

Spontan abortus ve istemli gebelik tahliyesi olgularında desiduada T lenfosit subgrupları ve uterin doğal öldürücü hücre sayılarının immunohistokimyasal yöntem ile karşılaştırılması

An immunohistochemical staining study for comparison of the T lymphocyte subgroups and the uterine natural killer cells in the decidua from spontaneous abortions and voluntary pregnancy terminations

Semir Köse¹  Serap Karaarslan Takmaz³  Murat Ulukuş²  Osman Zekioğlu³  Hüseyin Yılmaz² 

¹Buca Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Perinatoloji, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, İzmir, Türkiye

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji AD, İzmir, Türkiye

Öz

Amaç: Desiduada T lenfositlerin toplam sayılarının, sitotoksik (Ts) ve helper (Th) alt gruplarının ve uterin naturel killer (uNK) hücre sayılarının abortuslar ve tekrarlayan gebelik kayıplarının (TGK) patogenezindeki rolünün araştırılması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Ocak 2003- Ocak 2005 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğinde gebelik tahliyesi yapılmış ve küretaj materyallerine ait parafin blokları elde edilen abortus (n:29) ve sağlıklı kontrol olarak isteğe bağlı gebelik tahliyeleri (n:10) olguları çalışmaya dahil edildi. Tüm T lenfositler için ortak belirteç CD3, Th için CD4, Ts için CD8 ve uNK hücreleri için CD56 belirteçleri ile seçici immunohistokimyasal boyama sağlandı ve her preparat için 10 alanda hücreler sayıldı.

Bulgular: Medyan CD3+ T lenfosit toplam hücre sayıları kontrol grubunda 314 (210-489), inkomplet abortus grubunda 560 (183-1602) ve missed abortus grubunda ise 426 (154-1102) idi (p: 0.117). Medyan CD4+ Th hücre sayıları kontrol grubunda 143 (87-203), inkomplet abortus grubunda 236 (77-735) ve missed abortus grubunda ise 236 (76-677) idi (p: 0.441). Medyan CD8+ Ts hücre sayıları kontrol grubunda 179 (105-279), inkomplet abortus grubunda 239 (90-820) ve missed abortus grubunda 197 (84-560) idi (p:0.530). Medyan CD56+ uNK hücre sayıları kontrol grubunda 634 (554-1390), inkomplet abortus grubunda 714 (653-2165) ve missed abortus grubunda 712 (306-2108) idi (p:0.099).

Sonuç: Abortuslar ve TGK heterojen gruplardır ve farklı patogeneze sahip olgulardan oluşmaktadır. Bir alt grupta immün mekanizmalar nedensel rol oynuyor olabilir. Öncelikle karyotip analizi ile kategorize edilmiş gruplarda daha güncel metodlarla (akış sitometri, gen ekspresyon ve reseptör aktivasyon analizleri) yapılacak ileri çalışmalar abortuslarda immün sistem elemanlarının karmaşık rolünün aydınlatılması için gerekli görünmektedir.

Anahtar Sözcükler: Abortus, desidua, tekrarlayan gebelik kayıpları, T lenfositler, uterin doğal öldürücü hücreler.

Öz

Aim: To investigate the role of the decidual total T lymphocyte count, T cytotoxic (Tc) and T helper (Th) sub-populations and the uterin natural killer (uNK) cells in the pathogenesis of the spontaneous abortions (SA) and recurrent pregnancy loss (RPL) cases.

Materials and Methods: We included the SA (n:29) and the voluntary pregnancy termination (n:10) cases which were undergone suction curettage between January 2003-January 2005 at the Ege University Obstetrics and Gynecology Department and their paraffin blocks were obtained.

Results: Median CD3+ T lymphocyte cell counts were not different between the control (314; 210-489), incomplete abortions (560;183-1602) and missed abortions (426;154-1102) groups (p:0.117). Median CD4+ Th cell counts were not different between the control (143; 87-203), incomplete abortions (236;77-735) and missed abortions (236;76-677) groups (p:0.441). Median CD8+ Ts cell counts were not different between the control (179; 105-279), incomplete abortions (239;90-820) and missed abortions (197;84-560) groups (p:0.530). Median CD56+ uNK cell counts were not different between the control (634; 554-1390), incomplete abortions (714;653-2165) and missed abortions (712;306-2108) groups (p:0.099).

Yazışma Adresi: Semir Köse

Buca Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Perinatoloji Kliniği,
İzmir, Türkiye

E-mail: semirkose@yahoo.com

Makalenin Geliş Tarihi: 15.09.2018 Kabul Tarihi: 21.11.2018

Conclusion: Abortions and RPL are heterogeneous groups consisting of cases representing various pathogenetic origins. Aberrant immune mechanisms could be responsible for a subgroup if not in all cases. Further studies designed by classifying the cases karyotypically and utilizing more sophisticated methods (such as flow cytometry, gene expression and receptor activation analyses) are needed to elucidate the complicated role of the immune system elements in the spontaneous abortion cases.

Keywords: Abortion, decidua, recurrent pregnancy loss, T lymphocytes, uterine natural killer cells.

Giriş

Fetus bir semiallojenik grefttir (1,2). Kromozomal yapısının yarısı anneye yarısı babaya ait olduğundan, maternal immün sistem tarafından yabancı bir antijen olarak algılanıp rejeksiyona uğraması beklenirken fetus miada kadar korunarak başarılı bir doğum gerçekleşir (2,3).

Spontan abortuslar, gebeliğin en sık rastlanan komplikasyonudur (4). Nedensel ilişkileri ve mekanizmaları bütünüyle ortaya konulamamakla birlikte olguların yarıya yakınında kromozomal anomaliler sorumlu tutulurken (4,5) diğer yarısı halen karanlıkta durmaktadır. Son yıllarda abortusların önemli bir bölümünün immünolojik mekanizmalardaki problemler neticesinde ortaya çıktığı ve endokrinolojik faktörlerin temelde immünolojik yapı ile paralel seyrettiği ve entegre olduğu konusunda veriler birikmiştir. Endokrin ve immün sistemler desiduaı beraberce düzenler, desidua hücre gruplarını belirler ve desidua aslında immün-endokrin sistem bütününe bir aynasıdır (6,7,8,9). Desidua immün sistem elemanlarının varlığı, düzeyi ve alt grupların kendi içindeki oranları gebeliğin yapılandırılmasının ve devamının teminatı olabileceği gibi gebeliğin sonlanmasına yol açan tepkimeler serisini başlatan ya da ilerleten zemin de olabilir.

Bazı araştırmacılar, geç sekretuar faz ve erken gebelik döneminde sayılarının giderek azalmasından dolayı T lenfositlerin gebelik sırasında önemli bir role sahip olamayacaklarını savunmuşlardır (10). Ayrıca, aslında sağlıklı kadınlarda menstrüel siklus boyunca endometriumda veya ilk trimesterde desidua T lenfosit subpopulasyonlarının önemli bir değişikliğe uğramadığı da savunulmuştur (10). Tam tersine, diğer bir grup araştırmacı T hücrelerinin erken gebelik döneminde çok önemli olduğunu ve sayılarının %10 düzeyinde arttığını bildirmiştir (11,12).

Habitüel abortus (HA) öyküsü olan olgularda yapılan prospektif bir çalışmada, sonraki gebeliğinde de abortus oluşan grupta, sağlıklı fertil kadınlar ve HA öyküsü olan ancak sonraki gebeliğinde canlı doğum yapan olgu grubu ile karşılaştırıldığında endometriumda T hücre grupları anlamlı olarak daha yüksek düzeylerde saptanmıştır (13,14).

Uterin Doğal Öldürücü (uterine natural killer; UNK) hücreler, periferik kan doğal öldürücü hücrelerinden, cluster of differentiation (CD) 56 (+), CD 16(-) ve CD3(-) şeklindeki sıradışı antijenik fenotipleri ile ayrılırlar (15).

Erken gebelikte plasental hücreler maternal arterlerin içine akmaya başladığında ortaya çıkarlar (16). Desiduaada yoğun miktardadırlar, ekstrasvillöz trofoblast hücrelerini infiltre ederler ve ilk trimesterde baskın stromal lökosit populasyonudur (17). UNK hücreleri ile plasental trofoblastlar arasındaki bu geçici ve yakın ilişki UNK hücrelerinin gebelik sonuçları üzerinde belirleyici etkileri olduğunu düşündürür (18). UNK hücre sayısı, fenotipi veya fonksiyonu reproduktif sonuçları etkileyebilir (18).

Bu çalışmada hem sağlıklı kontrollerde hem de spontan erken gebelik kayıpları olgularında desiduaada immün sistem elemanlarının dağılımı immunhistokimya yöntemi ile belirlenerek, immün mekanizmaların rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Immunhistokimyasal boyama yöntemi ile aranan hücrelerin seçici olarak belirlenmesi yarı niceliksel bir değerlendirme yapmaya imkan vermektedir.

Desiduaada bulunan helper (yardımcı) T lenfositlerin, sitotoksik T lenfositlerin ve UNK hücrelerinin mutlak sayılarının yanısıra helper / sitotoksik dengesinin abortuslarla ilişkili olabileceği çalışmamızın sınınan temel hipotezidir.

Gereç ve Yöntem

Olgu Seçimi

Ocak 2003- Ocak 2005 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran abortus inkompletus (n=15), missed abortus (n=14) ve istemli gebelik tahliyesi (n=10, kontrol grubu) olguları çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya, gebe yaşı 18-41 aralığında, gebelik yaşı son adet tarihine göre 7-16. gebelik haftaları arasında ve abortus meydana gelmeden önce fetal kalp atımları pozitif olarak izlenmiş olan olgular dahil edilmiştir. Ülkemizde istemli gebelik tahliyesinde yasal sınırın 10 hafta olması nedeniyle kontrol grubu, 6-10. gebelik haftaları arasındaki olgulardan seçilmiştir.

Abortuslarla ilişkili olabilecek bilinen herhangi bir anatomik bozukluğu olan hastalar (submüköz myom, endometrial polip, uterin anomali, servikal yetmezlik, rahim içi araç vs.), abortuslarla ilişkili olabilecek herhangi bir ilaç kullanımı (prostaglandin analogları, kombine OKS, postkoital kontrasepsiyon preparatları vs.), intrauterin enfeksiyon varlığı ve septik abortuslar, Rh uyuşmazlığı olanlar ve blighted ovum – anembriyonik gebelik olguları çalışmadan dışlanmıştır.

İncelenecek Doku Örneğinin Hazırlanması

Üniversitemiz Patoloji Anabilim Dalı arşivinden çalışma ve kontrol grubuna ait olguların küretaj materyallerinin parafin blokları elde edilerek, desiduanın (kompakta) yoğun olduğu, villus yapısının daha az yer aldığı, nekroz ve inflamasyon sahalarının yer almadığı ya da minimal düzeyde olduğu kesitler immünohistokimyasal (İHK) boyama için seçildi.

Bu olguların %10'luk formalinde fikse parafine gömülü bloklarından her bir hücre grubu için birer adet olmak üzere birbirinin eşdeğeri olarak hazırlanan 0.3 µm kalınlıktaki 4'er kesit poli-L-lizin kaplı lamalara alınarak İHK boyama için oda ısısında en az 24 saat bekletildi. İHK boyama için CD3, CD4, CD8 ve CD56 proteinlerine karşı geliştirilmiş primer fare monoklonal antikoları (predilüe, NovaCastra) kullanılarak avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile İHK boyama uygulandı. Tüm primer antikolar için pozitif kontrol olarak tonsil dokusu İHK olarak boyandı.

İHK basamakları; kesitler 20 dakika ksilolde bekletilerek deparafinize edildi ve inen alkol serilerinden (%96, %90, %80, %70) geçirilerek rehidrate edildi. Daha sonra %3'lük H₂O₂ 10 dakika uygulanarak endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Kesitler pH'ı 8.0 olan 1mM lık EDTA tampon solüsyonu içerisinde özel kaplara yerleştirilerek mikrodalga fırında 3 kez 5 dakika süre ile kaynatıldı. Böylece epitoplara açığa çıkması sağlandı (antijen retrieval). Kesitler 15-20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı ve PBS (phosphate-buffer solution) solüsyonunda (pH:7.2) 10 dakika soğumaya bırakıldı. Daha sonra tüm kesitlere oda ısısında 10 dakika süre ile blocking antikor (tüm kesitlere aynı, isim, firma, titre) uygulanıp, direkt olarak 45 dakika süreyle primer antikolar (CD3, CD8 ve CD56 için Novacastra, CD56 için Neomarkers) uygulandı.

Daha sonra kesitler 15 dakika süre ile PBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikolar (HRP polymer&DAB plus chromogen) 20 dakika süreyle uygulandı. Streptavidin-peroksidaz solüsyonu kesitler üzerine damlatılarak 10 dakika bekletildi. Kesitler 10 dakika süre ile PBS solüsyonunda yıkanıp, kromojen olarak 3-3' Diaminobenzidintetraklorür (DAKO, Denmark) solüsyonu kesitler üzerine damlatıldı, kahverengi renklenme gözlenene dek bekledi. Daha sonra kesitler çeşme suyunda yıkandı. Tüm kesitler zıt boyanma sağlamak için Mayer Hematoksilin'de 2 dakika süre ile bekletildi.

Daha sonra kesitler çeşme suyunda yıkandıktan sonra, çıkan alkol serilerinden geçirilerek (%70, %80, %90, %96, izopropil alkol, izopropil alkol + ksilol) ksilolde 10 dakika süre bekletilerek, son aşamada entellan (Merck) damlatılarak lamel ile kapatıldı.

İmmünreaktivitenin Değerlendirilmesi ve Hücre Sayımı

Kesitler öncelikle küçük büyütme (x10) alanlarında incelenerek, villus içermeyen, desidua kompaktanın yoğun olduğu, nekroz ve inflamasyon izlenmeyen alanlar seçildi ve preparatın optimum boyanma gösteren alanları belirlendi. Ardından büyük büyütme (x40) ile her preparat için 10 alanda hücre sayımı yapıldı. Aranılan hücreler zemindeki desidual hücrelerin Mayer's hematoksilen ile mavi boyanmasına zıt olarak kahverengi boyanma göstermekte idi.

Desiduada hücrelerin oldukça heterojen dağılım göstermesi nedeniyle sayımlar 10 alanda uygulandı, böylece seçilen alanların preparatın genelini yansıtabilmesi sağlandı. Her olgu için 10 alanda elde edilen sayılar kaydedildi.

İstatistiksel Analiz

Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel ve analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov/ Shapiro Wilk testleri) ile değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler normal dağılım gösteren değişkenler için ortalama ve standard sapmalar, normal dağılım göstermeyen değişkenler için ortanca ve minimum-maksimum değerleri seçilerek sunuldu. Veriler, normal dağılım göstermediği için non parametrik testlerle değerlendirildi. Frekans karşılaştırmaları için Fisher-Exact ve Ki-kare testleri uygulandı.

İkiden çok grupta normal dağılım göstermeyen sayısal değişkenlerin farkı Kruskal Wallis test ile mukayese edildi. Eşleştirilmiş örneklerin medyan değerleri arasındaki farklar Wilcoxon'un sıra testi ile karşılaştırıldı. Abortus gruplarının birleştirilmesi sonrasında hücre sayıları normal dağılım göstermediğinden grupların ortanca değerleri nonparametrik yöntemlerden Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS yazılımı kullanılarak yapıldı. p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Demografik analiz sonuçları

Abortus ve istemli gebelik tahliyesi olguları demografik özellikleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermekte idi. Sağlıklı kontrollerde yaş ortalaması anlamlı olarak daha yüksek idi; p:0.048 (Tablo-1). Parite farklılıkları da istatistiksel anlamlılığa sahip idi; isteğe bağlı tahliye olgularında paröz olgu oranı %90 iken bu oran abortus grubunda inkomplet abortus olgularında %46.7, missed abortus olgularında ise %35.7 idi (Tablo -1).

Tablo-1. Abortus ve Kontrol Olgularının Temel Demografik Özellikleri.

Olgu karakteristiği	İnkomplet abortuslar (n:15)	Missed abortuslar (n:14)	İsteğe bağlı gebelik tahliyeleri (n:10)	*p
Gebe yaşı (yıl) Median (min-max)	26 (18-41)	29 (19-39)	33 (29-41)	0.048
Parite	Nonparöz	8	9	0.048
	Paröz	7	5	
Tahliye günü gebelik yaşı (gün) Median (min-max)	62 (44-85)	78 (63-105)	63 (54-69)	0.001

Normal dağılım göstermeyen sayısal veriler ikiden fazla grupta Kruskal Wallis testi ile karşılaştırılmıştır. *p anlamlılık düzeyi: <0.05.

İmmunohistokimyasal bulguların analizi

İHK ile seçici olarak boyanan hücrelerin sayımında 10 alanda elde edilen toplam rakamlar kriter alınarak, tüm T lenfositler (CD3+), T helper (CD4+), T sitotoksik (CD8+) ve UNK hücre grupları her bir grupta ortalamalar alınarak değerlendirildi. İlk göze çarpan özellik olarak hücre sayılarında büyük bir dağılım aralığı mevcuttu ve standart sapma belirgin olarak yüksek idi. Kontrol grubunda CD3+ ortalama hücre sayısı 324±89 idi. CD3+ hücre sayıları geniş bir değişkenlik (210-489) göstermekte idi (Tablo-2). Yine kontrol grubunda UNK hücre analizinde ortalama hücre sayısı 716±242 olmakla birlikte dağılım aralığı 554-1390 idi (Tablo-2).

Desiduadaki toplam T lenfositlerini ifade eden CD3+ hücre ortalama sayıları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı; p:0.117 (Tablo-2). Desiduadaki T helper lenfositlerin ortalama sayıları açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p:0.441). CD8+ hücrelerin gruplar arasındaki karşılaştırması da anlamlı değildi (0.530). UNK hücrelerinin ortalama sayıları arasındaki farklılıklar da istatistiksel olarak anlamlı değildi; p:0.099 (Tablo-2).

Missed ve inkomplet abortus olgu grupları birleştirilerek çalışıldığında da CD3+ T lenfosit (482'ye karşı 314; p:0.142), CD4+ T lenfosit (236'ya karşı 143; p: 0.232), CD8+ T lenfosit (202'ye karşı 179; p: 0.272) ve CD 56+ UNK (502'ye karşılık 554; p:0.112) hücre sayılarının ortanca değerleri kontrol gruptaki ortanca değerlerden istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi.

CD4+/CD8+ oranının karşılaştırılması

CD 4+ lenfositlerin CD 8+ lenfositlere sayıca baskın olduğu olguların oranı, kontrol grubunda 3/10, inkomplet abortus olgularında 7/15 ve missed abortus grubunda ise 6/14 idi; p:0.411(Tablo-2). Kontrol grubunda 10 olgunun 7'sinde sitotoksik T lenfositler sayıca fazla idi.

Habitüel abortus olgularında CD4/CD8 oranının ve uNK hücre sayılarının analizi

Bir altgrup olarak HA olgularında (n:11), CD4/CD8 oranının CD8+ (sitotoksik) lenfositler lehine bozulması 7/11 olguda mevcuttu. Ancak bu farklılık ta istatistiksel olarak anlamlı değildi (p:0,424). HA olgularında,

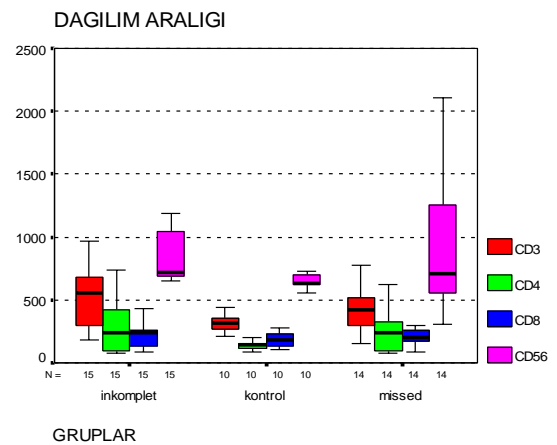
desiduada UNK hücre sayıları ortalaması 877 idi. Bu değer, kontrol olgularında saptanan (716) ortalamadan daha yüksek idi. Ancak bu fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,231).

Tartışma

Desidua, maternal ve fetal iletişimin ve etkileşimin yaşandığı ve gebeliğin yapılandırılmasında görevli hücre ve sitokinlerin tümünün faaliyet gösterdikleri bir zemindir (19). Desidua, içerdiği hücre grupları ile implantasyon, plasentasyon ve fetal gelişimde kritik öneme sahiptir (20). Uzun yıllardan beri desidual hücre bileşenleri incelenmektedir ve üzerinde en çok çalışılan gruplar ise T lenfositler ve UNK hücreleridir (19). T lenfositler, ilk trimester insan desiduasında %20 oran ile en yoğun 3. lökosit grubunu oluşturur (10). T lenfositlerinin implantasyon zemininde konakçı savunmasında rol aldıkları, sitokin üretimine katkıda buldukları ve lokal supressör hücreler olarak aktivite gösterebildikleri düşünülmüştür (21).

Bu çalışmada CD3+ T lenfosit toplam sayısı, CD4+Thelper, CD8+Tsitotoksik alt grup hücre sayıları ve UNK hücre sayıları isteğe bağlı tahliyeler ile abortus olguları arasında istatistiksel anlamlı düzeyde farklılık göstermedi (Tablo-2). Bu bulgular literatürde yer alan diğer parafin kesit çalışmaları ile uyumludur (21).

Olgu sayısının kısıtlılığı, hücre sayısındaki küçük farklılıkların çok ciddi aktivite farklılığı ile birlikte olabilmesi ve bu hücrelerin daha alt gruplarının (Thelper-1 ve Thelper-2 başta olmak üzere) olması istatistiksel anlamlılığa ulaşamayan farklılığın olası açıklamalarıdır. Abortus olgularında hücre sayısındaki yüksek değişkenlik ve standart deviasyonların yüksek olması (Şekil-1) çalışmanın temel hipotezi olan immün aracılı mekanizmanın tüm abortuslarda olmasa da bir alt grupta etkin olduğunu düşündürmeye devam etmiştir.



Şekil-1. Desiduada immün sisteme ait hücre sayılarının gruplardaki dağılım aralığı

Spontan abortus olgularında UNK hücre değerlendirmeleri bilgi vermeyebilir, zira progesteron

düzeyindeki azalma UNK hücrelerinde apoptozisi tetikleyerek UNK hücre sayısını azaltabilir (22). Ayrıca spontan abortus olgularında gelişen nekroz ve inflamasyon UNK analizlerinin yorumunu bozabilir (23). Çalışmamızda UNK hücre sayıları sağlıklı kontroller ve abortuslar arasında anlamlı farklılıkta saptanmamıştır (Tablo-2). Yine de, UNK hücrelerinin reproduktif başarı üzerine önemli etkileri olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur.

Deneysel birçok bulguya dayanarak gebeliğin bir Thelper-2 fenomeni olduğu konseptini ilk olarak ileri süren Wegmann idi (24). Gebelik sırasında tip 1 sitokin üretiminden uzaklaşmak gebeliğin devamlılığı açısından kazançlıdır (25), zira tip 1 sitokinler (özellikle İnterferon- γ ve Tümör nekrozis faktör- α) gebeliğe zararlı etkilere sahiptir (25), embriyonik ve fetal gelişimi baskılayabilir (26) ve farelere enjekte edildiklerinde gebeliği sonlandırdıkları gösterilmiştir (26). Özellikle insan gebeliklerinin üçüncü trimesterinde periferik T lenfositlerin tip1/ tip2 sitokin üretim oranı gebe olmayan kadınlara göre azalmıştır (27). Ancak bu durumun azalmış tip 1 sitokin üretimine mi yoksa artmış tip 2 sitokin üretimine mi bağlı olduğu konusunda fikir birliği oluşmamıştır. Gebeliğin devamı açısından tip 2 immün yanıt yönüne bir kaymanın hayati olduğu gerçeği, açıklanamayan tekrarlayan spontan abortuslarda, komplikasyonsuz term gebeliklerle karşılaştırıldığında tip 1 sitokin üretiminde dominans saptanması ile örtüşmektedir (28).

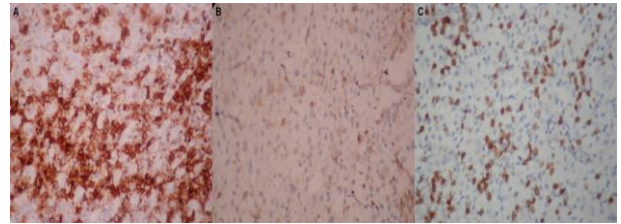
Gebe kadınlarda UNK hücreler embriyotoksik olarak görünmektedir ve hatta bir çalışmada bir IVF popülasyonunda maternal periferik NK hücrelerinin oranı %18'in üzerinde olduğunda hiçbir canlı doğum olmaması çok ilgi çekicidir (29). Üstelik spontan abortus öyküsü olan kadınlarda T lenfositlerin ve NK hücrelerin embriyotoksik olduğu *in vitro* olarak gösterilmiştir (30).

Dikkate değer olarak, normalde endometriumda bulunan UNK hücrelerin sayısı erken gebelik boyunca belirgin olarak artar (31). UNK hücrelerin desiduada bulunması iki mekanizma ile açıklanabilir. Periferik kanda bulunan NK hücreler seçici olarak uterin mukozaya yuvalanır, çünkü UNK hücreler desidual kan damarlarındaki adhezyon molekülleri ile etkileşebilmektedir (31). İkinci bir mekanizma UNK hücrelerin bölünerek insitu proliferasyonudur (31). UNK hücrelerin proliferasyonu desidual hücrelerce üretilen sitokinler ve steroid hormonlar ile uyarılabilir (32).

Her ne kadar UNK hücreler desiduada büyük miktarlarda bulunsalar da, semiallojenik nonvillöz sitotroblastlara saldırmamaktadır. Bu durum UNK hücrelerin inhibitör reseptörleri eksprese etmesine bağlanmaktadır. Bu reseptörler trofoblastlar üzerinde Major Histocompatibility Complex (MHC) Ia ve b'ye bağlanır.

UNK hücrelerin implantasyon ve plasentasyondaki etkileri normal ve komplikasyonlu gebeliklerde sayı ve aktivitelerini karşılaştıran çok sayıda çalışma ile ortaya konulmuştur. UNK hücrelerin sayısı implantasyon öncesi endometriumda tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) öyküsü olan olgularda daha yüksek düzeylerde bulunmuştur (13). Diğer taraftan, anormal karyotipe sahip fetüsler içeren gebeliklerde, normal fetüsleri taşıyan gebeliklere kıyasla desiduada UNK hücre sayısı azalmıştır (33). Uterin NK hücreler tubal gebeliklerde bulunmamaktadır. Yine UNK hücrelerin implantasyon ve plasentasyondaki rolleri ile uyumlu olarak konsepsiyon öncesi yüksek UNK aktivitesi abortuslar ile ilişkili bulunmuştur (34).

Birçok çalışmada TGK olgularında hem gebelik öncesinde hem de gebelik sırasında periferik kanda CD56+ NK hücrelerin arttığı, sağlıklı fertil gebe olan ve olmayan kadınlarla mukayese edilerek gösterilmiştir (34). Periferik kan CD56+ hücrelerin gebelik öncesi ve erken gebelik dönemindeki sayısı TGK olgularında gebelik prognozunu öngörebilmektedir (35). İlk trimesterde CD56+ hücre aktivitesinin azaldığı normal fertil kadınların tersine, TGK olgularında CD56+ NK hücre aktivitesi yüksek kalmaktadır (36). Yüksek CD56 aktivitesinin yalnızca kromozomal olarak normal fetusa sahip TGK olgularında izlenmesi, yüksek sayıda CD56+ hücre varlığının sonuç olmaktan ziyade bizzat bir neden olduğunu gösterir (37). Yine de literatür bu konuda tamamen net değildir. Karyotipik olarak normal ve anormal fetus içeren abortus vakalarında periferik kanda CD56+ hücrelerde herhangi bir farklılık gözlemeyen çalışmalar da mevcuttur (33,38). Her ne kadar habitüel abortus olgularında subjektif olarak desiduada bir UNK hücre yoğunlaşması izlenimi doğmuş olsa da (Resim-1), çalışmamızda UNK hücre sayıları sağlıklı kontroller ve abortuslar arasında anlamlı farklılıkta saptanmadı (Tablo-2).



Resim-1. A: Habitüel abortus olgusu, 15. gebelik haftasında 3. abortus sürecinde CD56+ NK hücrelerin desiduayı neredeyse tamamen kaplayan dağılımı görülmektedir. B: Habitüel abortus olgusu, 10. gebelik haftasında 3. abortus sürecinde CD4+ Thelper lenfositlerin görece az sayıda olması ve seyrek dağılımı görülmektedir. C: Gebeliğin 7. haftasında 2. abortus sürecinde CD8+ T sitotoksik lenfositlerin yoğunluğu dikkat çekmektedir.

Tablo-2. Abortus ve Kontrol Olgularında Desiduada T Lenfosit ve Uterin Doğal Öldürücü Hücre Sayılarının ve CD4+/CD8+ Lenfosit Oranlarının Karşılaştırılması

	İnkomplet abortuslar (n:15) Median (minimum-maksimum)	Missed abortuslar (n:14) Median (minimum-maksimum)	İsteğe bağlı gebelik tahliyeleri (n:10) Median (minimum-maksimum)	p*
CD3+Total T lenfosit sayıları	560 (183-1602)	426 (154-1102)	314 (210-489)	0.117
CD4+ T helper sayıları	236 (77-735)	236 (76-677)	143 (87-203)	0.441
CD8+ T sitotoksik sayıları	239 (90-820)	197 (84-560)	179 (105-279)	0.530
CD 56+ Uterin doğal öldürücü sayıları	714 (653-2165)	712 (306-2108)	634 (554-1390)	0.099
CD4+/CD8+ T lenfosit >1 olguların oranı	7/15	6/14	3/10	0.411

Normal dağılım göstermeyen sayısal veriler ikiden fazla grupta Kruskal Wallis testi ile karşılaştırılmıştır. *p anlamlılık düzeyi: <0.05.

Periferik kandaki tablonun tersine, spontan düşükler ve istemli gebelik tahliyeleri ile karşılaştırıldığında, TGK olgularında desiduada CD56+ NK hücreler sayıca azalmıştır (38). İki ayrı İHK çalışmasında TGK olgularında gebelik dışı dönemde endometriumda CD56+ hücrelerin arttığı (14,39) gösterilmiştir. Daha sonraki gebeliklerinde canlı doğum yapan TGK olgularında ise endometriumda CD56+ hücrelerin daha az sayıda olduğu gözlenmiştir (40). CD56+ hücreler periferik kandaki hücrelerin %10'dan azını oluşturur ve bu hücrelerin sayısındaki değişiklik total hücre aktivitesini çok fazla değiştiremez. Ancak endometrium ve desiduadaki NK hücrelerin azalması temel hücre grubu olmalarından dolayı hayati sonuçlar doğurabilir.

Desiduadaki ikinci büyük lökosit grubu CD3+ T hücreleridir. Çalışmalar TGK olguları ve normal fertil kadınlarda, gebelik öncesinde periferik kanda CD3+ hücre sayısında farklılık bulunmadığını ortaya koymuştur (36). Gebelik desiduasında CD3+ T hücreleri, TGK olguları ve normal fertil kadınlarda benzer sayılarda bulunmuştur (35,41). Spontan erken gebelik kayıpları ve istemli gebelik tahliyelerinde de desiduada CD3+ hücreler farklı sayıda bulunmamıştır (42).

Ancak CD3 pozitifliği T hücrelerinin tümünü yansıtır. Halbuki kritik olan, CD3+ hücrelerin alt grupları olan CD4+ ve CD8+ hücrelerin arasındaki oran ve dengedir.

Her ne kadar total T hücre sayısı benzer olarak görünse de T hücre subpopulasyonlarının durumu daha önemli görünmektedir. İki çalışma CD4+/CD8+ oranının TGK olgularında yükselme eğiliminde olduğunu göstermiştir (30,40). CD4+ T helper hücrelerin bazı HA olgularında sayı olarak oldukça az oldukları saptansa da (Resim 2) bu fark gruplar arasında istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (Tablo-2).

CD8+ Sitotoksik T hücrelerinin durumu da çelişkilidir. Bazı abortus olgularında CD8+ T sitotoksik lenfositler görece yoğun olarak saptansa da (Resim 3) sağlıklı kontrol gebeliklerde de 7/10 olguda CD8+sitotoksik lenfositler sayıca fazla bulunmuştur. Nitekim bu bulgulara benzer

olarak normal gebeliklerde CD8+ hücrelerin CD4+ hücrelere sayıca baskın olduğunu bildiren yayınlar da mevcuttur (42). Vassiliadou ve Bulmer, hem akış sitometri hem de parafin kesitlerde immunhistokimya ile, iki farklı yöntem kullanarak yaptıkları değerlendirmelerde, normal gebelik ve spontan abortus olgularında CD4+ ve CD8+ hücre gruplarını benzer düzeylerde saptamış ve bu hücrelerin abortus etyolojisinde muhtemelen nedensel rol oynamadıkları sonucuna varmışlardır (19).

Bir diğer önemli husus, UNK hücrelerin alt gruplarının ve reseptör aktivasyon düzeylerinin çalışmamızda incelenmemiş olmasıdır. Güncel literatür incelendiğinde, desiduada NK hücre ve T lenfositlerin artık reseptörler düzeyinde çalışıldığı görülecektir (8). Bu açıdan bakıldığında çalışmamız daha konvansiyonel yöntemlerle yürütülmüştür ve sonuçları itibarıyla de yarı niceliksel bulgular verebilmiştir.

Michimata ve ark.'ları parafin bloklarda yaptıkları benzer bir çalışmada alt grupları incelemiş ve normal kromozomal yapıdaki TGK olgularında T helper-2 ve T sitotoksik-2 alt gruplarının implantasyon bölgesinde azalmış olduğunu bildirmişlerdir (43).

Ancak desiduada, doku düzeyinde çalışmanın ve immunhistokimya yöntemi kullanmanın da bazı üstünlükleri olduğu bilinmektedir. Hücrelerin dağılım paterninin ortaya konabilmesi, villusların ekarte edilebilmesi ve desidua kompaktanın seçilerek spongioza tabakasının sonuçları etkilemesinin önlenmesi kullanılan yöntemin önemli avantajlarıdır.

Bu çalışmanın, olgu sayısındaki kısıtlılık dışında önemli bir diğer eksikliği karyotip tayininin olmayışıdır. Kromozomal analizler sonrası olguların karyotipi normal ve anormal abortuslar şeklinde kategorize edilmesi bu konudaki çalışmalarda artık standart hale gelmiştir.

Bu çalışmanın en önemli gözlemi, abortusların heterojen bir grup olduğu ve tümünde olmasa da bir alt grubunda immun mekanizmaların nedensel rol oynayabileceğidir.

Kaynaklar

1. Medawar PD. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. Symposium of the Society for Experimental Biology 1953: p. 320.
2. Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod Update* 2003;9(4):347-57.
3. Piccinni MP, Romagnani S. Regulation of fetal allograft survival by a hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines. *Immunol Res* 1996;15(2):141-50.
4. Clark DA, Coulam CB, Daya S, Chaouat G. Unexplained sporadic and recurrent miscarriage in the new millennium: a critical analysis of immune mechanisms and treatments. *Hum Reprod Update* 2001;7(5):501-11.
5. Burgoyne PS, Holland K, Stephens R. Incidence of numerical chromosome anomalies in human pregnancy estimation from induced and spontaneous abortion data. *Hum Reprod* 1991;6(4):555-65.
6. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 2000;6(1):28-36.
7. Blalock JE, Harbour-McMenamin D, Smith EM. Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems. *J Immunol* 1985;135(Suppl 2):858-861.
8. Henderson TA, Saunders PT, Moffett-King A, Groome NP, Critchley HO. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(1):440-9.
9. Dosiou C, Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev* 2005;26(1):44-62.
10. Vassiliadou N, Bulmer JN. Quantitative analysis of T lymphocyte subsets in pregnant and nonpregnant human endometrium. *Biol Reprod* 1996;55(5):1017-1022.
11. Mincheva-Nilsson L, Baranov V, Yeung MM-Y, et al. Immunomorphologic studies of human decidua associated lymphoid cells in normal early pregnancy. *J Immunol* 1994;152(4):2020-2032.
12. Morii T, Nishikawa K, Saito S, et al. T cell receptors are expressed but down-regulated on intradecidual T lymphocytes. *Am J Reprod Immunol* 1993;29(1):1-4.
13. Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, And Roy DC. Endometrial T, B and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. *J Immunol* 1996;156(10):4027-4034.
14. Quenby S, Bates M, Doig T, et al. Preimplantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1999;14(9):2386-2391.
15. King A, Balendran N, Wooding P, et al. CD3- leukocytes present in the human uterus during early pre-embryonic development: phenotypic and morphologic characterization of the CD56+ population. *Dev Immunol* 1991;1(3):169-190.
16. Bulmer JN, Johnson PM, and Bulmer D. Leukocyte populations in human decidua and endometrium. In: Gill TJ and Wegmann TG. (eds). *Immunoregulation and Fetal Survival*. New York: Oxford University Press; 1987:111-134.
17. Vassiliadou N, Bulmer JN. Immunohistochemical evidence for increased numbers of 'classic' CD57+ natural killer cells in the endometrium of women suffering spontaneous early pregnancy loss. *Hum Reprod* 1996;11(7):1569-1574.
18. King A, Loke YW. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol Today* 1991;12(12):432-435.
19. Liu S, Diao L, Huang C, Li Y, Zeng Y, Kwak-Kim JYH. The role of decidual immune cells on human pregnancy. *J Reprod Immunol* 2017; 124:44-53.
20. Mori M, Bogdan A, Balassa T, Csabai T, Szekeres-Bartho J. The decidua-the maternal bed embracing the embryo-maintains the pregnancy. *Semin Immunopathol* 2016;38(6):635-649.
21. Vassiliadou N, Bulmer JN. Characterization of endometrial T lymphocyte subpopulations in spontaneous early pregnancy loss. *Hum Reprod* 1998;13(1):44-47.
22. Chao K-H, Yang Y-S, Ho H-N, et al. Decidual natural killer cytotoxicity decreased in normal pregnancy but not in embryonic pregnancy and recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1995;34(5):274-280.
23. King A, Burrows T, Verma S, et al. Human uterine lymphocytes. *Hum Reprod Update* 1998;4(5):480-485.
24. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14(7):353-356.
25. Sykes L, MacIntyre DA, Yap XJ, Teoh TG, Bennett PR. The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflamm* 2012; 2012: 967629.
26. Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M, Wegmann TG. Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Fertil* 1990;89(2):447-458.
27. Sabahi F, Rola-Pleszczynski M, O'Connell S, Frenkel LD. Qualitative and quantitative analysis of T lymphocytes during normal human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1995;33(5):381-393.
28. Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Al Azemi MM, Hassan NA, Bandar A. Mitogen-induced cytokine responses of maternal peripheral blood lymphocytes indicate a differential Th-type bias in normal pregnancy and pregnancy failure. *Am J Reprod Immunol* 1999;42(5):273-281.
29. Beer AE, Kwak JY, Ruiz JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol* 1996;35(4):376-382.
30. Polgar K, and Hill JA. Identification of the white blood cell populations responsible for Th1 immunity to trophoblast and the timing of the response in women with recurrent pregnancy loss. *Gynecol Obstet Invest* 2002;53(1):59-64.
31. Pace D, Morrison L, Bulmer JN. Proliferative activity in endometrial stromal granulocytes throughout menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Pathol* 1989;42(1):35-39.
32. Ferry BL, Starkey PM, Sargent IL, Watt GM, Jackson M, Redman CW. Cell populations in the human early pregnancy decidua: natural killer activity and response to interleukin-2 of CD56-positive large granular lymphocytes. *Immunology* 1990;70(4):446-452.
33. Yamamoto T, Takahashi Y, Kase N, Mori H. Role of decidual natural killer (NK) cells in patients with missed abortion: differences between cases with normal and abnormal chromosome. *Clin Exp Immunol* 1999;116(3):449-452.

34. Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, Gleicher N. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 1995;345(8961):1340-1342.
35. Emmer PM, Nelen WL, Steegers EA, et al. Peripheral natural killer cytotoxicity and CD56+CD16+ cells increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000;15(5):1163-1169.
36. Kwak JYH, Beaman KD, Gilman-Sachs A, et al. Upregulated expression of CD56+, CD56+/16+ ve CD19+ in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol* 1995;34(2):93-99.
37. Yamada H, Kato HE, Kobashi G, et al. High NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol* 2001;46(2):132-136.
38. Yamamoto T, Takahashi Y, Kase N, Mori H. Proportion of CD56+3+ T cells in decidual and peripheral lymphocytes of normal pregnancy and spontaneous abortion with and without history of recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol* 1999;42(6):355-360.
39. Clifford K, Flanagan AM, Regan L. Endometrial natural killer Immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. *Hum Reprod* 1999;14(11):2727-2730.
40. Quenby S, Vince G, Farquharson R, Aplin J. Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? *Hum Reprod* 2002;17(8):1959-1963.
41. Quack KC, Vassiliadou N, Pudney J, Anderson DJ, Hill JA. Leukocyte activation in the decidua of chromosomally normal and abnormal fetuses from women with recurrent abortion. *Hum Reprod* 2001;16(5):949-955.
42. Shimada S, Kato EH, Morikawa M, Iwabuchi K, Nishida R, Kishi R, Onoé K, Minakami H, Yamada H. No difference in natural killer or natural killer T-cell population, but aberrant T-helper cell population in the endometrium of women with repeated miscarriage. *Hum Reprod* 2004;19(4):1018-1024.
43. Michimata T, Sakai M, Miyazaki S, Ogasawara MS, Suzumori K, Aoki K, Nagata K, Saito S. Decrease of T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites occurs in unexplained recurrent spontaneous abortion with normal chromosomal content. *Hum Reprod* 2003;18(7):1523-1528.