. En sık HPV 16 ve HPV 18 saptanırken 11 hastada HPV 16/18 dışı yüksek riskli HPV tipleri HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67, 68 saptandı.
2. Çalışmada HPV pozitif olan olgular ve HPV negatif olgularda metagenomik analizler ile mikrobiyota kompozisyonu değerlendirildi.
3. Çalışmada alfa çeşitlilik parametreleri olan Chao1, Shannon, observed OTU ve Simpson indeklseri HPV pozitif ve negatif grup arasında farklılık saptanmadı (hepsi için $p>0.05$).
4. Çalışma örneklerinde Bray Curtis, Jaccard, UniFrac ve weighted UniFrac mesafelerinin temel koordinat analizi (PCoA) sonuçlarında, HPV pozitif ve HPV negatif örneklerin tür kompozisyonunun birbirinden farklı olmadığı saptadı ($p>0.05$).
5. Filum düzeyinde, HPV negatif ve HPV pozitif gruplarda Firmicutes filumu en sık saptanmıştır. HPV negatif grupta, filum düzeyinde *Firmicutes* (%64.3), *Actinobacteria* (%14.3), *Bacteroidetes* (%10.3), *Tenericutes* (%5.8) ve *Proteobacteria* (%3.9) diye sıralanırken; HPV pozitif grupta *Firmicutes* (%52.8), *Actinobacteria* (%21.7), *Bacteroidetes* (%20.3), *Fusobacteria* (%2.2), *Proteobacteria* (%1.2) şeklinde sıralanmaktaydı.
6. Cins düzeyinde, HPV negatif ve HPV pozitif gruplarda en sık *Lactobacillus* saptanmıştır. HPV negatif grupta *genus* düzeyinde *Lactobacillus* (%54.0), *Gardnerella* (%11.4), *Prevotella* (%8.4), *Oscillospira* (%3.4), *Gemmiger* (%3.1), *Faecalibacterium* (%2.5), *Bifidobacterium* (%2.1) diye sıralanırken; HPV pozitif grupta *Lactobacillus* (%35.3), *Prevotella* (%18.5), *Gardnerella* (%17.4), *Veillonella* (%4.4), *Bifidobacterium* (%2.2), *Sneathia* (%1.9) ve *Atopobium* (%1.9) şeklinde sıralanmaktaydı.
7. Tür düzeyinde, HPV negatif ve HPV pozitif gruplarda en sık *Lactobacillus iners* saptanmıştır. HPV negative grupta *tür* düzeyinde *Lactobacillus iners* (%75.6), *Gemmiger formicilis* (%5.6), *Faecalibacterium prausnitzii* (%4.5), *Bifidobacterium adolescentis* (%2.8), *Prevotella copri* (%2.5), *Akkermansia muciniphilia* (%1.6), *Atopobium vaginae* (%1.5) saptandı. HPV pozitif grupta

- ise tür düzeyinde *Lactobacillus iners* (%62.2), *Prevotella melaninogenica* (%8.6), *Prevotella copri* (%6.3), *Atopobium vaginae* (% 4.1), *Faecalibacterium prausnitzii* (%3.9), *Gemmiger formicilis* (%3.2), *Veillonella dispar* (%2.2), *Akkermansia muciniphilia* (%1.2) şeklinde sıralanmaktaydı.
8. HPV negatif olgularda aile düzeyinde *Rhizobiaceae* ($p<0.05$), HPV pozitif olgularda aile düzeyinde *Gemellaceae* ($p<0.01$) ve *Actinomycetaceae* ($p<0.01$) baskın olarak saptandı. Cins düzeyinde HPV negatif olgularda *Agrobacteria* ($p<0.05$) baskın olarak saptandı.
 9. HPV pozitif olgularda ise *Mycoplasma* ($p<0.01$), *Aerococcus* ($p<0.05$), *Gemella* ($p<0.01$), *Actinomyces* ($p<0.05$) baskın olarak saptandı. Tür düzeyinde HPV negatif olgularda *Agrobacterium vitis* ($p<0.05$) baskın olarak saptanırken HPV pozitif olgularda *Mycoplasma_s* ($p<0.01$), *Aerococcus_s* ($p<0.05$), *Gemella_s* ($p<0.01$), *Actinomyces_s* ($p<0.05$), *Anaerococcus_s* ($p<0.05$) ve *Bacteroides ovatus* ($p<0.05$) baskın olarak saptandı.
 10. Çalışmada alfa çeşitlilik parametreleri olan Chao1, Shannon, observed OTU ve Simpson indeksleri HPV negatif ASCUS, HPV negatif LSIL; HPV negatif NSIL, HPV pozitif HSIL, HPV pozitif LSIL ve HPV pozitif NSIL grupları arasında benzerdi (hepsi için $p>0.05$).
 11. Filum düzeyinde; **HPV negatif ASCUS grubunda** *Firmicutes* (%69.9), *Bacteroidetes* (%17.7), *Actinobacteria* (%9.9) ve *Proteobacteria* (%1.3) idi. **HPV negatif LSIL grubunda** *Firmicutes* (%53.1), *Actinobacteria* (%16.9), *Tenericutes* (%16.1), *Proteobacteria* (%6.9) ve *Bacteroidetes* (%6.4.) idi. HPV negatif NSIL grubunda *Firmicutes* (%70.8), *Actinobacteria* (%14.9), *Bacteroidetes* (%8.8) ve *Proteobacteria* (%2.9) idi.
 12. Filum düzeyinde HPV pozitif HSIL grubunda *Firmicutes* (%49.0), *Bacteroidetes* (%25.5), *Actinobacteria* (%20.3), *Fusobacteria* (%2.0) ve *Proteobacteria* (%1.0) olarak saptandı. **HPV pozitif LSIL grubunda** *Firmicutes* (%54.0), *Actinobacteria* (%27.0), *Bacteroidetes* (%15.6) ve *Proteobacteria* (%2.1) olarak saptandı. **HPV pozitif NSIL grubunda** *Firmicutes* (%56.7), *Bacteroidetes* (%18.0), *Actinobacteria* (%17.9), *Fusobacteria* (%4.5) ve *Tenericutes* (%1.3) olarak saptandı.

13. Cins düzeyinde, **HPV negatif ASCUS grubunda** *Lactobacillus* (%45.5), *Prevotella* (%10.3), *Gemmiger* (%10.1), *Gardnerella* (%6.2), *Faecalibacterium* (%6.1), *Oscillospira* (%5.6), *Chryseobacterium* (%5.3), *Saccharopolysopra* (%2.6) ve *Bacteroides* (%2.1) idi. **HPV negative LSIL grubunda** *Lactobacillus* (%61.5), *Gardnerella* (%18.5), *Prevotella* (%8.0), *Atopobium* (%1.8) idi. **HPV negative NSIL grubunda** *Lactobacillus* (%54.6), *Gardnerella* (%9.9), *Prevotella* (%7.3), *Oscillospira* (%4.4), *Bifidobacterium* (%4.1), *Veillonella* (%2.9) ve *Streptococcus* (%2.6) idi.
14. Cins düzeyinde HPV pozitif HSIL grubunda *Lactobacillus* (%35.4), *Prevotella* (%23.3), *Gardnerella* (%15.2), *Atopobium* (%4.2), *Megasphera* (%3.0), *Veillonella* (%2.2) ve *Sneathia* (%1.4) olarak saptandı. **HPV pozitif LSIL grubunda** *Lactobacillus* (%35.2), *Gardnerella* (%21.8), *Prevotella* (%13.0), *Bifidobacterium* (%4.3), *Veillonella* (%4.2), *Gemmiger* (%3.3), *Streptococcus* (%2.8) ve *Faecalibacterium* (%2.3) saptandı. **HPV pozitif NSIL grubunda** *Lactobacillus* (%35.1), *Prevotella* (%17.7), *Gardnerella* (%15.6), *Veillonella* (%7.7), *Sneathia* (%4.6), *Faecalibacterium* (%3.0) ve *Bifidobacterium* (%1.9) olarak saptandı.
15. Suş düzeyinde, **HPV negatif ASCUS grubunda** *Lactobacillus iners* (%69.4), *Gemmiger formicilis* (%15.8), *Faecalibacterium prausnitzii* (%9.5), *Akkermansia muciniphilia* (%1.2) olarak saptandı. **HPV negatif LSIL grubunda** *Lactobacillus iners* (%87.9), *Atopobium vaginae* (%3.3), *Faecalibacterium prausnitzii* (%1.3), *Prevotella copri* (%1.0) olarak saptandı. **HPV negatif NSIL grubunda** *Lactobacillus iners* (%69.5), *Bifidobacterium adolescentis* (%8.4), *Prevotella copri* (%5.6), *Akkermansia muciniphilia* (%3.2), *Faecalibacterium prausnitzii* (%2.4), *Atopobium vaginae* (%1.4) olarak saptandı.
16. Suş düzeyinde **HPV pozitif HSIL grubunda** *Lactobacillus iners* (%67.4), *Prevotella copri* (%11.5), *Atopobium vaginae* (%10.1), *Akkermansia muciniphilia* (%2.2), *Faecalibacterium prausnitzii* (%1.4), *Peptostreptococcus anaerobius* (%1.4) ve *Gemmiger formicilis* (%1.1) olarak saptandı. **HPV pozitif LSIL grubunda** *Lactobacillus iners* (%62.5), *Gemmiger formicilis* (%7.2), *Veillonella dispar* (%6.9), *Prevotella copri* (%5.3), *Faecalibacterium*

prausnitzii (%4.9), *Streptococcus anginosus* (%3.2) saptandı. **HPV pozitif NSIL grubunda**, *Lactobacillus iners* (%56.4), *Prevotella melaninogenica* (%24.7), *Faecalibacterium prausnitzii* (%5.5), *Gemmiger formicilis* (%1.9), *Prevotella copri* (%1.7), olarak saptandı.

17. HPV negatif NSIL olgularında *Paracoccus marcusii* ($p<0.05$) türü baskın olarak saptandı. HPV pozitif LSIL olgularında aile düzeyinde *Actinomycetaceae* ($p<0.05$) baskın olarak saptanırken, HPV pozitif NSIL olgularında cins düzeyinde *Parabacteroides* ($p<0.05$), tür düzeyinde ise *Blautia obeum* ($p<0.05$), *Parabacteroides_s* ($p<0.05$) ve *Peptostreptococcus_s* ($p<0.01$) baskın olarak saptandı.

18. Çalışmamızda serviks kanserinin gelişiminde anahtar rol oynayan HPV enfeksiyonunun servikal mikrobiyota ile olan ilişkisini gösterdik. Dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanserlerden biri olan serviks kanseri hastalar üzerinde ciddi mortalite ve morbiditeye neden olmakta olup serviks kanserinin önlenmesi ve tedavisinin yönetimi açısından HPV enfeksiyonu ile servikovajinal mikrobiyota arasındaki ilişkinin aydınlatılmasının potansiyel olarak ciddi bir klinik önemi vardır. İleride HPV enfeksiyonu ve enfeksiyona bağlı servikal intraepitelyal lezyonların alternatif tedavi stratejileri üzerinde servikovajinal mikrobiyotaya yönelik girişimler gündeme gelebilecektir.

KAYNAKLAR

1. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, vd. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* Eylül 1999;189(1):12-9.
2. Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, de Sanjose S, Hammouda D, vd. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer.* 20 Ağustos 2004;111(2):278-85.
3. Moscicki AB. Human papilloma virus, papanicolaou smears, and the college female. *Pediatr Clin North Am.* Şubat 2005;52(1):163-77, ix.
4. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome.* 2015;3:31.
5. Mitra A, MacIntyre DA, Marchesi JR, Lee YS, Bennett PR, Kyrgiou M. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? *Microbiome.* 01 Kasım 2016;4(1):58.
6. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell.* 28 Ocak 2016;164(3):337-40.
7. Zhou X, Hansmann MA, Davis CC, Suzuki H, Brown CJ, Schütte U, vd. The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Mart 2010;58(2):169-81.
8. Biruni Laboratuvarı [İnternet]. 2015 [a.yer 24 Aralık 2023]. VAGINAL AKINTILARA KLİNİK VE LABORATUVAR YAKLAŞIMI. Erişim adresi: <https://biruni.com.tr/e-kutuphane/bilimsel-bultenler/vaginal-akintilara-klinik-ve-laboratuvar-yaklasimi/>
9. Boris S, Barbés C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and Infection.* 01 Nisan 2000;2(5):543-6.

- 10.Kero K, Rautava J, Syrjänen K, Grenman S, Syrjänen S. Association of asymptomatic bacterial vaginosis with persistence of female genital human papillomavirus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Kasım 2017;36(11):2215-9.
- 11.Gao W, Weng J, Gao Y, Chen X. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 10 Haziran 2013;13:271.
- 12.Berek, J.S., Berek&Novak'sGynecology_14ed.pdf.
- 13.Asetik asit (VIA) ve Lugol solüsyonu (VILI) ile gözle muayenenin anatomik ve patolojik temeli [İnternet]. [a.yer 17 Eylül 2023]. Erişim adresi: <https://screening.iarc.fr/viavilichap1.php?lang=6>
- 14.Ferenczy A. *Anatomy and Histology of the Cervix*. İçinde: Blaustein A, editör. *Pathology of the Female Genital Tract*. New York, NY: Springer; 1977. s. 102-23.
- 15.Deng H, Mondal S, Sur S, Woodworth CD. Establishment and Optimization of Epithelial Cell Cultures from Human Ectocervix, Transformation Zone and Endocervix. *J Cell Physiol*. Haziran 2019;234(6):7683-94.
- 16.Deng H, Hillpot E, Mondal S, Khurana KK, Woodworth CD. HPV16-Immortalized Cells from Human Transformation Zone and Endocervix are More Dysplastic than Ectocervical Cells in Organotypic Culture. *Sci Rep*. 18 Ekim 2018;8:15402.
- 17.Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri: 2021 update. *Int J Gynaecol Obstet*. Ekim 2021;155(Suppl 1):28-44.
- 18.Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. Nisan 2002;55(4):244-65.
- 19.Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Désy M, vd. *Epidemiology of Acquisition and Clearance of Cervical Human Papillomavirus*

- Infection in Women from a High-Risk Area for Cervical Cancer. *The Journal of Infectious Diseases*. 01 Kasım 1999;180(5):1415-23.
- 20.Kamal M. Pap Smear Collection and Preparation: Key Points. *Cytojournal*. 29 Mart 2022;19:24.
- 21.Pangarkar MA. The Bethesda System for reporting cervical cytology. *Cytojournal*. 30 Nisan 2022;19:28.
- 22.Waxman AG, Chelmow D, Darragh TM, Lawson H, Moscicki AB. Revised Terminology for Cervical Histopathology and Its Implications for Management of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix. *Obstet Gynecol*. Aralık 2012;120(6):1465-71.
- 23.Mayer C, Mahdy H. Abnormal Papanicolaou Smear. İçinde: *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023*.
- 24.Santella B, Schettino MT, Franci G, De Franciscis P, Colacurci N, Schiattarella A, vd. Microbiota and HPV: The role of viral infection on vaginal microbiota. *J Med Virol*. Eylül 2022;94(9):4478-84.
- 25.Taşkıran Ç, Güner H. Serviks kanseri epidemiyolojisi ve Human Papilloma Virüs. *Uzmanlık Sonrası Eğitim ve Güncel Gelişmeler Dergisi*. 2007;4(1):11-9.
26. Riemer AB, Keskin DB, Zhang G, Handley M, Anderson KS, Brusica V, vd. A Conserved E7-derived Cytotoxic T Lymphocyte Epitope Expressed on Human Papillomavirus 16-transformed HLA-A2+ Epithelial Cancers. *J Biol Chem*. 17 Eylül 2010;285(38):29608-22.
- 27.Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, vd. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*. 20 Kasım 2012;30:F55-70.
- 28.Wang X, Huang X, Zhang Y. Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer. *Front Microbiol*. 28 Kasım 2018;9:2896.

29. Avcı GA, Bozdayı G. Human Papillomavirus. *Kafkas Journal of Medical Sciences*. 01 Kasım 2013;(3):136-44.
30. Molijn A, Kleter B, Quint W, Doorn LJ van. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*. 01 Mart 2005;32:43-51.
31. OKUNADE KS. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *J Obstet Gynaecol*. Temmuz 2020;40(5):602-8.
32. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. 01 Eylül 2008;110(3, Supplement 2):S4-7.
33. Lederberg J, McCray AT. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words.
34. Cénit MC, Matzaraki V, Tigchelaar EF, Zhernakova A. Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 01 Ekim 2014;1842(10):1981-92.
35. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, vd. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 Mart 2011;108(Suppl 1):4680-7.
36. Farage M, Maibach H. Lifetime changes in the vulva and vagina. *Arch Gynecol Obstet*. 01 Ocak 2006;273(4):195-202.
37. Onywera H, Williamson AL, Mbulawa ZZA, Coetzee D, Meiring TL. The cervical microbiota in reproductive-age South African women with and without human papillomavirus infection. *Papillomavirus Res*. 13 Nisan 2019;7:154-63.
38. Koumans EH, Sternberg M, Bruce C, McQuillan G, Kendrick J, Sutton M, vd. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sex Transm Dis*. Kasım 2007;34(11):864-9.

39. Fettweis JM, Brooks JP, Serrano MG, Sheth NU, Girerd PH, Edwards DJ, vd. Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. *Microbiology (Reading)*. Ekim 2014;160(Pt 10):2272-82.
40. Zheng J, Gänzle MG, Lin XB, Ruan L, Sun M. Diversity and dynamics of bacteriocins from human microbiome. *Environ Microbiol*. Haziran 2015;17(6):2133-43.
41. Smith SB, Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J Physiol*. 15 Ocak 2017;595(2):451-63.
42. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UME, Zhong X, vd. Temporal Dynamics of the Human Vaginal Microbiota. *Sci Transl Med*. 02 Mayıs 2012;4(132):132ra52.
43. Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome*. 12 Nisan 2013;1:12.
44. Martin HL Jr, Richardson BA, Nyange PM, Lavreys L, Hillier SL, Chohan B, vd. Vaginal Lactobacilli, Microbial Flora, and Risk of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Sexually Transmitted Disease Acquisition. *The Journal of Infectious Diseases*. 01 Aralık 1999;180(6):1863-8.
45. Hill GB. The microbiology of bacterial vaginosis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 01 Ağustos 1993;169(2):450-4.
46. Guo YL, You K, Qiao J, Zhao Y m, Geng L. Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. *Int J STD AIDS*. Ağustos 2012;23(8):581-4.
47. Peters N, Van Leeuwen AM, Pieters WJ, Hollema H, Quint WG, Burger MP. Bacterial vaginosis is not important in the etiology of cervical neoplasia: a survey on women with dyskaryotic smears. *Sex Transm Dis*. 1995;22(5):296-302.
48. Borgdorff H, Gautam R, Armstrong SD, Xia D, Ndayisaba GF, Teijlingen NH van, vd. Cervicovaginal microbiome dysbiosis is associated with proteome

- changes related to alterations of the cervicovaginal mucosal barrier. *Mucosal Immunology*. 01 Mayıs 2016;9(3):621-33.
49. Stoyancheva G, Marzotto M, Dellaglio F, Torriani S. Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains. *Arch Microbiol*. 01 Eylül 2014;196(9):645-53.
50. Witkin SS, Mendes-Soares H, Linhares IM, Jayaram A, Ledger WJ, Forney LJ. Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections. *mBio*. 06 Ağustos 2013;4(4):e00460-13.
51. Lin D, Kouzy R, Abi Jaoude J, Noticewala SS, Delgado Medrano AY, Klopp AH, vd. Microbiome factors in HPV-driven carcinogenesis and cancers. *PLoS Pathog*. 04 Haziran 2020;16(6):e1008524.
52. Nieves-Ramírez ME, Partida-Rodríguez O, Moran P, Serrano-Vázquez A, Pérez-Juárez H, Pérez-Rodríguez ME, vd. Cervical Squamous Intraepithelial Lesions Are Associated with Differences in the Vaginal Microbiota of Mexican Women. *Microbiol Spectr*. 9(2):e00143-21.
53. Audirac-Chalifour A, Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Téllez-Sosa J, Martínez-Barnette J, Cortina-Ceballos B, vd. Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. *PLoS One*. 26 Nisan 2016;11(4):e0153274.
54. Fang B, Li Q, Wan Z, OuYang Z, Zhang Q. Exploring the Association Between Cervical Microbiota and HR-HPV Infection Based on 16S rRNA Gene and Metagenomic Sequencing. *Front Cell Infect Microbiol*. 21 Haziran 2022;12:922554.
55. Kyrgiou M, Mitra A, Moscicki AB. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? *Transl Res*. Ocak 2017;179:168-82.

56. Zeng M, Li X, Jiao X, Cai X, Yao F, Xu S, vd. Roles of vaginal flora in human papillomavirus infection, virus persistence and clearance. *Front Cell Infect Microbiol.* 04 Ocak 2023;12:1036869.
57. Mitra A, MacIntyre DA, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, Lehne B, vd. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep.* 17 Kasım 2015;5:16865.
58. Kwasniewski W, Wolun-Cholewa M, Kotarski J, Warchol W, Kuzma D, Kwasniewska A, vd. Microbiota dysbiosis is associated with HPV-induced cervical carcinogenesis. *Oncol Lett.* Aralık 2018;16(6):7035-47.
59. Lee JE, Lee S, Lee H, Song YM, Lee K, Han MJ, vd. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. *PLoS One.* 2013;8(5):e63514.
60. Oh HY, Kim BS, Seo SS, Kong JS, Lee JK, Park SY, vd. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. *Clinical Microbiology and Infection.* 01 Temmuz 2015;21(7):674.e1-674.e9.
61. Piyathilake CJ, Ollberding NJ, Kumar R, Macaluso M, Alvarez RD, Morrow CD. Cervical Microbiota Associated with Higher Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Infected with High-Risk Human Papillomaviruses. *Cancer Prev Res (Phila).* Mayıs 2016;9(5):357-66.
62. Gao W, Weng J, Gao Y, Chen X. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 10 Haziran 2013;13:271.
63. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, vd. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 11 Ocak 2011;11:10.

