

İlk Trimester Gebelik Kaybında Uterus Doğal Öldürücü Hücrelerinin Rolü

Role of Uterine Natural Killer Cells in Early Pregnancy Loss

Serdar AYDIN,^a
Çağrı ARIOĞLU AYDIN,^b
Halil SAYGILI^c

^aKadın Hastalıkları ve Doğum AD,
Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi
Tıp Fakültesi,

^bKadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği,
Liv Hospital Ulus,

^cKadın Hastalıkları ve Doğum AD,
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 26.01.2015
Kabul Tarihi/Accepted: 05.06.2015

Yazışma Adresi/Correspondence:
Serdar AYDIN
Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Kadın Hastalıkları ve Doğum AD,
İstanbul,
TÜRKİYE/TURKEY
serdariks@yahoo.com

ÖZET Amaç: Erken gebelik kayıplarının nedenlerini araştırmak için spontan düşüklerde ve istemli ilk trimester gebelik sonlandırılmalarında desidual lenfositlerdeki doğal öldürücü [Natural Killer (NK)] hücrelerin oranını akım sitometri kullanarak karşılaştırmaktır. **Gereç ve Yöntemler:** Klinik ve ultrasonografik olarak normal kabul edilen 5-10 gebelik haftası arasındaki 15 kadından ve 6-11 gebelik haftası arasında spontan düşüğü olan 19 kadından gebelik desiduası toplandı. Antikor işaretleme: Desidual lenfositler "fluorescein isothiocyanate (FITC)"-konjuge anti-CD16 MoAb, "phycoerythrin (PE)" konjuge anti-CD56 antikor ve PerCP-konjuge anti-CD3 antikor ile işaretlendi. Akım sitometri: Antikor işaretli hücreler FACS Caliber akım sitometri ile analiz edildi. Üç renkli akım sitometride 488nm de 15 mW argon lazer kullanıldı. **Bulgular:** Ortalama gebelik haftaları; spontan düşük grubunda 8,3 (6-11), normal gebelik grubunda ise 7,7 (5-10) olarak saptandı. CD56⁺ NK hücre yüzdesi normal gebelik grubunda %51,1 (34,5-65,2) spontan düşük grubunda ise %53,3 (32,1-72,2) olarak saptandı (p>0,05). CD56⁺16⁻ NK hücre yüzdesi spontan düşük grubunda %47,4 (32,1-60,8) bulunmuş iken, normal gebelik grubunda %48,2 (24,2-68,3) olarak bulundu (p>0,05). Spontan düşük grubunda ise CD56⁺16⁺ NK hücre yüzdesi %5,1 (2,1-8,9), normal gebelik grubunda CD56⁺16⁺ NK hücre yüzdesi %5,6 (2,1-10,3) olarak bulundu (p>0,05). Normal gebelik grubunda CD56⁺16³⁻ NK hücre yüzdesi ise %44,7 (22,2-64,3) olarak bulundu (p>0,05). **Sonuç:** Spontan düşük ve normal gebelik grupları CD56⁺, CD56⁺16⁺, CD56⁺16³⁻ NK hücre yüzdesi açısından kıyaslandığında bu iki grup arasında anlamlı fark bulunamadı. Ancak, NK hücre aktivitesi ve immün yanıtın oluşmasına yardım eden diğer hücrelerle ilişkisi araştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Katil hücreler, doğal; abortus, spontan; antijenler, CD56

ABSTRACT Objective: To evaluate the decidual Natural Killer (NK) cell percentage with of the elective early pregnancy terminations with spontaneous abortions flow cytometry analysis. **Material and Methods:** Desidua were taken from the 19 spontaneous abortions and 15 early pregnancy terminations within 6-11 week of gestation and 5-10 weeks of gestation respectively. Decidual lymphocytes were labelled with 20 mL of FITC-conjugated anti-CD16 MoAb, PE-conjugated anti-CD56 antibody and PerCP-conjugated anti-CD3 antibody. Antibody-labelled cells were analysed by flow cytometry using FACS Caliber. Three-colourflow cytometry utilized an argon laser with 15 mW at 488 nm excitation. **Results:** Median gestation ages were 8.3 (6-11) weeks for abortion group and 7.7 (5-10) weeks for normal pregnancy group. The decidual CD56⁺ NK cell percentage in normal pregnancy group is 51.1% (34.5-65.2) and in abortion group is 53.3% (32.1-72.2) (p>0.05). CD56⁺16⁻ NK cell percentage in the abortion group is 47.4% (32.1-60.8) and the in the abortion group is 48.2% (24.2-68.3) (p>0.05). The decidual CD56⁺16⁺ NK cell percentage is 5.1% (2.1-8.9) in the abortion group and 5.6% (2.1-10.3) in normal pregnancies (p>0.05). The decidual CD56⁺16³⁻ NK cell percentage in the normal pregnancy group is 44.7% (22.2-64.3) (p>0.05). **Conclusion:** There is no significant difference between comparisons of the decidual CD56⁺, CD56⁺16⁺, CD56⁺16³⁻ NK cell percentages in the spontaneous abortion group and normal pregnancy group. However the NK cell activity and relations between other regulatory cells must be evaluated.

Key Words: Killer cells, natural; abortion, spontaneous; antigens, CD56

doi: 10.5336/gynobstet.2015-43663

Copyright © 2015 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst 2015;25(3):153-9

Erken, sporadik gebelik kayıpları sık karşılaşılan jinekolojik problemlerden biridir. Gebelikte en sık karşılaşılan komplikasyon olduğu bilinmektedir. Gebelik kayıplarının büyük bir kısmı ilk trimester içinde yaşanmaktadır. Bu oran ilk trimesterden sonra hızla düşmektedir.¹ Günümüz koşullarında erken gebelik kaybına yol açan nedenleri saptayabilmek her zaman mümkün olamamaktadır. Spontan gebelik kayıplarına neden olan maternal faktörler arasında uterin anomaliler, endokrin faktörler, enfeksiyonlar ve immünolojik faktörler sayılabilir.² Tekrarlayan gebelik kayıplarının %20-50'sinin immünolojik nedenlere bağlı olduğu düşünülmektedir.³ Bu durum dikkatleri immün sistem üzerine çekmiştir.

Reprodüktif siklusun değişik fazlarında endometriyal ve desidual dokular değişik immün ve inflamatuvar hücreler içermektedir.⁴ Menstrüel siklusun erken proliferatif fazında endometriyumun ana lökositleri T-hücreleri iken, gebelik oluşmuşsa bu T hücrelerinin sayısı giderek azalmaktadır.⁵ Makrofajlar da menstrüel siklusun tüm fazlarında endometriyal dokuda bulunan hücrelerdir.⁶ Makrofajlar en çok geç sekretuar endometriyum ve erken gebelik desiduasında bulunmaktadır. Ancak, geç sekretuar endometriyumun ve ilk trimester gebelik desiduasının majör hücreleri doğal öldürücü [Natural Killer (NK)] hücrelerdir.⁷ NK hücreleri, T- ve B- hücrelerinden olmayan büyük granüllü lenfositlerdir. CD16 ve 56 ekspres eder, ancak CD3 ekspres etmez. NK hücrelerinin fonksiyonu; virüs ile enfekte hücrelerin direkt yok edilmesi ve sitokin üretimi ile enfeksiyona hızlı, fakat özgül olmayan bir yanıt oluşturmaktır.⁸

Periferik kandaki lökositlerin %10'unu NK hücreleri oluşturmaktadır. Kan NK hücreleri CD56 ve CD16 yüzey işaretleyici ekspresyonuna göre iki ana gruba ayrılmaktadır. Periferik kan NK hücrelerinin yaklaşık %90'ı düşük seviyelerde CD56 ekspres ederken CD16 pozitifdir. Bu hücreler CD56^{dim}CD16⁺ olarak tanımlanmaktadır. Geri kalan %10 yüksek seviyede CD56 ekspres ederken, CD16 negatifdir. Bu grup ise CD56^{bright}CD16⁻ olarak adlandırılmaktadır. Bu iki grup farklı fonksiyon göstermektedir. CD56^{dim} hücreler daha sitotoksik iken killer immünglobulin-benzeri reseptör (KIR) eks-

prese ederler. Aksine CD^{bright} alt grup düşük sitotoksik aktiviteye sahip olup, KIR ekspres etmezler ve CD56^{dim} gruptan daha fazla CD96/NKG2 ekspres eder. Ayrıca daha fazla yüksek afiniteli interkolin (IL)-2 reseptörü ekspres eder ve yüksek interferon-gama (IFN- γ), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), granülosit-koloni stimulan faktör (CSF), IL-10, IL-3 seviyelerine sahiptir.⁹ CD56^{bright} NK hücrelerinin sitokin üretiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir.¹⁰ Uterin NK (uNK) hücrelerinin bazı fenotipik karakterleri periferik kan NK hücrelerinin dominant CD56 popülasyonuna benzese de farklı hücre grubudur. CD56, KIR aktivatör ve inhibitör reseptörler ekspres ederken, tipik NK hücre yüzey antijenlerinden CD16 ve CD57 ekspres etmezler.⁷ Uterin NK hücrelerinin yaklaşık %90'ı CD^{bright}16⁻ yüzey antijeni ekspres ederler.¹¹ Benzer kan lökositlerinden, yüksek oranda CD56 ekspres etmeleri ve sitokin üretimi eğilimi ile ayrılmaktadır. Yapılan gen çalışmasıyla periferik kan NK hücrelerinden farklı oldukları kanaatine varılmıştır.¹² Böylece uNK hücrelerinin gebeliğe özgü fonksiyonlarının olduğu düşünülmüştür.

Üreme fizyolojisinde NK hücre fonksiyonunu anlamak ilgi çekicidir. NK hücrelerin implantasyonda ve plasantasyon önemli rol aldığı rapor edilmiştir.¹³ Bu nedenle NK hücrelerinin spontan düşüğe neden olabileceği düşünülebilir.

Bu çalışmada, spontan düşük nedenlerini araştırmak için spontan düşüklüklerde ve istemli ilk trimester gebelik sonlandırılmalarında desidual lenfositlerdeki NK hücrelerinin oranı akım sitometri kullanılarak karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

İmmünolojik ve romatolojik hastalığı olmayan, son adet tarihinin ilk gününe ve ultrasonografi (USG) ölçümlerine göre 11 gestasyonel haftadan büyük olmayan, genitouriner veya sistemik enfeksiyon bulgusu olmayan, immünsüpresif ilaç kullanmayan, önceden tanı almış uterin anomalisi olmayan, daha önce üç veya daha fazla düşüğü olmayan 34 kadın çalışmaya dâhil edildi. Son adet tarihi ve ultrason ile belirlenen gebelik haftası 6-11. haftalar arasında klinik olarak spontan ve missed düşük yapan 19 kadın spontan düşük grubuna alındı. Son

adet tarihi ve USG ölçümlerine göre 5-10. gebelik haftaları arasında, klinik ve USG olarak normal kabul edilen ve gebelik sonlandırılmasını isteyen 15 kadın normal gebelik grubu olarak çalışmaya alındı. Çalışmamız için İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alındıktan sonra çalışmaya alınan tüm katılımcılardan bilgilendirilmiş onam formu alındı.

Çalışmaya kabul edilen 34 kadından 17'si nullipar olup, spontan düşük grubunda 11, normal gebelik grubunda ise altı kadın nullipardı. Her iki grupta da ikiden daha fazla doğum yapan yoktu. Obstetrik öz geçmiş bakımından her iki grup arasında anlamlı fark yoktu. Her iki grupta da üç veya daha fazla düşük yapan yoktu. Spontan düşük grubunda bir hastada tüberküloz öyküsü mevcuttu, ancak aktif tüberküloz bulgusuna rastlanmadı, hasta antibiyoterapi almıyordu. Spontan düşük grubunda bir hasta oral progesteron kullanıyordu. Normal gebelik grubundaki bir kadında da geçirilmiş derin ven trombozu öyküsü mevcuttu.

Kadın hastalıkları ve doğum kliniğine başvuran klinik ve USG olarak normal kabul edilen, 5-10. gebelik haftaları arasında 15 kadından ve 6-11. gebelik haftaları arasında spontan düşüğü olan 19 kadından gebelik desiduası toplandı. Normal gebelik grubuna, USG ile gebeliği saptanmış, gebeliği 10. haftadan küçük olan kadınlar alındı. Transvajinal USG ile baş popo mesafesi (BPM) ölçümü yapıldı ve gebelik haftası hesaplandı. Normal gebelik grubunun tamamında fetal kalp atışlar B mod kullanılarak izlendi ve anormal bir USG bulgusuna rastlanmadı. Bütün kadınların gebeliği transvajinal USG ile teyit edildi. Gebelik haftası, düzenli adet görenlerde son adet tarihine göre ve transvajinal USG ile BPM veya gestasyonel kese ölçümleri yapılarak saptandı. Son adet tarihinden emin olmayanlar ve son adet tarihine göre hesaplanan ile BPM ölçümüne göre hesaplanan arasında bir haftadan büyük fark olanlarda BPM ölçümü esas alınarak gebelik haftası belirlendi. Missed abort grubunda fetal ölüm saptandıktan sonra üç gün içerisinde dilatasyon küretaj yapıldı. Hastaların hiçbirisi daha önce üç veya daha fazla düşük yapmamıştı. Klinik olarak enfeksiyon bulgusu olanlar, antibiyotik veya immünsüpresif ilaç kullananlar, uterin anomalisi olanlar, romatolojik ve immünolojik hastalığı

olanlar çalışmaya alınmadı. Desidua, lokal anestezi altında yapılan dilatasyon küretaj ile toplandı. Fetoplazental materyal negatif basınçlı enjektörler kullanılarak Karman kanülleri ile boşaltıldı. Desidual örnekler Novak küret kullanılarak toplandı. Desidualar makroskobik olarak gri beyaz renkte idi. Nekroz ve enfeksiyon bulgusu gösteren örnekler çalışmaya alınmadı. Spontan düşük desidua örnekleri ile normal gebelik desidua örnekleri makroskopik olarak ayırt edilemez görünümde idi.

Desidua, "phosphate buffered saline (PBS)" içeren %0,2 bovine serum albumin ve %0,1 sodium azide ile süspansiyon hâline getirildi. Desidua cerrahi makaslarla küçük parçalara bölündü ve 59 µm lik "nylon mesh"den geçirildi. Eritrositleri lizise uğratmak için NH₄Cl ve EDTA içeren solüsyonda oda ısısında 10 dakika bekletildi. Hücreler PBS ile iki kez yıkandı. Akım sitometri uygulamadan önce 1 mL PBS eklendi.

Desidual lenfositler (1x10⁶ hücre/100 µL) 20 µL "fluorescein isothiocyanate (FITC)"-konjuge anti-CD16 MoAb (PharMingen, SanDiego, CA), PE-(phycoerythrin) konjuge anti-CD56 antikor (PharMingen, SanDiego, CA) ve PerCP-konjuge anti-CD3 antikor (Becton Dickinson, SanJose, CA) ile işaretlendi. Antikor işaretli hücreler FACS Caliber (Becton Dickinson) akım sitometri ile analiz edildi. Üç renkli akım sitometride 488 nm'de 15 mW argon lazer kullanıldı. İlk kapı "forward scattered (FS)" ve "side scattered (SS)" nokta grafiklerindeki lenfositlere göre alınarak diğer hücreler dışlandı. Sonra çakışan FITC-, PE-, PerCP-konjuge antikorlar kullanılarak FL1, FL2, FL3 sinyalleri alındı. İkinci kapı CD3 lenfositlere göre alındı. Diğer tüm antikorlu hücrelerin sonuçları bu lenfositlerin yüzdesi olarak hesaplandı. Her çalışma için 10.000 lenfosit değerlendirildi. Antikor pozitif hücrelerin yüzdesi CELL-Quest (Becton Dickinson) ile hesaplandı. CD56^{dim} hücreleri CD56⁺ olarak sayıldı. CD56⁺, CD56⁺16⁻, CD56⁺16⁺, CD56⁺16⁻3⁻ ve diğer NK hücreler akım sitometri ile analiz edildi. İlk önce her iki grupta CD56⁺/NK hücreleri analiz edildi. Daha sonra düşük grubunda ve normal gebelik grubunda CD56⁺16⁻ hücreler analiz edildi. Son olarak ise her iki grupta üç renk akım sitometri kullanılarak CD56⁺16⁻3⁻ NK hücreleri analiz edildi.

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde rutin olarak düşük materyalinden kromozom analizi yapılmadığından kromozom analizi yapılmadı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

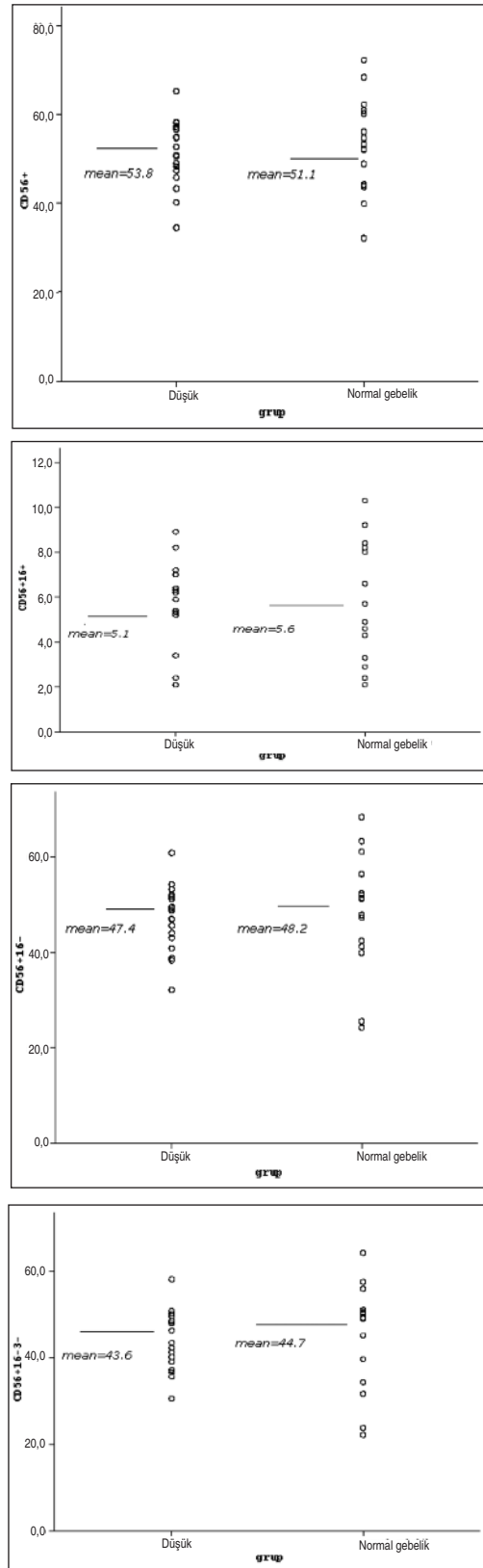
İstatistiksel analizler Student t-test ve Mann Whitney U test kullanılarak yapıldı. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlı fark olarak kabul edildi. Veriler SPSS15.0 Windows ile analiz edildi.

BULGULAR

Spontan düşük grubundaki 19 kadının ortalama yaşı 28,7 (18-41) yıl iken, normal gebelik grubundaki 15 kadının yaş ortalaması 27,5 (21-37) yıl olarak saptandı. Spontan düşük grubunda ortalama gebelik haftası 8,3 (6-11), normal gebelik grubunda ise 7,7 (5-10) olarak bulundu.

AKIM SİTOMETRİ ANALİZLERİ

CD56⁺, CD56⁺16⁻, CD56⁺16⁺, CD56⁺16⁺3⁻ NK hücrelerinin "scattered plot" analizleri Şekil 1'de görülmektedir. CD56⁺ NK hücre oranı, normal gebelik grubunda %51,1 (34,5-65,2) olarak bulundu. CD56⁺ NK hücreleri desidual hücrelerin büyük kısmını oluşturuyordu. CD56⁺ NK hücrelerin oranı spontan düşük grupları ise %53,3 (32,1-72,2) olarak saptandı. Spontan düşük ve normal gebelik grupları arasında desidual CD56⁺ NK hücre oranı bakımından anlamlı fark bulunamadı (sırasıyla $p=0,46$; $p>0,05$). CD56⁺16⁻ NK hücre oranları spontan düşük ve normal gebelik gruplarında, sırasıyla %47,4 (32,1-60,8) ve %48,2 (24,2-68,3) olarak saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,79$). Ayrıca, CD56⁺ NK hücrelerine ek olarak CD16 ekspresyen eden hücreler de saptandı. Spontan düşük grubunda CD56⁺16⁺ NK hücre oranı %5,1 (2,1-8,9), normal gebelik grubunda ise CD56⁺16⁺ NK hücre oranı %5,6 (2,1-10,3) olarak bulundu. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,50$). Son olarak CD56⁺16⁺3⁻ NK hücre oranları değerlendirildi. Spontan düşük grubunda CD56⁺16⁺3⁻ NK hücre oranı %43,6 (30,6-58,2), normal gebelik grubunda ise %44,7 (22,2-64,3) olarak bulundu. İki grup arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamadı ($p=0,75$).



ŞEKİL 1: Spontan düşük ve normal gebelik gruplarında CD56, CD56⁺16⁻, CD56⁺16⁺ NK ve CD56⁺16⁺3⁻ hücrelerinin desidual lenfositler içindeki oranlarının "scattered plot" grafleri.

Spontan düşük ve normal gebelik grupları CD56⁺, CD56⁺16⁻, CD56⁺16⁺, CD56⁺16⁺3⁻ NK hücre oranları açısından kıyaslandığında, bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (Tablo 1).

Otuz dört hastanın altısı uterus cerrahisi geçirmiş iken 28'i uterus cerrahisi geçirmemişti. Spontan düşük grubundaki 19 hastanın ikisi bir kez, bir hasta iki kez uterus cerrahisi geçirmişti. Normal gebelik grubunda da 15 hastanın ikisi bir kez uterus cerrahisi geçirmiş iken bir hasta iki kez uterus cerrahisi geçirmişti. Uterus cerrahisi geçirmiş (n=6) ve geçirmemiş (n=28) gruplar CD56⁺ açısından analiz edildiğinde, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Uterus cerrahisi geçirmiş olan grupta CD56⁺ NK hücre oranı %54,6, geçirmemiş olan grupta %51,5 olarak bulundu. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,50). Uterus cerrahisi geçirmiş olan grupta CD56⁺16⁻ NK hücre oranı %50,0, geçirmemiş olan grupta ise %47,3 olarak bulundu (p=0,5). İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p>0,05). CD56⁺16⁺3⁻ açısından analiz edildiğinde, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Uterus cerrahisi geçirmiş olan grupta CD56⁺16⁺3⁻ NK hücre oranı %43,5 iken, uterus cerrahisi geçirmemiş grupta %44,2 olarak bulundu (p=0,8). İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

TARTIŞMA

Uterin NK hücreleri, implantasyon sırasında endometriyumda bol olarak bulunmaktadır ve trofoblast hücreleri ile yakın temastadır. Bu hücrelerin fonksiyonu tam olarak bilinmese de implantasyonda ve plasentanın gelişiminde rol aldığı düşünülmektedir.¹⁴ NK hücrelerinin implantasyon sırasında ma-

ternal-fetal yüzde bulunması, uNK hücre hedefinin trofoblast olduğunu akla getirmektedir. Bu trofoblastlarla yakın temas, trofoblastların invazyonunda düzenleyici olduğunu göstermektedir.¹⁰ Menstrüal siklus boyunca ve erken gebelikte endometriyumun farklılaşması dinamik bir olaydır ve bu süreçte uNK hücreleri önemli rol oynamaktadır.¹⁴

Klinik gebeliklerin yaklaşık %15'i spontan düşük ile sonuçlanmaktadır. Bu düşüklerin yaklaşık yarısından kromozomal anomaliler sorumlu tutulmaktadır.¹⁵ Buna rağmen çoğunun nedeni de bulunamamaktadır.¹⁶ Anormal gebeliklerde uNK fenotip ve fonksiyonu araştıran çalışmalar bu alanı aydınlatmayı hedeflemiştir. Son yıllarda desiduada NK hücre popülasyonundaki değişikliklerin spontan düşüklerin sorumlusu olabileceği bildirilmiştir.^{17,18} Erken gebelik kaybı olanlarda NK hücresi ile ilgili yapılan bu çalışmalarla gebelik kaybının etiyojisinin aydınlatılması hedeflenmiştir. CD56, NK hücre işaretlenmesinde en sık kullanılan işaretleyicidir. Erken gebelik kaybında NK hücrelerinin önemini sorgulayan birçok çalışma vardır. Ayrıca, doğal immünitenin hastalıklara karşı yanıt yanında gebeliğin devamında da rol aldığına dair birçok kanıt vardır.⁸

Bazı araştırmacılar spontan düşük yapanlarla normal gebeliklerin uNK hücrelerini kıyaslamışlardır.¹⁹⁻²¹ Lachapelle ve ark., spontan düşük yapan kadınlarda CD56^{bright} CD16⁻ popülasyonunun azaldığını, CD56^{dim} CD16⁺ popülasyonunun ise arttığını bildirmişlerdir.²²

Tekrarlayan düşükleri olan kadınlarda normal karyotipli erken dönem gebelik kaybı olanlarda konsepsiyon öncesinde periferik kan NK hücre aktivitesi ve yüzdesinin anormal olarak yükseldiği gösterilmiştir.²³ Ancak, anormal karyotipli gebelik kaybı olanlarda NK hücrelerin bu artışı söz konusu değildir. Kromozomal anomalileri olan erken dönem kayıplarında öldürücülüğün kromozomal olarak anormal embriyodan kaynaklandığı kabul edilmektedir. Fetal ölümün etkisi dışında immünojenik anormalliğin eşlik etmesi gerekmez. Erken dönem gebelik kaybı olan kişilerin endometriyumunun normal gebelik geçirmiş olanlarla kıyaslandığı bir çalışmada; CD57⁺ NK hücrelerinin arttığı bildirilmiştir.²⁴ CD57⁺ NK hücrelerinin desiduada

TABLO 1: Desiduada NK hücre popülasyonu yüzdeleri.

Hücre popülasyonu (%)	Spontan düşük grubu (n=19)	Normal gebelik grubu (n=15)	p değeri
CD56+/lenfosit	53,3	51,1	0,4
CD56+16-/lenfosit	47,4	48,2	0,7
CD56+16+/lenfosit	5,1	5,6	0,5
CD56+16-3-/lenfosit	43,6	44,7	0,7

p<0,05 istatistiksel anlamlı fark olarak kabul edildi.

artmasının nedeni, bu hücrelerin trofoblastlara karşı lokal sitokinler tarafından uyarılmasıdır. Ancak, aynı çalışmada normal gebelik geçirmiş %10 hastada desiduada artmış NK hücre popülasyonu saptanmıştır. Vassiliadou ve ark.nın görüşüne göre artmış CD57⁺ NK hücreleri düşüğün göstergesi olabilir. Çalışmamızda, erken gebelik kaybı olan grup ile normal gebelik terminasyonu olan grup arasında CD56⁺ CD16^{dim} CD3⁻ K hücre sayısı bakımından anlamlı fark saptamadık. Bu durum, erken dönem gebelik kaybı olanların çoğunluğunun kromozomal anomalili olup olmadığını bilmediğimizden kaynaklanıyor olabilir. Bu gruptaki çoğu hastanın gebelik kaybının rastlantısal olarak saptanması, bu grupta kromozomal anomalilerin daha sık olduğunu akla getirebilir. Ayrıca, normal gebelik grubundaki hastaların da kromozomal anomalisi olup olmadığı ve işlem olmasaydı gebeliğin devam edip etmeyeceğinin bilinmemesi de sonuçları etkileyebilir.

Erken gebelik kayıplarında, tekrarlayan düşüklerde, implantasyon başarısızlığı ve diğer patolojik gebeliklerde uNK hücre oranlarının tutarlı sonuç vermemesi ve kesin yargılara varılamaması nedeni ile uNK hücre fonksiyonu üzerine yapılan çalışmalar ağırlık kazanmıştır. Normal ve patolojik gebeliklerde NK hücre reseptörlerinin önemini açığa çıkaran birçok çalışma yayımlanmıştır.²⁵⁻²⁷ NK hücre reseptörlerinin araştırıldığı bir çalışmada, tekrarlayan spontan düşüklere olan kadınlarda inhibitör KIR'lerin kontrollere göre daha az olduğu bulunmuştur.²⁷ Bu çalışmada, alloimmün düşüklere daha az sayıda inhibitör KIR olduğu ve bu düşüklere trofoblastik HLA klas I moleküllerinin uygun inhibitör KIR olmayan uNK hücreleri tarafından tanınmasından kaynaklandığı kanısına varılmıştır. Yan ve ark.nın yaptığı çalışma bu çalışma ile benzer sonuçlar sunsa da Witt ve ark.nın sonuçları bu sonuçlarla uyum göstermemektedir.^{25,26} Bu farklılıkların, çalışma grubundaki popülasyonun farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda birçok kısıtlayıcı faktörler bulunmaktadır. İmplantasyon alanındaki NK hücre yoğunluğu gebelik kaybının patogenezinde önemli rol oynayabilir. Bu nedenle örneklerin implantasyon alanından alınması daha yararlı olur. Ancak, pratik olarak örneklerin implantasyon alanından alınması

mümkün olmamıştır. Çalışmamızın diğer bir olumsuz noktası da düşüklere ve istemli gebelik sonlandırılmalarında fetal karyotiplemenin yapılmaması olmasıdır. Normal ve anormal karyotip, uNK hücre oranlarının fonksiyonunu değiştirebilir. Power analizinin yapılmaması da çalışmamızın diğer bir eksik kısmıdır. Sonuçların patolojik kesitlerde immünohistokimyasal boyama ile değil de akım sitometri ile yapılmış olması çalışmanın en önemli pozitif yönüdür. Göreceli olarak hasta sayısının fazla olması ve istemli gebelik sonlandırılması gibi normal gebelik olarak kabul edilebilecek bir grubun kontrol grubu olması çalışmamızın artılarıdır.

SONUÇ

Çalışmamızda spontan düşük yapan ve istemli gebelik sonlandırılması olan ve normal gebelik olarak kabul edilen gruplar arasında NK hücre sayısı bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak, immün yanıt oluşturan hücreler ile NK hücre aktivitesi ilişkisi araştırılmalıdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalardan, NK hücrelerin implantasyonda ve erken gebeliğin desiduasında ana lenfosit tipi olduğu, uNK hücrelerinin periferik NK hücrelerinden farklı olduğu çıkarılmalıdır.

İnsan üremesinde NK hücrelerinin fonksiyonu hâlen tam olarak anlaşılammıştır. Tüm çalışmaların sonucu göz önünde bulundurulduğunda, tekrarlayan düşüklere ve infertilitede NK hücre popülasyonunda değişiklikler olmaktadır. NK hücrelerinin arttığı veya azaldığı, incelenen örneğin periferik kan, endometriyum veya ilk trimester desiduası olmasına göre değişmektedir. Kanıtların çoğu çelişkilidir. NK hücre sayısı veya aktivitesindeki değişikliklerin neden mi, sonuç mu olduğu bilinmemektedir. NK hücrelerinin normal gebelikteki rolü tam olarak anlaşılana kadar, gebelik kaybı olan kadınlara NK hücre sayısını, oranını veya aktivitesini ölçen testler yapmanın yararı yoktur. Bu nedenle gebelik kaybı olanlarda immünoterapinin değişik formlarının kanıtlanmış bir faydası yoktur. Bu konuda yapılacak geniş randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Yazarlar tüm katılımcılara ve çalışmada emeği geçenlere teşekkür eder.

KAYNAKLAR

1. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1988;319(4):189-94.
2. Stephenson MD. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril* 1996;66(1):24-9.
3. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98(5):1103-11.
4. Michel MZ, Khong TY, Clark DA, Beard RW. A morphological and immunological study of human placental bed biopsies in miscarriage. *Br J Obstet Gynecol* 1990;97(11):984-8.
5. 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):949-55.
6. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. NK cells and human pregnancy--an inflammatory view. *Trends Immunol* 2006;27(9):399-404.
7. Dossiou C, Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev* 2005;26(1):44-62.
8. Vince G, Christmas SE, Johnson PM. Understanding cellular and humoral immunity. *Infertil Reprod Med Clin North Am* 2002;13:1-17.
9. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001;97(10):3146-51.
10. Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004;63(1):1-12.
11. King A, Balendran N, Wooding P, Carter NP, Loke YW. CD3-leukocytes present in the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization of the CD56++ population. *Dev Immunol* 1991;1(3):169-90.
12. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, et al. Human decidua natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2003;198(8):1201-12.
13. Burton G. Book Reviews (Loke YW, King A. Human Implantation: Cell Biology and Immunology). *J Anat* 1997;190(Pt 3):473-5.
14. Demir R, Kayisli UA, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY, Arici A. Structural differentiation of the human uterine luminal and glandular epithelium during early pregnancy: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Placenta* 2002;23(8-9):672-84.
15. Lobo SC, Huang SJ, Germeyer A, Dosiou C, Vo KC, Tulac S, et al. The immune environment in the human endometrium during the window of implantation. *Am J Reprod Immunol* 2004;52(4):244-51.
16. King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW. Human uterine lymphocytes. *Hum Reprod Update* 1998;4(5):480-5.
17. Winger EE. CD57+ cells and recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 2007;58(4):311-4.
18. Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2000;47(2):87-103.
19. Chao KH, Yang YS, Ho HN, Chen SU, Chen HF, Dai HJ, et al. Decidual natural killer cytotoxicity decreased in normal pregnancy but not in anembryonic pregnancy and recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1995;34(5):274-80.
20. Maruyama T, Makino T, Sugi T, Matsubayashi H, Ozawa N, Nozawa S. Flow-cytometric analysis of immune cell populations in human decidua from various types of first-trimester pregnancy. *Hum Immunol* 1992;34(3):212-8.
21. Lea RG, Underwood J, Flanders KC, Hirte H, Banwatt D, Finotto S, et al. A subset of patients with recurrent spontaneous abortion is deficient in transforming growth factor beta-2-producing "suppressor cells" in uterine tissue near the placental attachment site. *Am J Reprod Immunol* 1995;34(1):52-64.
22. Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol* 1996;156(10):4027-34.
23. Yamada H, Morikawa M, Kato EH, Shimada S, Kobashi G, Minakami H. Pre-conceptual natural killer cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. *Am J Reprod Immunol* 2003;50(4):351-4.
24. 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):1569-74.
25. Yan WH, Lin A, Chen BG, Zhou MY, Dai MZ, Chen XJ, et al. Possible roles of KIR2DL4 expression on uNK cells in human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2007;57(4):233-42.
26. Witt CS, Goodridge J, Gerbase-Delima MG, Daher S, Christiansen FT. Maternal KIR repertoire is not associated with recurrent spontaneous abortion. *Human Reprod* 2004;19(11):2653-7.
27. Varla-Leftherioti M, Spyropoulou-Vlachou M, Niokou D, Keramitsoglou T, Darlamitsou A, Tsekoura C, et al. Natural killer (NK) cell receptors' repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 2003;49(3):183-91.