

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**BİRİNCİ TRİMESTER GEBELİK KAYIPLARINDA
SELEKTİNLERİN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ
ARAŞ. GÖR. DR.FATMA ESKİCİOĞLU

TEZ DANIŞMANI
DOÇ.DR.SELMAN LAÇİN

MANİSA , 2004

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**BİRİNCİ TRİMESTER GEBELİK KAYIPLARINDA
SELEKTİNLERİN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ
ARAŞ. GÖR. DR.FATMA ESKİCİOĞLU

TEZ DANIŞMANI
DOÇ.DR.SELMAN LAÇIN

MANİSA , 2004

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan kaçınmayan başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Hüsnü Çağlar olmak üzere tüm değerli hocalarıma,

Tez çalışmalarımda desteği ve katkılarından dolayı değerli hocam Doç. Dr. Selman Laçın'e,

Asistanlık hayatım boyunca pek çok şeyi paylaştığımız asistan arkadaşlarıma ve diğer klinik çalışanlarına,

Tez çalışmalarımda yardımlarından ötürü sayın Doç.Dr. Kemal Özbilgin'e ve Dr. Can Köse'ye,

Varlıkları ile beni mutlu eden eşim ve kızıma,

Beni bu günlere getiren anne ve babama,

TEŞEKKÜR EDERİM.....

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. ABORTUSLAR.....	2
2.2. ADEZYON MOLEKÜLLERİ	12
2.3. İMPLANTASYONDA ADEZYON MOLEKÜLLERİNİN ROLÜ	19
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
4.BULGULAR.....	28
5.TARTIŞMA.....	32
6.ÖZET.....	37
7. İNGİLİZCE ÖZET.....	39
8.KAYNAKLAR.....	41
9.RESİMLER.....	50

GİRİŞ

Son yıllarda infertilite üzerine yoğunlaşan ilgi gebelik elde etme yanında devamını da sağlama konusunda kaygıları beraberinde getirmiştir. Yüksek maliyet, zaman ve emek sonucu elde edilen gebeliklerin ya da spontan gerçekleşen ve devamı arzulanan gebeliklerin kaybedilmesi çiftlerin "neden?" sorusuyla hekimleri karşı karşıya getirmektedir.

Gebeliklerin %12-15'i abortusla sonuçlanmaktadır (1,2). Ancak bu buzdağının görülen kısmı olup, subklinik abortuslarla bu oran % 60'lara kadar dayanmaktadır (3). Tekrarlayan abortuslar ise üreme çağı kadınların %1'ini ilgilendirmektedir ve bu grubun %50'sinde neden bilinmemektedir (6). Bu yüksek oran ancak implantasyona etki eden faktörlerin tam olarak açıklanmasıyla azaltılabilecektir.

Birbirinden immunolojik ve genetik olarak tamamen farklı iki organizmanın birleşerek implantasyonun gerçekleşebilmesi hayli karmaşık ve hepsi birbiri ile bir şekilde ilişkili birçok faktörün belli bir sırada bir araya gelmesiyle gerçekleşmektedir. Bu olaylar zincirinin anlaşılmasına çalışılması moleküler biyoloji üzerine yoğunlaşılmasına ve adezyon moleküllerinin ilgi odağı olmasına neden olmuştur.

Lökosit, trombosit ve endotel hücrelerinin birbiri ile etkileşimini düzenleyen hücre adezyon moleküllerinden selektinler, immunolojik olaylarda oynadıkları rollerle dikkatleri üzerine çekmektedirler.

Bu çalışmada, abortusla sonuçlanmış ve sağlıklı gebelikler karşılaştırılmak suretiyle selektinlerin abortuslarla olan ilişkisinin immunohistokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

A. GENEL BİLGİLER

1. ABORTUSLAR

Abortus, uterus dışında yaşayabilme yeteneğini henüz kazanmamış embriyo veya fetus ve eklerinin tamamının veya bir kısmının uterus kavitesi dışına atılması olayıdır. 1977 yılında Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) gebelik ürününün ağırlığı ve gebelik sürecini dikkate alarak böyle bir tanımlama yapmıştır. Bu şekilde; 20. gebelik haftasından önce, 500 gr'dan az ağırlıkta embriyo veya fetus ve eklerinin tamamının veya bir kısmının uterus kavitesi dışına atılması olayına 'abortus' adı verilmiştir (4).

Abortuslar oluş şekillerine göre üç gruba ayrılır:

- 1) Subklinik abortus (Belirlenemeyen abortus): Fekondasyondan hemen sonraki günlerde oluşur. Ya zamanında olan menstrüel kanama ile ya da birkaç gün geciken kanama ile gebelik sonlanır. Tüm insan konsepsiyonlarının yaklaşık % 70'i viabilite kazanamaz ve bunların tahminen % 50'si subklinik abortus şeklinde olduğu düşünülmektedir (5). Human koryonik gonadotropin (hCG) ölçümlerinin kullanıldığı çalışmalarda subklinik abortus oranının % 31 olduğu tespit edilmiştir (1).
- 2) Erken abortus: 12. gebelik haftasının sonuna kadar oluşan abortuslardır.
- 3) Geç abortus: 13-20. gebelik haftaları arasında oluşan abortuslardır.

Abortuslar tamamlanma şekillerine göre ise ikiye ayrılırlar:

1) Komplet Abortus: Embriyo veya fetus ve eklerinin tümüyle uterus kavitesi dışına atılmasıdır.

2) İnkomplet Abortus: Embriyo veya fetus ve eklerinin bir kısmının atılıp, bir kısmının uterus kavitesi içinde kaldığı durumlara verilen isimdir.

Klinik seyir olarak spontan abortuslar; 20. haftadan önce uterin kaynaklı kanama olmasına rağmen, servikal açıklık yok ise 'düşük tehdidi (abortus imminens) , servikal açıklık mevcut ve giderek artıyorsa 'kaçınılmaz düşük (abortus incipiens) olarak isimlendirilir. 20. gebelik haftasından önce fetusun ölümünün üzerinden 8 hafta ve daha uzun süre geçmiş ve fetus hala uterin kavitede ise 'missed abortus' denilmektedir. Enfekte bir abortus sonucu enfeksiyon maternal dolaşıma yayılmış ise 'septik abortus' adı verilir (4).

İnsidans: Klinik olarak farkedilebilen spontan abortusların oranı % 12-15 olarak bilinmektedir (1,2). Ancak bu buzdağının görülebilen kısmı olup, subklinik olanlarla birlikte insidans % 60'lara kadar çıkmaktadır (3). Spontan abortusların % 75'i 16. gebelik haftasından önce % 62'si 12. gebelik haftasından önce gerçekleşmektedir (4).

20. gebelik haftasından önce 3 veya daha fazla abortus olması ise habitüel abortus (tekrarlayan abortus) olarak tanımlanmaktadır ve reproduktif çağ kadınlarının % 1'ini etkilemektedir (6).

1.A. ETİYOLOJİ

Genetik faktörler

Çoğu kez ilk trimester abortuslarına yol açarlar. En sık karşılaşılan neden kromozom sayı bozukluğudur. Spontan abortusların % 60'ı ilk trimesterde olmaktadır ve bundan anormal karyotip sorumludur (1). En sık görülen tipi otozomal trizomilerdir. Trizomi 13, 16, 18, 21, 22 sıktır. Tekrarlayan abortusa eşlik eden ve trizomik konsepsiyonlara yol açan en sık kromozomal anomali ise, paternal kaynaklı dengeli translokasyonlardır (7). IVF-ET (invitro fertilizasyon ve embriyo transferi) çalışmalarında yüksek 3. gün FSH ve E₂ düzeylerinin özellikle otozomal trizomi riskini arttırdığı saptanmıştır (8). İkinci sıklıkta monozomi X (45 XO) olguları görülür. Daha az sıklıkla triploidi, tetraploidi, translokasyonlar ve mosaizm gibi kromozom anomalileri görülür. İlginç olanı şudur ki; tekrarlayan abortuslarda kaybedilen gebelik sayısı özellikle 6'nın üzerine çıkınca anormal karyotip frekansı düşmektedir (9).

Maternal Faktörler

Birinci trimester sonu ile ikinci trimester abortuslarına yol açarlar. Enfeksiyonlar, endokrin bozukluklar, anatomik anomaliler, metabolik sebepler, trombofili ve immunolojik nedenleri kapsar.

Enfeksiyonlar

Mikoplazma, üreoplazma, chlamydia, B-streptokoklar en sık olmak üzere bakteriyel, viral, parazitik, zoonotik ve fungal organizmalar ile oluşan enfeksiyonlar abortusa yol açabilir (10).

Tekrarlayan abortuslarda enfeksiyonun rolü tartışmalıdır. TORCH (toxoplazma, rubella, cytomegalovirus ve herpes) enfeksiyonunun rolü olmadığı düşünülmektedir (11). Bacterial vaginosis, chlamydia trachomatis enfeksiyonlarına son zamanlarda ilgi artmıştır. Erken gebelik haftalarında saptanan bacterial vaginosis ile preterm eylem ve geç abortuslar arasında belirgin birliktelik saptanmıştır (12). Yine tekrarlayan abortus öyküsü olan kadınların serumlarında yüksek titrelerde chlamydial antikorlar saptanmıştır (13). Ancak sağlam ve kliniğe yansıyan bir neden- sonuç ilişkisi ortaya konamamıştır.

Endokrin Bozukluklar

Progesteron eksikliği abortuslarla ilişkilendirilmiştir. Erken gebeliğin devamı (7-9. gestasyon haftalarında gelişen trofoblastlar tarafından yeterli miktarların üretildiği zamana kadar) corpus luteum tarafından üretilen progesterona bağlıdır (14). Corpus luteum yeterli miktarda progesteron üretemez ise veya endometrium ya da desidua içinde progesteron kullanımı bozulmuş ise, 10.gestasyon haftasından önce abortus oluşabilir. Luteal faz defekti tekrarlayan abortusu olan kadınların %20-60'ında sebep olarak gösterilmiştir (15). Bu geniş aralık teşhiste kullanılan farklı metodolojiye bağlıdır. Progesteronun subnormal düzeyleri, endometriumun implantasyon ve embriyo gelişimini sağlayabilecek şekilde gelişimine izin vermemektedir (16). Progesteron eksikliği kendini endometrial protein sekresyonunda bozukluklarla gösterir. Li ve arkadaşları kontrollerle kıyaslandığında tekrarlayan abortusları olan kadınların uterin yıkama sıvılarında plasental protein 4 ve musin-1 seviyelerini düşük bulmuşlardır (16).

Artmış LH seviyelerinin, doğrudan veya androjen ya da östrojen seviyelerini artırmak suretiyle dolaylı olarak, oosit kalitesini veya endometrium kalitesini bozarak abortusa yol açtığı ileri sürülmüştür (17). Ancak en son yapılan çalışmalarda (18) serum LH seviyeleri artmış olan

hastalarla normal seviyeli hastalar arasında gebelik sonuçları arasında fark tespit edilememiştir. Clifford ve arkadaşları yaptıkları prospektif, randomize, plasebo kontrolü çalışmalarında, GnRH analogları ile artmış LH seviyelerini azaltmanın canlı doğum hızında artış yapmadığını bulmuşlardır. Yine yapılan bir başka çalışmada PCOS (Polikistik Over Sendromu) olan hastalarda metformin (İnsulin duyarlılığını erttirici ajan) tedavisi denendiğinde kontrol grubuna göre LH ve androjen seviyelerinde belirgin düşme ve abortus sıklığında azalma görülmüştür (19).

Yüksek HbA1c konsantrasyonları ile birinci trimester spontan abortus riski arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (20). Maternal hiperglisemi ve buna bağlı artmış konjenital anomaliler de abortus nedeni olabilir. Ayrıca diabetes mellituslu hastalarda fibrin depolanması ve aterosklerozis sonucu oluşan anormal plasantasyonun da abortusa yol açabileceği ileri sürülmüştür (21).

Hiperprolaktineminin de ekstraselüler matriksi etkileyerek veya immünolojik mekanizmalarla tekrarlayan düşüklere yol açtığı düşünülmektedir. Bromokriptin tedavisi sonrası gebelik sonuçlarında belirgin iyileşme görülmüştür (22).

Hipotiroidizm; Ovulasyon ve korpus luteum disfonksiyonuna yol açarak tekrarlayan abortuslara neden olabilir. Son yıllarda otoimmünite üzerinde durulmaktadır. Ötiroid kadınlardaki tiroid antikoru ile tekrarlayan abortuslar arasında ilişki bulunmuştur (23). İlişki açıkça ortaya konamamış, immün sisteme özellikle T hücre aktivasyonuna dikkat çekilmiştir.

Anatomik Anomaliler

Tekrarlayan abortusların %15-25'inde hemen hemen hepsi uterin septum ile ilişkili olan mullerian füzyon defektleri bulunmaktadır (24). Septumun zayıf kanlanmasıdan kaynaklanan yetersiz implantasyon dinamiği ve malforme uterusu sex steroidlerinin reseptör defektlerinden kaynaklanan anormal

uterin kontraksiyon tekrarlayan abortusların nedenini oluşturur. Ayrıca ikinci bir abortus sebebi olan servikal yetmezlik de uterin anomalilere eşlik edebilir.

Gebeliklerin %1-4'ünde uterin fibroidler gözlenmektedir (25). İntramural ve submukozal myomları olan hastalarda gebelik kayıpları insidansı ikinci ve üçüncü trimesterde sırasıyla %40 ve %57'dir (26). Uterin fibroidler implantasyonu engelleyerek yada uterin kontraksiyona yol açarak gebelik kayıp riskini artırır (27). Ayrıca myomektomi sonrası gebelik kayıpları belirgin olarak azaldığı bildirilmiştir (26).

İkinci trimesterde ani EMR (erken membran ruptürü) sonrası fetusun ağrısız olarak atılması servikal yetmezlik olarak tanımlanır. Fetal sonuçlarda iyileşme göstermemesine rağmen servikal yetmezlik vakalarında serklaj uygulaması preterm eylem hızını azaltmıştır (28).

Asherman sendromunda da abortus insidansının arttığı görülmüştür. Posttravmatik intrauterin adezyonlar uterin kavite büyüklüğünü ve steroid hormonlara olan cevabını azaltır, implantasyona engel olur (29).

Metabolik Sebepler

Folat ve Vit B12 eksikliği ile birliktelik gösteren hiperhomosistinemi, trombofilik olaylara yatkınlığa neden olup, tekrarlayan abortus riskini artırır. Bir aylık yüksek doz folik asit (15 mgr/gün) ve Vit B6 (750 mgr/gün) tedavisinin, hiperhomosistinemili hastalarda homosistein seviyelerinde ve fetal sonuçlarda iyileşmeye yol açtığı iddia edilmiştir (31).

Gluten intoleransı nedeniyle ince barsakların zarar gördüğü ve gıda emiliminin etkilendiği bir gastrointestinal sistem problemi olan Çöliak hastalığı ile tekrarlayan abortuslar arası ilişki olduğu son çalışmalarda ortaya konmuştur (32). Ancak gebelik boyunca glutenden fakir diyetle beslenmenin gebelik kayıplarına olan etkisi henüz bilinmeyen ve araştırılması gereken bir konudur.

Trombofili

Edinsel ve herediter trombofilik durumlar tekrarlayan abortuslar da dahil olmak üzere kötü gebelik sonuçlarıyla birliktedir. Altta yatan mekanizma uteroplasental damarlarda oluşan trombozudur (33,34). Edinsel trombofililerden ensık rastlanılanı fosfolipidlere karşı oluşan antikorların ortaya çıkardığı anti-fosfolipid sendromudur. Bu antikorların en sık bilinen subgrupları; Lupus antikoagülan, anti-kardiolipin, anti-b2 glikoprotein 1 antikorlarıdır (34). Daha önce bilinen abortusu olmayan kadınlarda % 2-5 olan anti-fosfolipid antikor insidansı, tekrarlayan abortuslu kadınlarda % 10-20' dir (35). Oluşan tromboz yetersiz plasantasyona yol açmakta , ayrıca anti-fosfolipid antikorlar trofoblast invazyonunu ve hormon üretimini bozmaktadır (35). Antitrombin III eksikliği, protein S ve protein C eksikliği gibi birçok herediter trombofilik durumlar tekrarlayan abortuslara belirgin olarak katkıda bulunmaktadır. Tekrarlayan abortuslu olguların %39'unda en sık aktive protein C rezistansı saptanmıştır (33).

Bu hastalarda aspirin, prednisolon, heparin, immunglobulin infüzyonu gibi değişik tedavi modaliteleri denenmektedir. 10 kontrollü çalışmanın meta-analizinde heparin ve aspirin kombine tedavisinin, aspirinin tek başına ya da prednisolonla kombine edilerek uygulanmasına oranla daha iyi sonuçlar doğurduğu görülmüştür (36).

İmmünolojik Problemler

Gebelikte maternal immün sistem paternal orijini de olan fetal ve plasental antijenlere karşı reaksiyon oluşturur. Normal gebeliklerde semi-allojenik ürünün rejeksiyonunu engellemek için maternal immün yanıt baskılanır (37). Abortus ile allo-immunite arasındaki ilişki tam olarak bilinmemektedir. Lim ve arkadaşları bununla ilgili üç mekanizma ileri sürmüşlerdir (37); ortak HLA

lokusları, antikorların yeterli blokaj edilmeyişleri, supressör hücreler ve immun modölatörlerle ilgili mekanizmalar.

HLA benzerliği nedeni ile ilgili olan problemlerde fetus ile paylaşılan polimorfik genler nedeni ile fetus anne tarafından tanınmaz ve fetus maternal bloke edici antikorları indükleyemez ve abortus kaçınılmaz olur (38). Birçok çalışma tekrarlayan abortusları olan kadınlarda HLA paylaşım hipotezini doğrular (39).

Normalde gebelik kaybını engellemek için babaya ait antijenleri örten blokan antikor üretiminin gerekli olduğu düşünülmektedir. Bu blokan antikorlar spesifik antijenmiş gibi plasentaya bağlanarak, immunolojik refleks arkının afferent kolunun kamuflaj ve blokajına neden olur (40).

Son yıllarda dikkatler immun modölatörler ve supressör hücre mekanizması üzerine toplanmıştır. Tekrarlayan abortuslu hastalarda NK (natural killer), lenfositler ve makrofajların aktivasyonu nedeni ile oluşan artmış sitotoksik aktiviteye rastlanmıştır (41). Makrofajlar T helper-1 (Th-1) tipi sitokinler üretebilmektedirler, örneğin; İnterlökin-2 (IL-2), TNF-alfa (Tümör nekrozis faktör-alfa) ve İnterferon-gama. Bu sitokinler maternal-fetal üniteye artmış şekilde bulunurlar, direkt embriyotoksik etki ile ya da plasental trofoblastları zedeleyerek gebeliğe zarar verirler. Aksine antiinflamatuvar sitokinlerden IL-4, IL-6, IL-10, IL-13'ün yüksek konsantrasyonları plasental gelişime ve fonksiyonuna katkıda bulunarak gebeliği olumlu yönde etkilerler (42).

Bu hipotezler doğrultusunda NK hücre toksisitesini engellemek, blokan antikor oluşumunu arttırmak ve Th-1'in Th-2'ye dönüşümünü sağlamak amacı ile birçok immunomodölatör tedaviler teorik olarak uygulanabilir. Bu tedavi modaliteleri; Allojenik lenfosit immünoterapi ve İntravenöz immünglobülinlerdir (İVIG). Ancak klinikte bu tedavi modalitelerinin öploid embriyonun abortusunu engellemede etkisi tartışmalıdır. Bu tedavilerdeki başarısızlık; tedavi modalitelerindeki farklılığa, hasta seçimine, çalışmaların

küçük çaplı olmasına, yalancı negatif ve yalancı pozitif oranlarının yüksek olmasına bağlı olabilir.

Lenfosit immünoterapisi alan kadınlarla yapılan iki çok merkezli çalışmanın ilkinde, eve bebek götürme oranında %10 artış görülmesine rağmen ikincisinde belirgin gelişme saptanmamıştır (43,44). Alerji ve viral enfeksiyon gibi transfüzyonun genel riskleri de bu tedavilerde akılda tutulmalıdır. İVIG tedavisi daha iyi tolere edilebilmesi ve lenfosit immünoterapisinin potansiyel risklerinin olmaması nedeniyle daha avantajlı gibi görünmektedir. Tekrarlayan abortuslu hastalarda İVIG tedavisi ile yapılan üç adet plasebo kontrollü çalışmanın meta-analizinde plasebo verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi verilen grupta gebelik sonuçlarında belirgin iyileşme görülmüştür (39).

Progesteronun doğal immünosüpressif etkisi üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. İn vitro çalışmalarda progesteronun gelişen fetüsün kaybına yol açan Th-1 hücreleri bloke ettiği gösterilmiştir (45).

Günümüzde hali hazırda İVIG tedavisini önerebilmek için yeterli düzeyde kanıt yoktur.

Diğer Faktörler

Gebelik kayıpları ile ilişkili diğer faktörler arasında ağır metal zehirlenmesi ve organik solventlere uzun süreli maruziyet, antineoplastik ajanlar, inhalasyon anesteziikleri, iyonize radyasyon ve uterin kan akımını bozan kronik medikal hastalıklar sayılabilir (46).

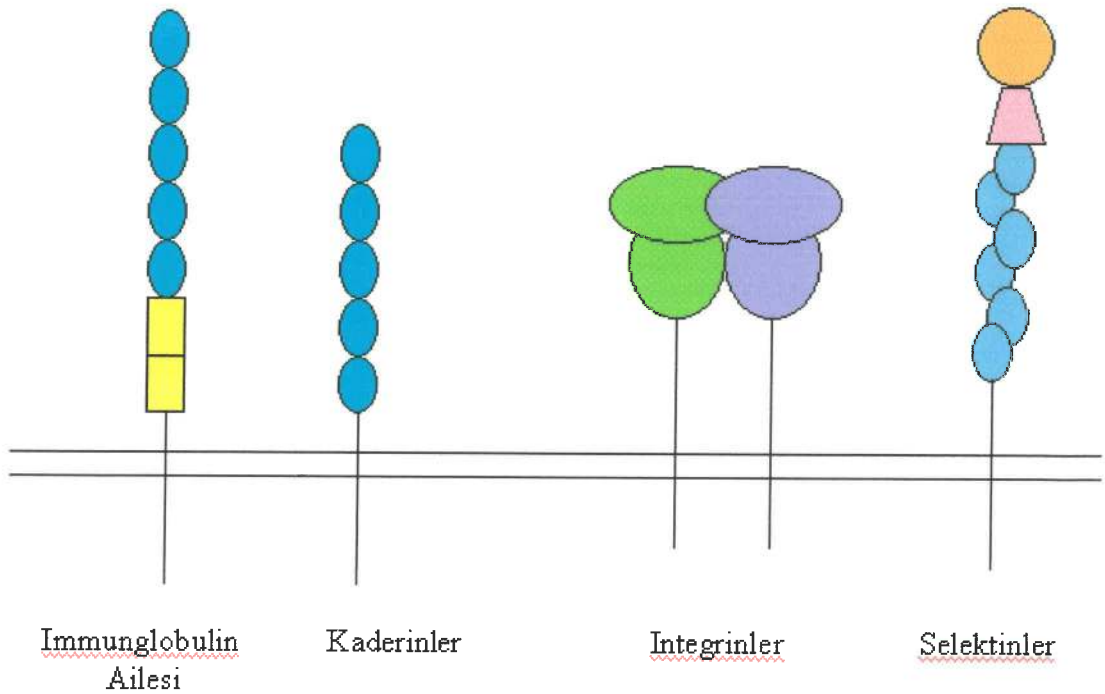
Annenin kahve, sigara, alkol gibi alışkanlıkları da fetal gelişimi kötü yönde etkiler. Sigara sayısı, tüketilen alkol miktarı ile abortus oranı doğrusal ilişki gösterir. Günde 300 mg'dan az kahve tüketimi spontan abortusa neden olmaz, ancak intrauterin gelişme geriliği riski mevcuttur (47). Eğitimle bunların tüketiminin azaltılması riski azaltır (48).

Gebelik boyunca orta dereceli egzersiz ile spontan abortus arasında ilişki de bulunamamıştır. Preterm doğum ile koitus ilişkilendirilmiş ancak bu ilişki kesin olarak doğrulanmamıştır (49).

2. ADEZYON MOLEKÜLLERİ

Hücre adezyon molekülleri; lökositler, endotel hücreleri veya ekstrasellüler matriks hücrelerini birbirine bağlayan yüzey proteinleridir. Yaralanma ve enfeksiyon sonucu oluşan uyarılar bu adezyon moleküllerinin üretimini ve aktivasyonunu sağlar. Böylece adezyon molekülleri ve reseptörleri vücudun zararlı etkilere karşı oluşturduğu inflamatuvar ve immun yanıtta önemli rol üstlenirler. Hücre adezyon molekülleri dört ana gruba ayrılırlar (şekil-1):

- 1-İmmunglobulin ailesi,
- 2-İntegrinler,
- 3-Selektinler
- 4-Kaderinler



Şekil-1.Hücre adezyon molekülleri (50)

Adezyonu sağlayan moleküller arasında çeşitli biçimde bağlar kurulabilir. Bu bağlantılar    çeşitlidir:

1-Homofilik bağlanma: Hücre  zerindeki molekül, karşı hücrenin aynı tür diğer molekülüne doğudan bağlanır.

2-Heterofilik bağlanma: Hücre yüzeyindeki molekül karşı hücrenin farklı tür molekülü ile bağlanır.

3-Bir ekstrasellüler molekül vasıtasıyla bağlanma: Bir hücredeki hücre yüzey reseptörü, karşı hücrenin reseptörüne ekstrasellüler salınmış bağlayıcı molekül (ligand) aracılığı ile bağlanabilir.

İmmunglobulin ailesi:

İmmunglobulin ailesi hücre adezyon molekülleri kalsiyum bağımsız transmembran glikoproteinleridir. Bu grubun çoğu  yesi homofilik hücre-hücre bağlantısı kurar ve embriyonik gelişimde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir (51).

Genel olarak, integrinleri veya diğer immunglobulin ailesi hücre adezyon moleküllerini bağlarlar. Alt grupları ICAM (intercelluler cell adhesion molecule) I, II, III, VCAM-I (vascular cell adhesion molecule), PECAM-I (platelet endothelial cell adhesion molecule), NCAM (nöral cell adezyon molecule) den oluşur. ICAM-I ve ICAM-II aktif endotelial hücreler tarafından eksprese edilirler. VCAM-I damar endotel hücrelerinde tanımlanırken, PECAM-I ise nötrofiller, monositler, plateletler ve geniş miktarlarda endotelial hücrelerde tanımlanmıştır. NCAM'ın ilk olarak lökositlerde eksprese edildiği gösterilmiştir. Ancak baskın olarak sinir dokularında eksprese edilir ve dört farklı formu vardır.

İmmunglobulin ailesi hücre adezyon molekülleri lökositler üzerindeki integrinlere bağlanırlar. Damar duvarı üzerindeki lökositlerin düzleşmesini ve

ekstravaze olmasını sağlarlar. IL-8 gibi kemokinler integrinleri yapısal değişikliğe uğratırlar ve böylece ligandlara da bağlanmalarını sağlarlar .

İntegrin ailesi:

Hücrelerin ekstrasellüler matrikse ve birbirlerine bağlanmasından sorumlu, fokal adezyonlar olarak adlandırılan ve özel hücre bağlanma sitelerini oluşturan, hücre yüzey reseptörleridir. İntegrinler ekstrasellüler matrikste bağlandıkları bileşenlere göre isimlendirilirler. Örneğin; en çok bilineni fibronektin reseptörüdür. Bir plazma membran glikoproteini olarak ilk ortaya çıkanlardandır ve fibronektin molekülünü bağlar.

ICAM ve VCAM'lar için reseptör olarak fonksiyon görürler. İntegrinler alfa ve beta zincirlerinden oluşan heterodimerik proteinlerdir. Lökositlerin vasküler endotele yapışmasında ve hücreler arası etkileşimde rol oynarlar; sadece hücre-hücre bağlantısı yapmayıp, hücre-matriks etkileşiminde de görev almaları diğer adezyon moleküllerinden farklılıklarını ortaya koyar. Farklı lökosit popülasyonları, farklı integrin kümelerini sunar. Böylece farklı tipteki hücre adezyon moleküllerinin lökositlere bağlanmasını sağlayan integrinler de spesifik hale gelmiş olurlar (52).

Kaderin ailesi:

Kalsiyuma bağımlı olarak homofilik bağlantı ile diğer kaderinlere adezyonu sağlarlar (53). Ekstrasellüler kalsiyumun tükenmesi yada yokluğu bağlanmayı engeller. Embriyonun gastrulasyon fazında, epitelyal-mezenşimal dönüşümde ve hücrelerin diferansiyasyonunda ilk olarak epitelyal hücrelerde gösterilmiş olan E-kaderin'in rol aldığı gösterilmiştir (54). Trofoblastlarda ilk olarak varlığı saptanan P-kaderin ve sadece sinir sistemi hücrelerinde bulunan N-kaderin de diğer tipleridir. Kaderinler

fonksiyonel adezyon aktivitesi göstermek için, kateninler denilen sitoplazmik plak proteinleri ve sitoiskeletle kompleks formu almaktadırlar (55).

E-kaderin, uterus ve diğer epitelyal hücrelerin adezivlik ve polarize fenotipinin devamında anahtar rol oynamaktadır (56). E-kaderin implantasyonda uterusda eksprese edilen glikoproteinlerdendir. Fare uterusu gebeliğin dördüncü günü reseptif hale gelir ve reseptif endometriyumun belirleyicisi olarak E-kaderinin dağılımını hormonal ve diğer stimulatörlerin etkisi altında değiştirir (57).

Kemik ve böbrekte kalsiyum dengesini düzenleyen bir hormon olan kalsitonin, kaderinlerin fonksiyonlarını etkileyen faktörler arasındadır (58).

Fonksiyonel olarak hücre adezyon molekülleri diye klasifiye edilen bazı proteinler de T hücreleri ile antijen sunumu yapar ve hedef hücrelerine yardımcı olurlar. CD 44 de bunlardan biridir ve lenfositlerin lenfatik sistem yolu ile tekrar genel dolaşıma katılmalarını ve böylece antijen sunumunda görev almak üzere hazır bulunmalarını sağlar.

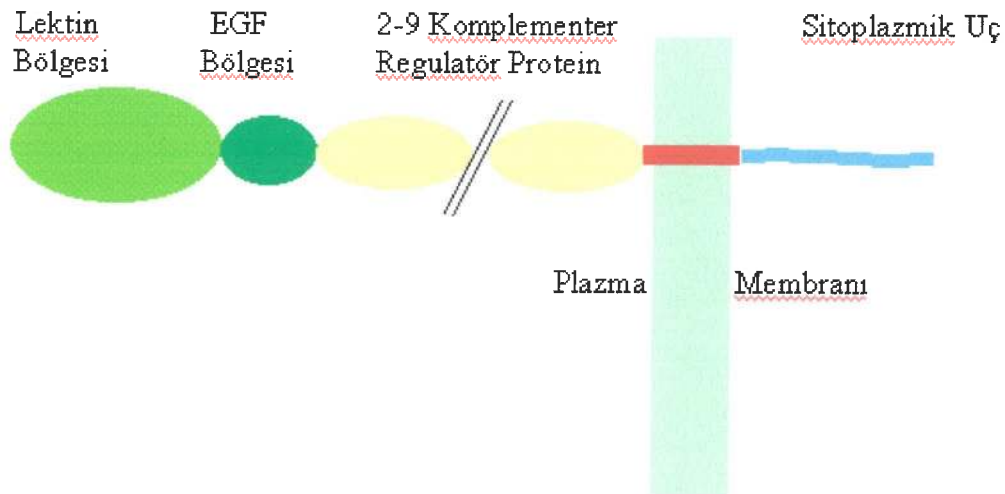
Adezyon molekülleri arasında ekstrasellüler matriks proteinleri de yer alır. Ekstrasellüler matriks esas olarak iki temel makromolekülden oluşur. Bunlarda ilki; bir polisakkarit olan ve proteoglikan proteinlerine kovalent bağlanan glikozaminoglikanlar, diğeri ise karbonhidratların bağlandığı bir protein kökü içeren yapısal glikoproteinlerdir. İmplantasyon, hücre göçü, invazyon gibi birçok olay ekstrasellüler matriks tarafından kontrol edilir (59).

Selektinler

İnflamasyonda ve immün yanıtta önemli yeri olan, endotelyal hücreler ve lökositler arasında heterofilik etkileşimlere aracı olan adezyon molekülleridir. Selektinler, kalsiyum bağımlı tek lektin domeinleri ile tanımlanırlar ve karşılarındaki hücrelerin spesifik karbonhidrat gruplarını bağlarlar. Başlıca lökositler ve endotel hücrelerinde eksprese edilirler.

Tip 1 hücre yüzey glikoproteini olan selektin ailesi P, L, ve E olmak üzere üç gruptur. L-selektin (CD 62L), başta lenfositler olmak üzere granülosit ve monositler tarafından üretilir. P-selektin (CD 62P), endotel hücrelerinin Weibel-palade cisimcikleri ve plateletlerin alfa-granüllerinde depolanır ve aktive endotel hücreleri ve plateletlerin hücre yüzeyinde yer alır. E-selektin (CD62E) ise cilt kapiller damarları dışında bazal koşullarda eksprese edilmez ancak inflamatuvar sitokinler tarafından hızlıca indüklenebilir ve endotel hücrelerinde üretilir (60).

Herbir selektin molekülü bir N-terminal lektin bölgesi, onu takiben epidermal growth faktör (EGF) benzeri bölge, bir transmembran bölgesi ve sitoplazmik uç içerir. Lektin bölgesi, sialikasitlenmiş Lewis X antijeni ile Ca bağımlı hücre hücre bağlantısı için gereklidir. Her selektin molekülü farklı sayıda komplementer regülör protein içerir ve L-selektinde 2, E-selektinde 6, P-selektinde 9 protein vardır.



Şekil-2. Selektin molekül yapısı (61)

Aynı ve farklı canlı türleri arasında, selektinler içerdikleri aminoasit zincirleri açısından küçük de olsa farklılıklar göstermektedirler.

Selektinler kendi aralarında yapısal olarak transmembran ve sitoplazmik bölgeleri dışında oldukça fazla benzerlik gösterirler. Şeker bağlanan lektin zincirleri benzer şeker yapıları bağlayarak benzerliklerini korurlar. Transmembran ve sitoplazmik bölgeleri sayesinde oluşan farklılıklar her üç selektin için farklı hedef bölgeleri olmasını sağlamaktadır; P-selektin için sekretuar granüller, E-selektin için plasma membranı, L-selektin için lökositler üzerindeki 'mikrofold' olarak tanımlanan küçük kıvrımların uçlarıdır.

Selektin Bağlayıcılar

Selektinler için birçok ligand adayı mevcuttur; ancak sadece P-selektin glikoprotein ligand 1 (PSGL-1) ayrıntılı olarak karakterize edilebilmiştir. PSGL-1, P-selektin bağlanmasında %90 sorumludur ve L-selektin ligandı olarak enflamatuar durumlarda buralara yapışmış lökositler ve fragmanları tarafından salınır (62). PSGL-1 aynı zamanda E-selektin de bağlar fakat major ligand değildir. E- selektin için bir spesifik ligand (ESL-1) identifiye edilmiştir ancak özellikleri henüz bilinmemektedir (63).

L-selektin ligandları sekonder lenfatik organların endotelial venüllerinde bulunur ve bunlara 'PNAd' (peripheral node adressins) adı verilir (64). Bunlar arasında 'padocalyxin' fizyolojik olarak en belirgin olanıdır (65). Diğerleri; Gly CAM-1 (periferik ve mezenterik lenf nodlarında), sgp 90 (=CD 34, pluripotent kök hücrelerinde), Mad CAM-1 (mukozal lenf nodunda)dir.

Lewis X de her üç selektin için ortak bir liganddır (66).

Selektinlerin Fonksiyonları

Bir organda lökositlerin toplanması birbirini takip eden olaylar şeklinde gelişir; önce lökositler yakalanır, ardından lökositlerin yuvarlanma hareketi oluşur , daha sonra yuvarlanma hızı azalır, sıkı yapışma ve transmigrasyon bu olayları izler (67). Selektinlerin enflamasyonun lökositleri yakalama, yuvarlanma ve yuvarlanma hızında azalma basamaklarında rolü vardır (68).

Lasky ve arkadaşlarına göre, L ve P-selektin beraberce endotel üzerinde lökositlerin karakteristik yuvarlanma hareketini başlatmaktadır. Bu ilk etkileşimden sonra E- selektin daha kuvvetli etki ederek, kan damarlarından lökositlerin lenfoid doku ve enflamasyon sahalarına ektravaze olmalarını sağlar (69).

L-selektini eksik olan farelerde enflamasyonda önemli derecede azalma vardır (62). P-selektini eksik olan farelerde ise nötrofil infiltrasyonunun 2-4 saat geciktiği ve hemostazda subklinik defektlerin olduğu izlenmiştir. Oysa ki E- selektin eksikliği halinde enflamasyon sürecinde bariz bir defekt görülmez, şüpheli değişiklikler farkedilir.

P-selektin monosit yuvarlanması ve arteriyal endotele adezyonunda rol oynar (70). Aktive plateletler monosit ve lökositlerin üzerindeki PSGL-1'i bağlayan P-selektini eksprese eder. Bu ilişki trombüsün organize olmasına yardım eden enflamatuvar hücrelerin biraraya gelmesinden sorumludur (71). Ek olarak P-selektinin fonksiyonu kan pıhtılaşma elementlerinden zengin yüzeyi olan monosit-derive mikropartiküllerin toplanmasıdır. Platelet P-selektin aterosklerotik lezyonda monosit-endotel etkileşiminde gereklidir (72). Fare modellerinde P-selektinin eksikliği halinde aterosklerozda azalma görülmektedir (70).

Anlaşılmıştır ki P-selektinin azalması trombüs olayı ile ilişkili olabilir. Buna karşılık fazlalığı ise trombüse eğilimi arttırabilir.

3. İMPLANTASYONDA ADEZYON MOLEKÜLLERİNİN ROLÜ

İmplantasyon, embriyo ve endometriumun birlikte, aktif olarak katıldığı dinamik bir hazırlık ve karşılaşma sürecidir.

Fertilizasyondan beş gün sonra, zona pellucida dökülür, blastosist uterus glandlarından salgılanan sekresyonlarla beslenerek genişler ve altıncı gün endometrium içine implante olmaya başlar (73). Bu dönemde endometrium menstrüel siklusun sekresyon fazındadır.

İmplantasyon, temel olarak *Apozisyon* (blastosistin, birçok önemli aşamadan geçerek uterusu ulaşması ve implantasyonun gerçekleşeceği uygun yeri seçmesi), *Adezyon* (ovulasyondan yedi-sekiz gün sonra, zonasından ayrılmış blastosistin, endometriyal epitel yüzeyine bağlanması) ve *İnvazyon* (embriyonik trofoblastın endometriumu penetre olması ve bazal membranı yok ederek stromaya girmesi) adı verilen üç bağlantılı ve ardışık evre sonucunda gerçekleşir.

Endometriyal reseptivite penceresi normal 28 günlük siklusu olanlarda 16-22, ekzojen gonadotropinlerle stimüle edilenlerde ise 16-19. günlerdir (74). Erken gebelik faktörü (EPF), immünoşüpresif etkili, hücre proliferasyonu ve büyümesi ile ilgili bir faktör olup, fertilizasyondan bir-iki gün sonra anne dolaşımına salınır. Bu faktör, önce anne tarafından sentezlenirken implantasyon sonrası embriyo tarafından üretilir (75). İmplantasyon, genellikle uterusun posterior duvarında olur.

Apozisyon ve Adezyon : Blastosist uterin sekresyonlar içinde yaklaşık bir-üç gün yani morula şeklinde uterin kaviteye gelişinden 2-4 gün sonraya kadar kalır ve ardından zona pellusidadan çıkarak (hatching) embriyoner kutupdan kavite duvarına yapışır. Hatching işlemi uterin kavitedeki sıvı komponentlerle gerçekleşir (76). Endometriumda sentezlenen sitokinlerden koloni stimulan faktör (CSF), lösemi inhibitör faktör (LIF), İnterlökin-1 (IL-1) implantasyon işleminde rol oynarlar (77). İmplantasyon sürecinde, tahmini ilk maternal

değişiklik blastosist etrafındaki kapillerlerde permeabilite artışıdır. Bu ise, endometriumun yüzey epitelinde blastosist tarafından heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) ekspresyonundaki değişikliğe bağlıdır (78). Osteopontin (OPN) ve ligand olan $\alpha V\beta 3$; endometrium ve embriyodan gelen sinyallerle invazyon öncesi apikal yüzeye embriyonun yapışmasında rol oynarlar ve bu iki proteinin farklı şekilde regüle edildiği düşünülmektedir. Progesteron implantasyon penceresinde endometriyal epitele doğrudan etki ederek OPN üretimini stimüle eder. HB-EGF ve diğer EGF molekülleri stroma aracılı parakrin mekanizmalarla epitelyal $\alpha V\beta 3$ üretimini artırırlar (79).

Adezyon işleminde ise integrinler ve selektinler rol oynar. β -1 integrinlerin üretimi implantasyon döneminde artmaktadır ve erken gebelik boyunca artmış olarak seyreder (80). Desidualize endometrium ve erken embriyo tarafından, başta laminin ve fibronektin olmak üzere üretilen ekstrasellüler matriks komponentleri hücre adezyonunu sağlarlar (81). Trofoblast ve ekstrasellüler matriks etkileşimi büyük ölçüde integrin ailesi adezyon reseptörlerine bağımlıdır (80).

Trofoblastik hücreler uterin duvardaki epiteli invaze etmeden önce blastokist ile uterus yüzey epiteli arasında etkileşim olması gerekir. Luteal fazda endometriumda bulunan L-selektin ligandları artmaktadır. Eşzamanlı olarak trofoblastik hücrelerdeki L-selektin ekspresyonu da artar (81).

İnvazyon ve plasantasyon: Ovulasyondan sonraki ikinci haftada plasantasyon başlar (82). Bu zaman sürecinde implantasyon bölgesinde trofoblastlar sito ve sinsisyotrofoblast olarak farklılaşır ve bu sırada maternal damarların invazyonu başlar. Embriyo tarafından salgılanan kollajenaz ve plazminojen aktivatörleri gibi enzimler intrasellüler matriksin eritilerek implantasyonun gerçekleşmesinde rol oynarlar (73). Erken trofoblast invazyonu için bazı integrinlerin ekspresyonu gerekir. Aktif migrasyon yapan trofoblast hücrelerinin integrin profili diğer trofoblastlardan farklıdır (82).

İntegrin ekspresyonundaki bu değişikliği sağlayan kontrol mekanizması bugün için tam bilinmemekle birlikte trofoblast invazyonunda anahtar düzenleyici olduğu düşünülmektedir.

Trofoblast hücrelerinin vasküler invazyonu ve vasküler endotelin endovasküler trofoblast ile yer değiştirmesi selektinler yardımı ile gerçekleşir (82). Trofoblastlar maternal endotel ile yer değiştirdikçe, trofoblastın adezyon peptidlerinin reseptör profili endotel hücrelerine benzer şekilde değişir (83). Preeklampitik gebelerde ise bu işlem sınırlı olup, endotelyal adezyon reseptörlerine dönüşüm yetersizdir (84).

E-kaderini pozitif olan stromal hücreler, trofoblastın stromaya invazyonunda rehber olan epitelyal hücreler gibi davranırlar. Invazyonun mezometriyal kutuptan antimezometriyal kutba ilerlemesinin devamlılığı E-kaderin ekspresyonunun değişmesiyle bağlantılıdır. İmplantasyonun gerçekleşmesinde, E-kaderin gibi adezyon molekülleri trofoblastın endometriyuma hücre göçünün devamında ve sınırlandırılmasında kritik rol oynarlar (85).

Kaderinlerin fonksiyonlarını etkileyen kalsitosinin ratlarda eksojen olarak uygulanmasıyla, gebe ratların endometriyum epitelinde E-kaderinin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (86). Bu nedenle kalsitoninin implantasyon boyunca, E-kaderin gibi bağlantı komplekslerinin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (87).

Endometriyal stromal kompartmanın invazyonu, bazal tabakanın açılması ve maternal kan damarlarının penetrasyonu serin proteazları ve metalloproteazlar tarafından düzenlenmektedir. Serin proteazları bir çeşit plazminojen aktivatörüdür ve plazmin sağlayarak metalloproteinazları da aktive eder. Plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) desidual hücrelerin önemli bir ürünüdür. Trofoblast invazyonu başta PAI-1 ve doku metalloproteinaz inhibitörleri olmak üzere proteinaz inhibitörleri ile sınırlanır (88). Desidual Transforming growth faktör β (TGF- β), doku metalloproteinaz

inhibitörleri ve PAI-1 ekspresyonu sağlayarak trofoblast invazyonunun sınırlandırılmasında anahtar rol oynar (89).

Embriyonun endometriumuna adezyonunda rol oynadığı düşünülen selektinler bu çalışmanın ana konusunu oluşturmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma prospektif, kontrollü bir araştırma olarak Manisa Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde yapıldı. Mart 2003-Şubat 2004 tarihleri arasında missed abortus yada tahliye istemi endikasyonları ile kürete edilen toplam 80 hasta çalışmaya alındı. Missed abortus grubunda 5 hasta, ortalama 3 gebelik kayıplarıyla tekrarlayan gebelik tanısı almış hastalardan oluşuyordu.

Çalışmaya dahil etme kriterleri:

Missed abortus vakalarında, 20 haftadan küçük gebelik olma ultrasonografi ile fetal kalp hareketin görülememesi kriter olarak alındı. Bu grupta 6-11 haftalar arası gebelikler vardı.

Tahliye istemi ile başvuran hastalarda, 10 haftadan küçük (yasal sınırlama nedeniyle) gebelik olması, fetal kardiyak aktivitenin görülmesi ve gebelik kesesinin normal olarak değerlendirilmesi kriterimizdi ve bu grup normal gebelik olarak isimlendirildi.

Kronik inflamatuvar hastalık, diabetes mellitus, kollogen doku hastalığı, akut ve kronik enfeksiyonu olan ve yakın zamanda antikoagulan ve antiagregan tedavi alan hastalar çalışma kapsamına alınmadı.

Gruplar:

1. Missed abortus grubu (n=40): ortalama gebelik haftası 8(6-11)
2. Normal gebelik grubu (n=40): ortalama gebelik haftası 7(5-9)

Her iki grup hastayada maske anestezisi altında dilatasyon & küretaj uygulanıp patolojik inceleme için alınan materyalden bir kısmı formollü solüsyona konarak ayrıldı.

DENEYSEL GEREÇ VE YÖNTEM

IŞIK MİKROSKOBİK GEREÇ VE YÖNTEMİ

Parafin Takibi

- 1- Fiksasyon: 24-48 saat % 10 formalin
- 2- 24 saat akarsuda yıkama
- 3- %60 etil alkol 30 dk
- 4- %70 etil alkol 30 dk
- 5- %80 etil alkol 30 dk
- 6- %95 etil alkol 30 dk
- 7- %100 etil alkol I'de 1 saat
- 8- %100 etil alkol II'de 1 saat
- 9- ksilen-alkol'de 30 dk
- 10- ksilen I' de 45 dk
- 11- ksilen II'de 45 dk
- 12- ksilen-parafinde 30 dk
- 13-60°C'lik etüvde erimiş parafinde 1 saat
- 14- parafin II'de 1 saat
- 15- parafin III'de 1 saat bekletildiler

Etüvden çıkarılan parçalar parafine gömülerek bloklandı. Işık mikroskopunda incelemek üzere hazırlanan parafin bloklardan 5 mikronluk seri kesitler alındı. Preparatların ilk bölümüne histokimyasal yöntemlerle Hematoksilen-Eosin (Lot = 110203 & Lot = 090203, Surgipath) ile boyandı. Seri kesitlerin diğerlerine ise immünohistokimya boyaması yapıldı.

Histokimyasal boyama için ayrılan preparatlar 60 °C'lik etüvde 1 gece deparafinize edildi.

Hematoksilen-Eozin Boyası

1-Ksilen I	30 dk
2-Ksilen II	30 dk
3-% 95 alkol	2 dk
4-%80 alkol	2 dk
5-%70 alkol	2 dk
6-%60 alkol	2 dk
7-Akar su	5 dk
8-Hematoksilen	3 dk
9-Akarsu	5 dk
10-Asit-alkol	1 sn
11-Akarsu	2 dk
12-Eozin	4 dk
13- %80 alkol	2 dk
14-%95 alkol	2 dk
15-Ksilen	30-60 dk
16-Entellan ile kapama	

İNDİREK İMMÜNOHİSTOKİMYA YÖNTEMİ

Kullanılan Malzemeler:

Ksilen

Alkol

PBS (Fosfat Buffer Solusyonu)

Sitrat buffer (50 ml Sitrat +450 ml Distile su)

Dakopen (Dako, Lot = 8260, Glostrup, Denmark)

%3 Hidrojen Peroksidaz (Dako, Lot = 438, Denmark)

Primer Antikor CD62L (L-selectin) (NCL-CD62L-489, Novocastra, UK)

Primer Antikor CD62E (E-selectin) (NCL-CD62E-382, Novocastra, UK)

Primer Antikor CD62P (P-selectin) (NCL-CD62P-367, Novocastra, UK)

Sekonder Antikor Kit (Biotinylated IgG, Lot = 20570999, Zymed, South San Francisco)

Mayers Hematoksilen (Lot = 72804E, Richard- Allan Scientific,CA)

Entellan (Lot = 1866, Merck)

Boyama Yöntemi

İmmunohistokimyasal yöntemle boyanacak preparatlar 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilip deparafinizasyon yapıldıktan sonra boyama başlatıldı.

- | | |
|---------------|-------|
| 1- Ksilen | 30 dk |
| 2- Ksilen | 30 dk |
| 3- % 95 alkol | 2 dk |
| 4- %80 alkol | 2 dk |
| 5- %70 alkol | 2 dk |
| 6- %60 alkol | 2 dk |
- 7- Kesitler sitrat buffer içinde mikrodalga fırında 600V 6 dakika kaynatıldı.
- 8- Distile su 5 dk
- 9- Distile sudan alınan kesitlerin doku etrafındaki su silinip, Dakopenle çevresine daire çizildi. Bu işlem dokuların kurumasını engellemek ve uygulanacak maddelerin lam üzerinde dağılmasını engellemek amacıyla yapıldı. Üzerine PBS damlatıldı.
- 10- PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
- 11- %3'lük Hidrojen Peroksidaz'da 5 dakika tutuldu.
- 12- PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
- 13- Blocking solution damlatıldı, 1saat bekletildi.
- 14- Dokulara Primer Antikor damlatıldı 1 saat bekletildi. (Bizim çalışmamızda primer olarak CD62P, CD62L, CD62E kullanıldı)
- 15- PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).

- 16-Biyotinlenmiş sekonder antikor uygulandı.(Zymed Histostain- Plus Broad Spectrum Cat No:85-9943) 30dk
 - 17- PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
 - 18-Enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) 30 dk uygulandı.
 - 19-PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
 - 20-DAP boyaması yapıldı 3 dk.
 - 21-Distile su ile yıkandı.
 - 22-Mayers hematoksilenle zıt boyama yapıldı 1-2 dk.
 - 23-Distile su ile yıkandı
 - 24-%80 etil alkol 2 dk.
 - 25-%90 etil alkol 2 dk.
 - 26-Ksilen 30 dk.
 - 27-Entellan ile kapatıldı.
- İmmunohistokimyasal yöntemle boyanan preparatlar, boyanma derecelerine göre kuvvetli (+++), orta (++) , zayıf (+) ve çok zayıf (+/-) diye tanımlandı. Preparatlar iki histolog tarafından değerlendirildi.

BULGULAR

1.Histolojik Bulgular

Normal gebelik grubu:

Normal gebelik grubuna ait ışık mikroskopik incelenmesinde doku örneklerinin villus ve desiduanadan oluştuğu tespit edildi. Desidua içine uzanan villusların merkezinin muköz bağ doku ile dolu olduğu gözlemlendi. Muköz bağ dokunun iki temel elemanının amorf hücreler arası madde ve mezenşimal hücreler olduğu gözlemlendi. Mezenşimal hücrelerin ince sitoplazmik uzantıları ile bir ağ yapısı oluşturduğu gözlemlendi. Villusların içinde mezenşimal hücrelerin yanı sıra makrofaj benzeri fonksiyon gösterdiği ileri sürülen Hofbauer hücreleri de izlendi. Bu hücreler yuvarlak nükleusları ve daha büyük yapıları ile mezenşimal hücrelerden farklı özellikler göstermekteydi. Villuslar dıştan iki tabakalı sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblast hücreleri tarafından çevrelenmekteydi. Sitotrofoblast hücrelerinin birbirlerine bağlanmış olduğu ve hücrelerin çok sayıda mitoz gösterdikleri tespit edildi. Sinsisyotrofoblastların, sitotrofoblastlara göre daha koyu nükleusa sahip olduğu gözlemlendi. Sinsisyotrofoblastların hücre sınırlarının net olarak ayırt edilemediği ve bazı bölgelerde asidilofilik fibrinoid madde ile yüzeylerinin kaplandığı görüldü.

Endometrial stromal hücrelerin desidual hücrelere dönüşmüş olduğu, bu hücrelerin açık pembe sitoplazmaya ve eukromatik bir nükleusa sahip olduğu görüldü. Desidual hücrelerin arasında çok sayıda kan damarı gözlenirken, az sayıda bez yapıları da gözlemlendi. Desidual hücreler arasında oldukça büyük, çok nükleuslu sinsisyotrofoblastların varlığı daikkat çekici bulundu. Desiduanın stromasında ayrıca çok sayıda fibroblast ve lenfosit gözlemlendi. Nötrofiller ise yine stroma içine dağılmış olarak az sayıda görüldü.

Missed abortus grubu:

İçi mezenşimal doku ile dolu olan villusların çevresi sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblast hücrelerince sarılmış ve iki sıralı bir yapı olarak gözlendi. Normal gebelik grubundan farklı olarak sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblastların oluşturduğu tabakanın daha kalın olduğu tespit edildi. Bazı villusların fibrinoid materyalle sarılı olduğu gözlendi. Mukoz bağ dokusu içinde bulunan mezenşimal hücre sayısında hafif bir azalma tespit edildi. Desiduaya bakıldığında ise stromal hücrelerdeki desidualizasyonun tahliye grubuna göre daha az olduğu gözlendi. Mitotik aktivite daha seyrek görüldü. Çok nükleuslu sinsisyotrofoblastlar tahliye grubundakilerle kıyaslandığında sayıca daha çok bulundu.

2.İmmünohistokimyasal Bulgular

Normal gebelik grubu:

L-Selektin;

Normal gebelik grubunun L-selektin monoklonal antikoru ile boyanmış preparatların incelenmesinde villusları dıştan çevreleyen sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblastların (+++) immunoreaktivite gösterdiği dikkat çekici bulundu. Villusların merkezindeki mezenşimal hücrelerde çok hafif bir (+/-) boyanma gözlendi.

Desidual hücrelerde boyanmanın oldukça az olduğu (+) tespit edildi. Endometrial bez yapılarında ise boyanma orta derecede (++) gözlendi. Stromadaki sinsisyotrofoblastlar ise boyanma oldukça az (+) gözledi.

P- Selektin;

Villusta bulunan sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblast hücrelerinde boyanma oldukça az (+) olarak saptanırken, villusun mezenşimal dokularında boyanma gözlenmedi.

Desidual hücrelerde boyanmanın çok hafif (+/-) olduğu, bez yapı ve sinsisyotrofoblast hücrelerde ise boyanma olmadığı (-) saptandı.

E- Selectin:

Villusta sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblastlarda boyanma orta derece (++) gözlemlendi. Mezenşimal dokuda boyanma az (+) miktarda gözlemlendi.

Desidual hücrelerde boyanma çok az (+/-) olarak saptandı. Bez yapılar için de aynı tanım geçerliydi (+/-). Desidual sinsisyotrofoblastlarda boyanma (-) olarak gözlemlendi.

Missed abortus grubu:

L- Selektin:

Villustaki sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblastların az miktarda boyandığı (++) gözlemlendi. Villus içi yapılarda çok hafif bir immünoreaktivite (+) gözlemlendi.

Endometrial desidual hücrelerin boyanması orta derecede (++) gözlemlendi. Desidual sinsisyotrofoblastlar L-selektin ile (++) olarak boyandığı tespit edildi. Bez yapılarında boyanma (-) gözlenmedi.

P-Selektin:

Sinsisyotrofoblast ve sitotrofoblastlarca meydana getirilen iki katlı yapının boyanması (+/-) olarak tanımlandı. Villus içi mezenşimal yapılarda boyanma (-) gözlenmedi.

Desidual hücrelere bakıldığında boyanmanın (+/-) olduğu görüldü, desidual bez yapılarda boyanma (-) gözlenmedi.

E-Selektin:

Villusta iki katlı dış tabakada bulunan sito ve sinsisyotrofoblastlarda boyanma (+) iken iç mezenşimal dokularda boyanmaya (-) rastlanmadı.

Desidual stromada ve desidual sinsisyotrofoblastlardaki boyanmada (+) olarak tanımlandı.

İMMUNOHİSTOKİMYASAL SONUÇLAR:

	Normal gebelik	Missed abortus
L-SELEKTİN	+++	++
P-SELEKTİN	+	+/-
E-SELEKTİN	++	+

Tablo1: Villusta bulunan sito ve sinsisyotrofoblastların gösterdikleri immunreaktivite

	Normal gebelik	Missed abortus
L-SELEKTİN	+	++
P-SELEKTİN	+/-	+/-
L-SELEKTİN	+/-	+

Tablo2: Desidual hücrelerin gösterdiği immunreaktivite

TARTIŞMA

Gebeliklerin %12-15'inin birinci trimesterde abortus ile sonuçlandığı bilinmektedir (3,4). Subklinik abortuslarla birlikte bu oran % 60' lara çıkmaktadır (5). Başta genetik faktörler olmak üzere enfeksiyonlar, endokrin problemler, anotomik anomaliler, metabolik sebepler, trombofili, immunolojik olaylar etiyolojide suçlanan faktörlerdir. Reprodüktif çağ kadınlarının % 1' ini etkileyen tekrarlayan abortusların % 50' sinde ise neden bilinmemektedir (6).

Vücutta inflamatuvar ve immun yanıtta önemli rol üstlenen adezyon moleküllerinden biri olan selektinler, inflamasyon ve immun yanıtta endotelial hücreler ve lökositler arasında heterofilik etkileşimlere aracılık etmektedirler. Başta lenfositler olmak üzere granülosit monositler tarafından üretilen L-selektin ve endotel hücrelerinin Weibel-palade cisimcikleri ve plateletlerin alfa granüllerinde bulunan P-selektin, endotel üzerinde lökositlerin karakteristik yuvarlanma hareketini başlatır. Bu iki etkileşimden sonra endotel hücrelerinde üretilen E-selektin daha kuvvetli etki ederek, kan damarlarından lökositlerin lenfoid doku ve enflamasyon sahalarına ekstrasvaze olmalarını sağlar (61). Anlaşılan odur ki; bu adezyon moleküllerinin ana görevi lökosit hareketlerini düzenleyerek immunolojik yanıt oluşturabilmektir (90).

İmplantasyonun adezyon basamağında L-selektinin yer aldığı gösterilmiştir; trofoblastik hücreler uterin duvardaki epiteli invaze etmeden önce blastokist ile uterus yüzey epiteli arasında olması gereken geçici etkileşim için luteal fazda L-selektin ligandları endometriumda artmaktadır. Aynı anda trofoblast hücrelerinde L-selektin ekspresyonun artması implantasyonun bu aşamasının gerçekleşmesini sağlar. Bu çalışma bize serbest olarak yüzen embriyonun uterusu implantasyonu ile lökositlerin ekstrasvasyonu arasında çarpıcı bir paralellik olduğunu göstermektedir (81).

Blastokistin uterusu adezyon yapabilmesi için selektin ligandlarının uygun zaman ve l kalizasyonda olması gerekmektedir.

Aktive plateletler monosit ve lökositlerin  zerindeki PSGL-1' i bağlayan P-selektini eksprese etmektedir ve bu ilişki trombüsün organize olmasına yardım eden enflamatuar hücrelerin biraraya gelmesinden sorumludur (71). Anti-P-selektin antikorunun trombüs formasyonunu inhibe ettiği gösterilmiş ve böylece P-selektinin trombüs oluŐumunda rol oynadığı kanıtlanmıŐtır (91,92). Sonuçta; artmış P-selektin değerleri, vasküler olaylar ve derin ven trombozu riski ile iliŐkilidir (93). Transgenik maymunlarda yapılan daha sonraki çalışmalarda s P-selektinin (soluble P-selektin) endotel hücre veya platelet aktivasyonunun basit bir belirteci olmaktan ziyade prokoag lasyonun direk tetikleyicisi olarak, koagülasyonun endojen aktivatörü olduğu kanısına varılmıŐtır (94).

Takip eden çalışmalarda s P-selektin değerleri ile ilgili farklı iliŐkiler bulunmaya çalıŐılmıŐ ve preeklampsi gelişen gebelerin çoğunda ilk trimesterde P-selektin değerlerinin yükseldiği tespit edilmiŐtır (95).

Gebeliğin de hiperkoag lasyona yol açan ve artmış venöz tromboembolizm riski taŐıyan bir olay olduğunu düşünerek, Holmes ve arkadaşlarının sağlıklı gebeler ve gebe olmayan kontrol grubunu karŐılaŐtırarak yaptığı çalışmada; gebe kadınlarda P-selektin değerlerini 2. ve 3. trimesterde belirgin olarak artmış olarak buldular. Bu artıŐa aktive plateletler yol açmaktadır. s P-selektin, platelet aktivasyonu göstergesi olması yanısıra prokoag lasyon durumunun da direk tetikleyicisidir (96). Ayrıca bu çalıŐmayla sağlıklı gebeliklerde serum P-selektin değerleri de ortaya konmuŐ oldu.

Acar ve arkadaşlarının sağlıklı gebe, missed abortus, preeklampsi ve gebe olmayan kontrol grubundan oluşan 56 kadın üzerinde, serum P, L, E-

selektin düzeylerine bakarak yaptıkları çalışmada; P ve L-selektinlerin plazma yoğunlukları sağlıklı gebelerde ve preeklampsilerde kontrol grubuna göre önemli oranda daha yüksek bulunmuş. E-selektinin plazma konsantrasyonlarında ise bu gruplar arasında ayırt edici bir fark göze çarpmamış. Tüm selektinlerin plazma düzeyleri missed abortuslularda kontrol grubuna göre daha yüksek saptanırken, P-selektinin düzeyi preeklampsilerde normal gebelerden çok daha yüksek, L- selektin de preeklampsi ve missed abortuslularda sağlıklı gebelerden daha yüksek bulunmuştur (97).

Immunohistokimyasal metodla, sağlıklı gebelik ve spontan abortusların P ve E- selektin açısından değerlendirildiği bir başka çalışmada; spontan abortuslu hastalardan elde edilen örneklerin P-selektin içeren damarlar açısından güçlü boyanma gösterdiği, E-selektinin ise zayıf eksprese olduğu ve normal gebeler ve spontan abortuslular arsında fark olmadığı tespit edilmiştir (98).

Bizim yürüttüğümüz çalışmada, adezyon moleküllerinin inflamatuvar ve immun yanıtta rol oynamaları ve bu süreçleri içeren kronik inflamatuvar hastalıklar, derin ven trombozu, diabetes mellitus, enfeksiyon gibi hastalıklarda düzeylerinin artabileceği göz önünde bulundurularak, bu tür problemler açısından hastalar sorgulanarak, eleme yapıldı.

Çalışmamızda immunohistokimyasal yöntemle hem villuslar hem de desidua L, P, E-selektin açısından ayrı ayrı boyanarak değerlendirildi. Trofoblastlar üzerinde L- selektin ekspresyonu, tahliye istemi ile sonlandırılan (normal gebelik grubu) gebeliklerde missed abortus grubuna göre daha fazla tespit edildi (+++/++). Bu, Genbacev ve arkadaşlarının implantasyonun fetal yüzünde trofoblastların L-selektin eksprese ettiğini gösterdikleri çalışmalarıyla uyumludur (81). İmplantasyon sırasında, trofoblastların adezyonu

gerçekleştirebilmeleri için yeterli düzeyde ve doğru zamanda L-selektin eksprese etmeleri gerektiğini söyleyebiliriz.

Acar ve arkadaşlarının (97) maternal plazmada elde edilen L-selektin düzeyleri missed abortus grubunda sağlıklı gebelere göre daha yüksek olduğunu göz önünde bulundurarak, bizim L-selektin için elde ettiğimiz sonuçları değerlendirecek olursak; implantasyonun fetal yüzünde (villuslar) normal gebeliklerde daha güçlü L-selektin ekspresyonu olurken (+++/++), maternal yüzde (desidua) missed abortus grubunda daha güçlü ekspresyon elde edildi (++/+). Bu da yine literatürle uyumlu görülmektedir.

Çalışmamızın literatürden farklı yanı P ve E-selektin değerlerinde karşımıza çıktı. Zenclussen ve arkadaşları desiduada P-selektin değerlerini spontan abortuslularda daha yüksek, E-selektin değerlerini ise spontan abortus ve sağlıklı gebeliklerde ise aynı düzeyde bulmalarına karşın, Biz P-selektin ekspresyonunu her iki grupta benzer (+/-/-), E-selektin ekspresyonunu ise missed abortus grubunda daha fazla bulduk (+/-/-).

P-selektinin trofoblast düzeyinde ekspresyonunda da yine beklenmedik sonuçlarla karşılaştık. P-selektinin yüksek düzeylerinin trombotik olaylarla ilişkili olduğunu düşünerek, missed abortus grubunda villuslarda P-selektin ekspresyonunu normal gebeliklerden daha fazla bulmamız gerekirken, biz missed abortus grubunda daha düşük düzeyde bulduk (+/-/-).

Şunu da belirtmeliyiz ki; missed abortus grubunu oluştururken her gebelikde fetal yada embriyonal ölümün üzerinden ne kadar süre geçtiğini bilmiyoruz. Farklı süreler uterus içerisinde sonlanmış halde kalmış, gebelik ürünlerinden yararlanıldı. Zaman farklılıkları da gerek villus gerekse desidua üzerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu değiştirebilir.

Dikkatimizi çeken bir nokta villuslarda en zayıf P-selektin, en güçlü L-selektin olmak üzere her üç selektin de normal gebeliklerde missed abortus grubuna göre daha güçlü eksprese olmuşlardı. Bunu selektinlerin tümü implantasyonda yer almakta ve yeterli plasentasyonun göstergesi olabilirler şeklinde yorumlamak mümkündür.

Desiduada ise tam tersine P-selektin düzeylerinde farklılık olmamasına rağmen L ve E-selektin ekspresyonunun missed abortus grubunda daha yüksek olmasını abortus sürecinde gelişim olaylara; endotel hasarlanmasına ve lökositlerin aktivasyonuna bağlamak yerinde olacaktır.

Sonuç olarak diyebiliriz ki; selektinler, implantasyon sürecinde varlıkları ve rolleri her geçen gün daha fazla anlaşılan adezyon moleküllerinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadırlar. Doğru zaman ve yeterli miktarda ekspresyonları ile implantasyon ve plasentasyon gerçekleşmekte, aksi halde yetersiz trofoblast invazyonu sonucu erken gebelik kayıpları ve bazen de preeklampsi ile kiniğe yansımaktadırlar. İnfertilite ve erken gebelik kayıplarında açıklanamayan sebeplerin bir kısmını oluşturan selektin adezyon moleküllerindeki defektlerin anlaşılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

ÖZET

İnfertilite ve erken gebelik kayıplarında açıklanamayan sebeplerin bir kısmını –selektin adezyon sistemindeki defektler oluşturmaktadır. İmplantasyon oldukça karmaşık, birbirini izleyen olaylar zinciridir ve adezyon moleküllerinin farklı tiplerinin implantasyonun farklı basamaklarında yer aldıkları artık günümüzde bilinmektedir.

Bu çalışmada gebelik kayıplarında adezyon moleküllerinden selektinlerin rolünü gösterebilmek amacıyla, isteği üzerine gebeliğini sonlandıran ve missed abortus tanısıyla kürete edilen kadınların küretaj materyallerinden sağlıklı gebelik ve missed abortus adı altında her biri kırk kişilik iki grup oluşturduk. İmmunohistokimyasal yöntemle desidua ve villuslarda L, P, E-selektinlerin ekspresyonlarını değerlendirdik.

L-selektinin villuslarda sağlıklı gebeliklerde ekspresyonu daha fazla iken (+++/++), desiduada ise missed abortus grubunda daha güçlü idi (++/+). P-selektin villuslarda normal gebelik grubunda daha fazla eksprese olurken (+/+), desiduada ise her iki grupta farklılık yoktu (+/+/-) ve zayıf eksprese olmuştu. E-selektin ise villuslarda sağlıklı gebeliklerde daha fazla düzeyde boyanırken (++/+), desiduada missed abortus grubunda daha fazla tespit edildi (+/+/-). L ve E-selektin düzeyleri her iki bölgede de paralellik gösteriyordu.

Bulgularımıza göre, her üç selektinin de villuslarda normal gebeliklerde missed abortus grubuna göre daha güçlü eksprese olmalarını; selektinler implantasyonda yer almakta ve güçlü plasantasyonun göstergesi olabilirler, şeklinde yorumlayabiliriz. Desiduada ise özellikle L ve E-selektinin missed abortus grubunda daha güçlü boyanmasını ise gebelik kaybı sırasında oluşan endotel hasarı ve lökosit aktivasyonuna bağlayabiliriz.

Sonuç olarak, gebelik kayıplarında bilinmeyenlerin ortaya çıkarılabilmesi ve adezyon moleküllerinin bu olaylardaki fonksiyonlarının anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

ABSTRACT

Defects in selectin adhesion system generates some unexplained causes to miscarriage and infertility. Implantation is a quite complicated chain of consecutive incidents. Nowadays it is well known that implantation of different type of adhesion molecules take place in different phases.

In order to represent the role of selectin molecules in miscarriages, we built up two groups of 40 women who had ended their pregnancy by their will through abortion and/or whose pregnancy were aborted because of missed abortion. In this research, we have examined the expression of L, P, E-selectins in decidua and villus through immunohistochemical method.

The expression of L-selectin in villus is observed to be more in healthy pregnancies (+++/++), whereas it is observed to be more at the group of missed abortion in the decidua (++/+). While P-selectin in villus was expressed more at group of normal pregnancy (+/+), it was expressed equally and weaker in decidua at both groups of women (+/+). Furthermore, E-selectin in villus is observed to be painted in higher level at the group of healthy pregnancy (++/+), however it is observed more often in decidua at the group of missed abortion (+/+). In addition, in both areas, villus and decidua, levels of E- and L-selectin were parallel to each other.

According to our findings, the fact that each of the three selectins in villus are expressed stronger at the group of healthy pregnancy than the group of missed abortus can be interpreted as an argument supporting the thesis that selectins play an important role at implantation and selectins are an indication of a healthy placenta. We can relate the fact that L- and E-selectin are painted more obvious especially in decidua at the group of missed

abortus to the activation of leukosit and damage of endotelium occuring during the abortion of pregnancy.

As a consequence, more research is needed in order to figure out the unknown causes and consequences of abortion of pregnancies and comprehend better how the adhesion molecules function at these incidents.

KAYNAKLAR

1. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'JF, et al. Incidence of early loss of pregnancy. N Eng J Med 1988; 319: 189-94
2. Regan L, Braude PB, Treambath PI. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. British Medical Journal 1989; 299: 541-45
3. Chard T. Frequency of implantation and early pregnancy loss in natural cycles. Baillieres Clinical Obstetrics and Gynecology 1991; 5: 179-89
4. Connor Pernoll ML. Current of Obstetric and Gynecologic Diagnosis and Treatment. In: Durfee RB, Pernoll LM, eds. Early pregnancy risks, 7th ed. USA: Prentice-Hall International Inc, 1991: 300-1
5. Edmonds DK, Lindsay, Miller JF. Early embryonic mortality in women. Fertil Steril 1982; 38: 447-53
6. Stirrat GM. Recurrent miscarriage. II. Clinical associations, causes and management. Lancet 1990 ; 22 : 728-733
7. Daniel A, Hook EB, Wolf G. Risks of unbalanced progeny at amniocentesis of carriers of chromosome rearrangements: Data from United States and Canadian laboratories. Am J Hum Genet 1989 ; 33 : 14-53
8. Nasseri A, Mukherjee T, Grifo JA et al. Elevated day 3 serum follicle stimulating hormone and/or estradiol may predict fetal aneuploidy. Fertil Steril 1999 ; 71 : 715-8
9. Ogasawara M, Aoki K, Okada S et al. Embryo karyotype of abortuses in relation to the number of the previous miscarriage. Fertil Steril 2000; 73 : 300-4
10. Hill JA. Sporadic and recurrent spontaneous abortion. Curr Probl Obstet Gynecol Fertil 1994; 167 : 114-62

11. Summers PR, Microbiology relevant to recurrent miscarriage. Clin Obstet Gynecol 1994; 34 : 722-29
12. Hay PE, Lamont RF, Taylor-Rabinson D et al. Abnormal bacterial colonization of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. BMJ 1994; 308 : 295-98
13. Witkin SS and Ledger WJ, Antibodies to chlamydia trachomatis in serum of women with recurrent abortion. Am. J Obstet Gynecol 1992; 167 : 135-9
14. Csapo AI, Pulkkinen MO., Ruttner B, Sauvage JB., Wiest WG. The significance of the corpus luteum in pregnancy maintenance. I- Preliminary Studies. Am J Obstet Gynecol 1972; 112 : 1061-7
15. Karamordian LM and Grimes DA, Luteal phase deficiency: effect of treatment on pregnancy rates. Am J Obstet Gynecol 1992; 167 : 1391-8
16. Li TC, Tuckerman EM and Laird SM, Endometrial factors on recurrent miscarriage. Hum Reprod Update 2002; 8: 43-52
17. Waston H, Kiddy DS, Hamilton-Fairley D et al. Hypersecretion of luteinizing hormone and ovarian steroids in women with recurrent early miscarriage. Hum Reprod 1993; 8: 829-33
18. Clifford K, Rai R, Waston H et al. Does suppression luteinizing hormone secretion reduce the miscarriage rate ? Result of a randomized controlled trial. BMJ 1996; 312:1508-11
19. Malkawi HY, Quablan HS, Hamaiden AH. Medical versus surgical treatment for clomiphene- citrate resistant women with polycystic ovary syndrome. J Obstet Gynecol 2003; 23: 289-93
20. Green MF, Hare JW, Cloherty JP et al. First trimester hemoglobin A1c and risk for major malformation and spontaneous abortion in diabetic pregnancy. Teratology 1989; 39: 225-31
21. Miller E, Hare JW, Cloherty JP et al. Elevated maternal hemoglobin A1c in early pregnancy and major congenital anomalies in infants of

- diabetic mothers. *N Engl J Med* 1981; 304: 1331-4
22. Hirahora E, Andoh N, Sawai K et al. Hyperprolactinemic recurrent miscarriage and results of randomized bromocriptine treatment trial. *Fertil Steril* 1998; 70: 246-52
23. Pralt D, Novotny M, Kaberlein G et al. Antityroid antibodies and the association with non-organ-specific antibodies in recurrent pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168 : 827-41
24. Homer HA, Li TC and Cooke ID. The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertil Steril* 2000; 73 : 1-17
25. Rosati P, Bellati U, Exacoustos C. et al. Uterine myoma in pregnancy: ultrasound study. *Int J Gynecol Obstet* 1989; 28 : 109-17
26. Li TC, Mortimer R, Cooke ID et al. Myomectomy: a retrospective study to examine reproductive performance before and after surgery. *Hum Reprod* 1999; 14 : 1735-40
27. Bajekal N and Li TC. Fibroids, infertility and pregnancy wastage. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 614-20
28. Rai R, Clifford K and Regan L. The modern preventative treatment of recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynecol* 1996; 103 : 106-110
29. Li TC, Tuckerman EM and Laird SM. Endometrial factors in recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 2002; 8 : 43-52
30. Nelen WLD, Blom HJ, Steegers EA et al. Hyperhomosysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2000; 74 : 1196-9
31. Quere I, Mercier E, Bellet H et al, Vitamin supplementation and pregnancy outcome in women with early pregnancy loss and hyperhomosysteinemia. *Fertil Steril* 2001; 75 : 823-5
32. Foschi F, Diani F, Zaridini E et al. Celiac disease spontaneous abortion. *Minerva Gynecol* 2002; 54 : 151-9
33. Sarig G, Younis JS, Hoffman R et al. Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late

- pregnancy wastage. *Fertil Steril* 2002; 77 : 342-
34. Levine JS, Branch W, and Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002; 346 : 752-64
 35. Haywood L, Brown MD. Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol* 1991; 34 : 1-17
 36. Empson M, Lassere M, Craig JC et al. Recurrent pregnancy loss with antiphospholipid antibody: a systematic review of therapeutic trials. *Obstet Gynecol* 2002; 99 : 135-44
 37. Lim KJH, Odukoya OA, Li TC and Cooke ID. Cytokines and immunendocrine factors in recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 1996; 2 : 469-81
 38. Scott JR, Rote NS, Branch DW. Immunological aspects of recurrent abortion and fetal death. *Obstet Gynecol* 1987; 70 : 645-5
 39. Christiansen OB. A fresh look at the causes and treatment of recurrent miscarriage, especially its immunological aspects. *Hum Reprod Update* 1996; 2 : 271-9
 40. Takakuwa K, Kanazawa K and Takeuchi S. Production of blocking antibodies by vaccination with husband's lymphocytes in unexpected recurrent aborters: the role in successful pregnancy. *Am J Reprod Microbiol* 1986; 10 : 1-9
 41. Johnson PM, Chrismas SE, Vince GS. Immunological aspects of implantation and implantation failure. *Hum Reprod* 1999; 14 : 26-3
 42. Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F et al. Circulating cytokines and CD30 in normal human pregnancy and recurrent spontaneous abortions. *Hum Reprod* 2000;15: 2011-17
 43. Daya S and Gunby J. The effectiveness of allogenic leukocyte immunisation in unexplained primary recurrent spontaneous abortion. Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialists Group. *Am J Reprod Immunol* 1994; 32 : 294-302
 44. Ober C, Karrison T, Odem RR et al. Mononuclear-cell immunisation

- in prevention recurrent miscarriage: a randomised trial. *Lancet* 1999; 354 : 365-9
45. Choi BC, Polgar K, Xiao L and Hill JA. Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2000; 15 : 46-59
 46. Polifka Jje, Friedmann JM. Environmental toxins and recurrent pregnancy loss. *Infert Reprod Med Clin North Am* 1991; 2 : 195-213
 47. Mills JL, Holmes LB, Aorans JH et al. Moderate caffeine use and the risk of spontaneous abortion and intrauterine growth retardation. *JAMA* 1993; 269 : 593-7
 48. Armstrong BG, McDonald AD and Sloan M. Cigarette, alcohol and coffee consumption and spontaneous abortion. *Am J Publ Health* 1992; 82 : 85-87
 49. Kwki T, Ylikorkola O. Coitus during pregnancy is not related to bacterial vaginosis or preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 1993 ; 69: 1130-4
 50. Thiery JP. Cell adhesion in development: a complex signaling network. *Current Opinion in Genetics and Development* 2003; 13 : 365-71
 51. Tian L., Catt JW., O'Neill C., King NJ. Expression of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules on murine embryonic stem cells, *Biol. Repred.* 1997; 57 : 561-8
 52. Garnet A., Humphries M. A good article an integrating signaling and binding. *Acta Anat* 1995; 154 : 34-35
 53. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator, *Science* 1991; 251 : 1451-5
 54. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. *Not Rev. Cancer* 2002; 2 : 442-54
 55. Kemler R., Ozawa M., Ringwald M. Calcium-dependent cell adhesion molecules, *Curr. Opin Cell Biol.* 1989; 1 : 892-7

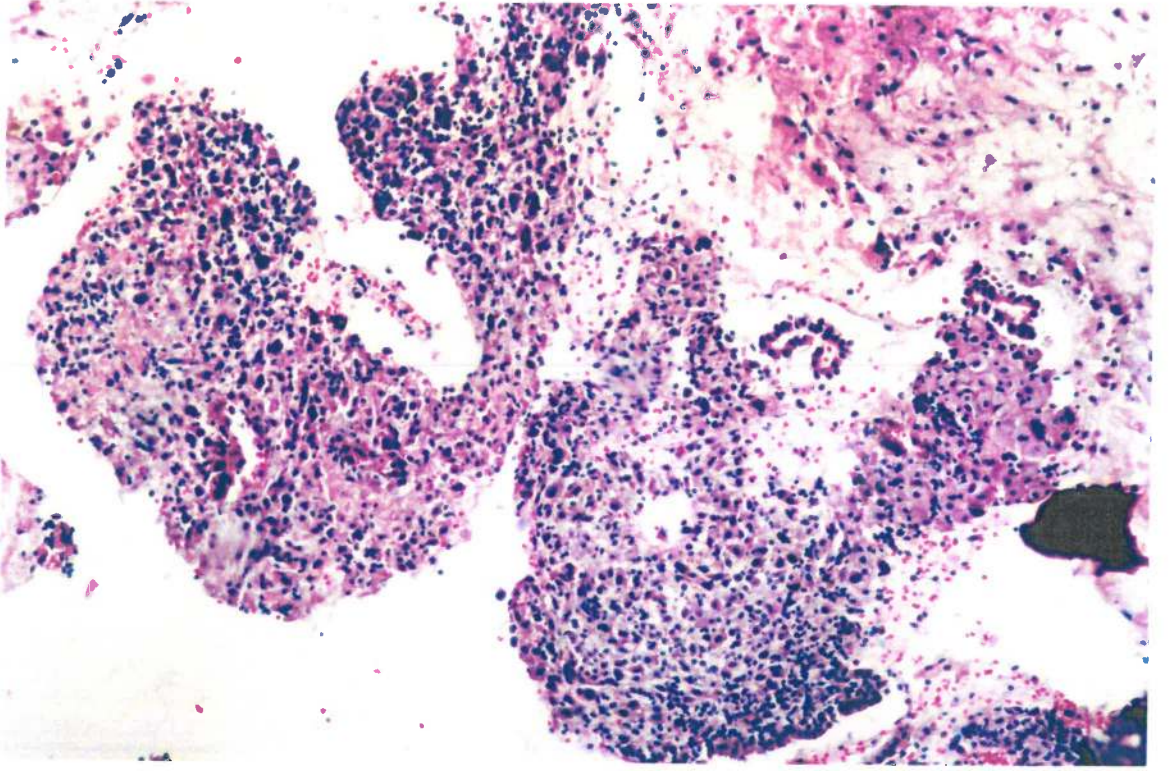
56. Gumbier BM, Structure, biochemistry and assembly of epithelial tight junctions, *Am. J. Physiol.* 1987; 253 : 749-58
57. Paria BC., Huet-Hudson YM., Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the mouse receptive uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 : 10159-62
58. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int J Exp Pathol* 2000, 81 : 405-22
59. McDonald JA. Receptors for extracellular matrix components, *Am J Physiol* 1989; 257 : 331-7
60. Keelan ET et al. Characterization of E-selectin expression in vivo with use of a radiolabeled monoclonal antibody. *Am J Physiol* 1994; 266 : 278-290
61. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in Molecule Medicine.* 2003; 9 : 263-8
62. Perandio MS et al. P-selectin glycoprotein ligand -1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J. Exp. Med.*
63. Steegmaier M, Lecinovitz A, Isenmann S et al. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* 1995; 373 : 615-20
64. Rosen SD. Ligand for L-selectin_where and how many? *Res Immunol* 1993; 144 : 699-703
65. Sasse C et al. Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venue ligand for L-selectin_parallel to CD34. *J Exp Med* 1998; 187 : 1965-85
66. Kansas GS, Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88 : 3259-87
67. TA Springer, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76 : 301-14
68. Ley K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol Rev* 2002; 186 : 8-18

69. Lasky LA et al. *Current Biol* 1993; 3 : 680
70. Dong ZM et al. Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in apo E-deficient mice. *Circulation* 2000;101 : 2290-5
71. Larsen E et al. Padgem protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 1989; 59 : 305-312
72. Andre P et al. Procoagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 92 : 13835-40
73. Speroff L, Glass RH, Kase N. Sperm and egg transport, fertilization and implantation. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Lippincott Williams and Wilkins. 6th edition , Philadelphia. 1999; 7: 247-74
74. Psychoyos A. Uterine receptivity for nidation. *Ann NY Acad Sci*. 1986; 476: 36-42
75. Morton H, Rolfe BE, Cananagh AC. Early pregnancy factor. *Seminars Reprod Endocrinol*. 1992; 10: 72
76. Gozales DS, Jones JM, Pinyopummintr T et al. Trophectoderm projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts. *Hum Reprod* . 1996;11:2739-45
77. Simon C, Gimeno MJ, Mercader A et al. Cytokines – adhesion molecules – invasive protein –ases. The missing paracrine / autocrine link in embryonic implantation? *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 405-24
78. Das SK, Wang XN, Paria BC et al. Heparin-binding EGF-like factor gene is induced in the mouse temporarily by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 1994;120:1071-83

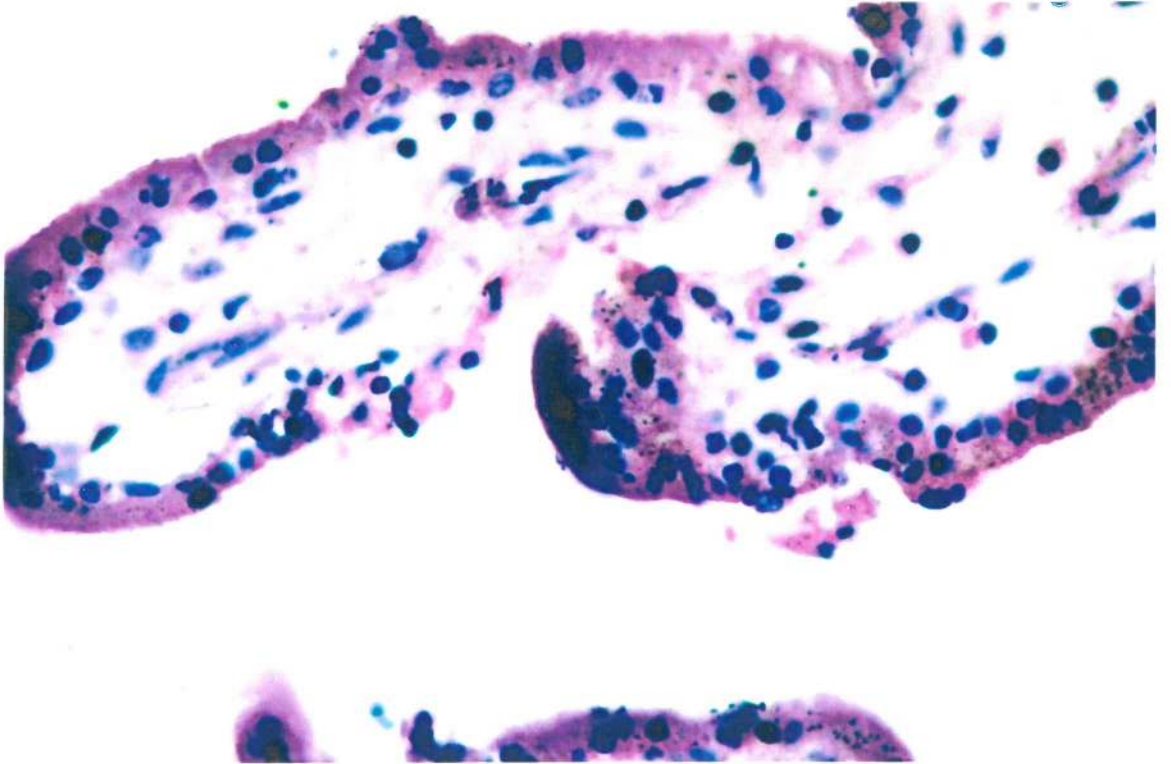
79. Lessey BA. Adhesion molecules and implantation. *Journal of Reproductive Immunology* 2002; 55 : 101-12
80. Sueoka K., Shiokawa S., Miyazaki T. et al. Integrins and reproductive physiology expression anmodulation in fertilization, embryogenesis, and implantation. *Fertil Steril* 1997; 67 : 799-811
81. Thiery JP. Cell adhesion in development: a complex signaling network. *Current Opinion in Genetics and Development* 2003; 13 : 365-71
82. Burrows TD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update* 1996;2: 307-21
83. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, et al. Human cytotrophoblast adopt a vascular phenotype as they differetiate. A strategy for succesful endovascular invasion? *J Clin Invest* 1997; 99: 2139-51
84. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampcia is associated with failure of cytotrophoblast to mimic a vascular adhsion phenotype: one cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997; 99: 2152-64.
85. Shih leM., Hsu MY., Oldt RJ 3rd et al. The role of E-cadherin in the motility and invasion of implantation site intermediate trophoblast. *Placenta* 2002; 23 : 706-15
86. Ding YO., Bagchi MK., Bardin CW. et al. Calcitonin gene expression in the rat uterus during pregnancy. *Recent Prog Horm Res* 1995; 50 : 373-8
87. Zhu LJ., Cullinan-Bove K., Polihronis M., Bagchi MK. et al. Calcitonin is a progesterone-regulated marker that forecasts the receptive state of endometrium during implantation. *Endocrinology* 1998; 139 : 3923-34
88. Schatz F, Aigner S, Papp C et al. Plasminogen activator activity during desidualization of human endometrial stromal cells is regulate by plasminogen activator inhibitor 1. *J Clin Endocrinol*

Metab 1995; 80: 2504-10

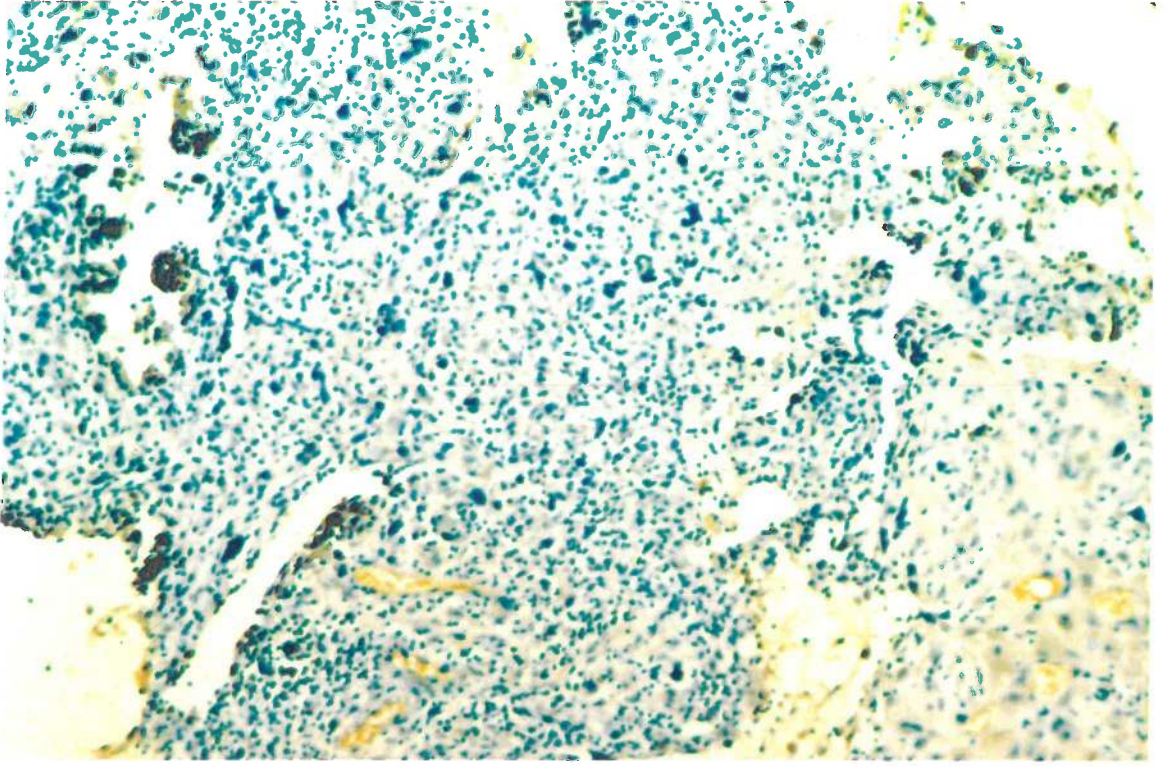
89. Graham CH, Lysiak JJ, McCrae KR et al. Lokalization of transforming growth factor- at the human fetal – maternal interface: role in trofoblast growth and differentiation. Biol Reprod 1992; 46: 561-2
90. Ginsberg MH, Gonzales FD, Regulation of cell adhesion events trough adhesion reseptors, in Koopman Arthritis and Allied Conditions, 13th edn. pp.479-490 Williams & Wiilkins (1997)
91. Downing LJ, Wakefield TW, Strieter RM, et al. anti-P-selectin antibody decreases inflamation and trombus formation in venous trombozis. J Vasc Surg 1997; 25: 816-27
92. Wakefield TW, Strieter RM, Schaub R, et al. Venous trombosis prophylaxis by inflammatory inhibition without anticoagulation therapy. J Vasc Surg 2000; 31: 309-24
93. Ridker PM, Buring JM, Rifai N. Soluble P- Selectin and the risk of future cardiovascular events. Circulation 2001; 103: 491-5
94. Andrea P, Hatwell D, Hrachovinova et al. Pro-coagulant state resulting form high levels of soluble P-selectin in blood. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 13835-840
95. Bosio PM, Cannon S, McKenna PJ et al. Plasma P-selectin is elevated into the first trimester in woman who subsequently develop pre-eclampsia. BR J Obstet Gynaecol 2001;108: 709-15
96. Holmes VA, Wallace JMV, Gilmore WS. Soluble P-selectin levels during normal pregnancy: alongitudinal study. BJOG 2002; 109: 997-1002
97. Acar A, Altınbaş A, Ozturk M et al. Selectins in normal pregnancy, pre-eclampsia and missed abortion. Harmatologia 2001; 31: 33-8
98. Zenclussen AC, Fest S, Sehmsdorf US et al. Upregulation of decidual P-selectin expression is associated with an increased number of Th1 cell populations in patients suffering from spontaneous abortions. Cellular Immunology 2001;213: 94-103



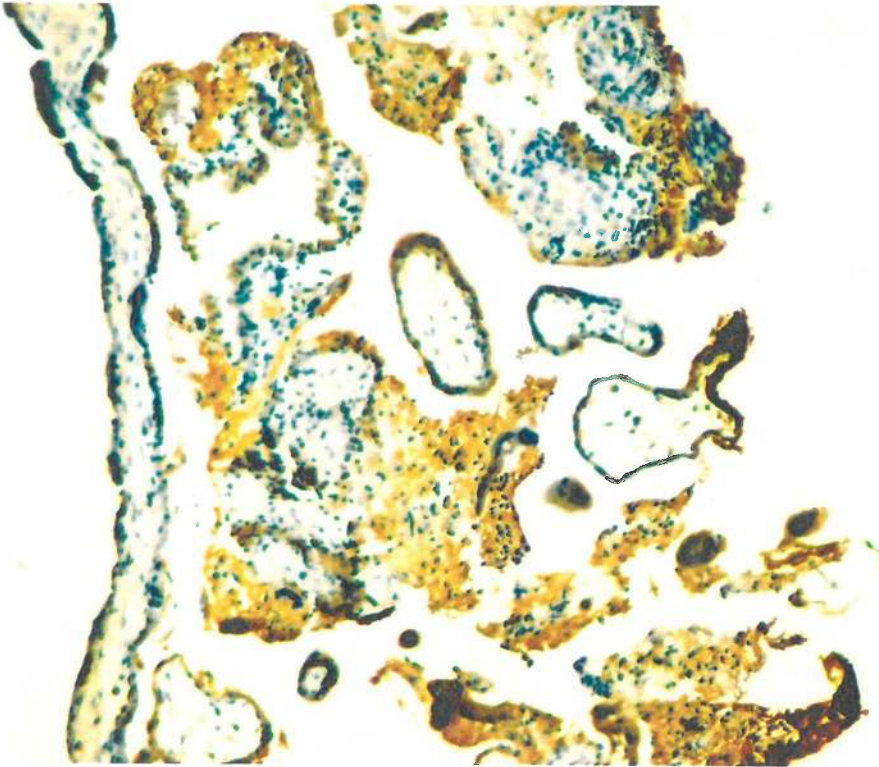
Resim1: Normal gebelik grubu: stromal hücrelerin desidual hücreye dönüştüğü görülmektedir. Sinsisyotrofoblast görülmektedir. Desidua içindeki çok sayıda kan damarı bulunmaktadır. Bez yapıları dağılmış olarak gözlenmektedir. HE x100



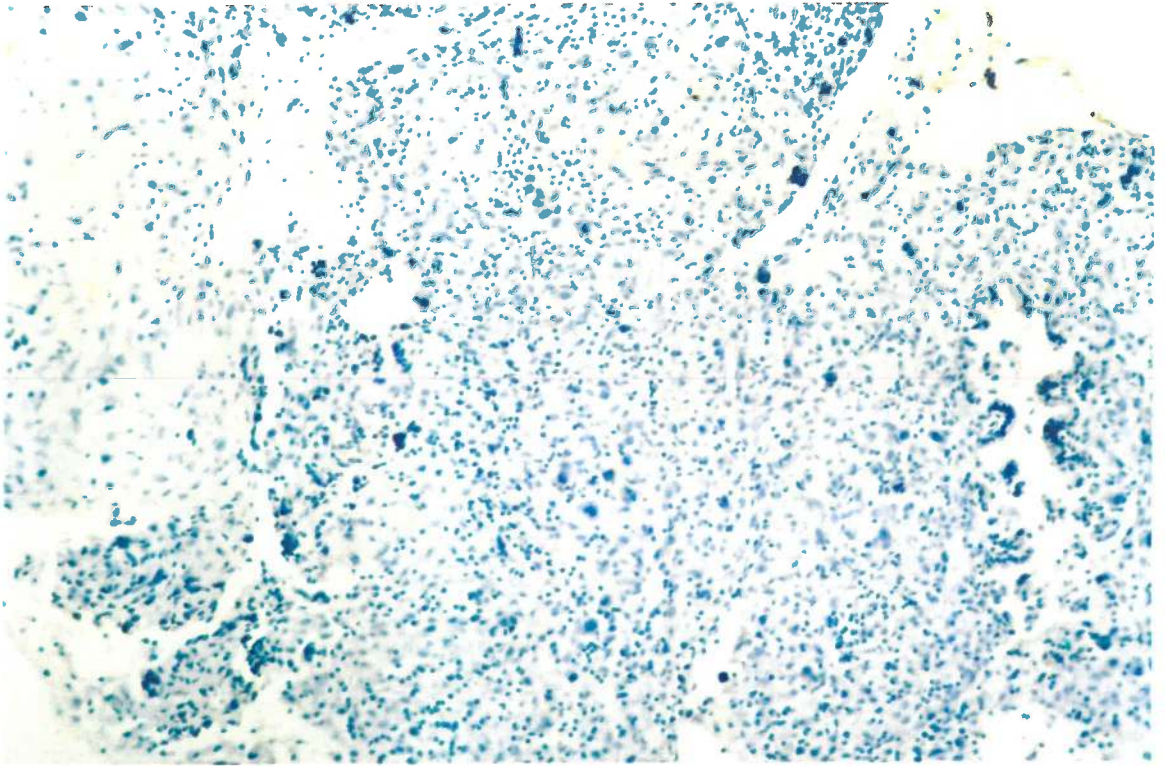
Resim 2: Normal gebelik grubu sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblastlarla sarılı villus görülmektedir. Villusun merkezinde müköz bağ dokusu yer almaktadır. Bu doku içinde çok sayıda ince uzun uzantılı mezenşimal hücre ve hafbauer hücre görülmektedir. HE x400



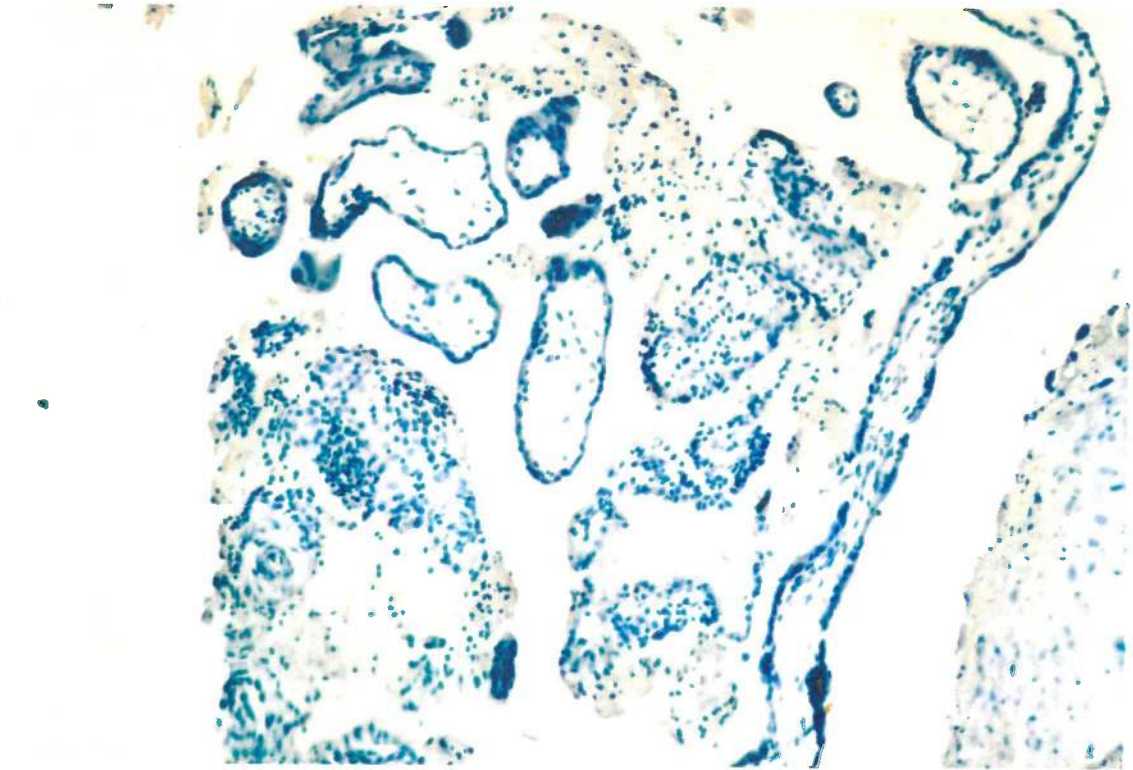
Resim 3: Normal gebelik grubu: Desidual hücrelerde L- selektinle immunoreaktivitenin oldukça az olduğu (+) görülmekte. Endometrial bez yapılarında ise boyanma orta derecede (++) görülmekte. Stromadaki sinsisyotrofoblastlar ise boyanma oldukça az (+) gözlenmektedir.x100



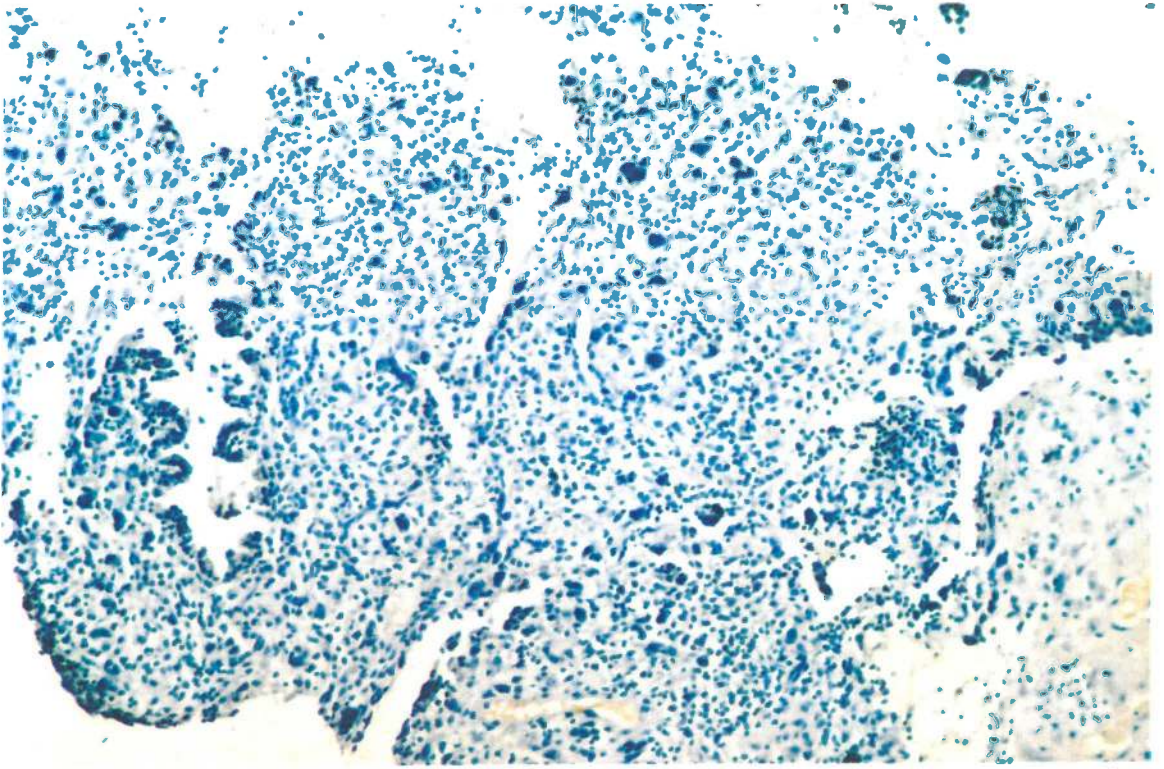
Resim 4: Normal gebelik grubu: L-selektin monoklonal antikoruna ile boyanmış preparat görülmekte. villusları dıştan çevreleyen sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblastların (+++) immunoreaktivite göstermiştir. Villusların merkezindeki mezenseyal hücrelerde çok hafif bir (+/-) boyanma gözlemlendi.



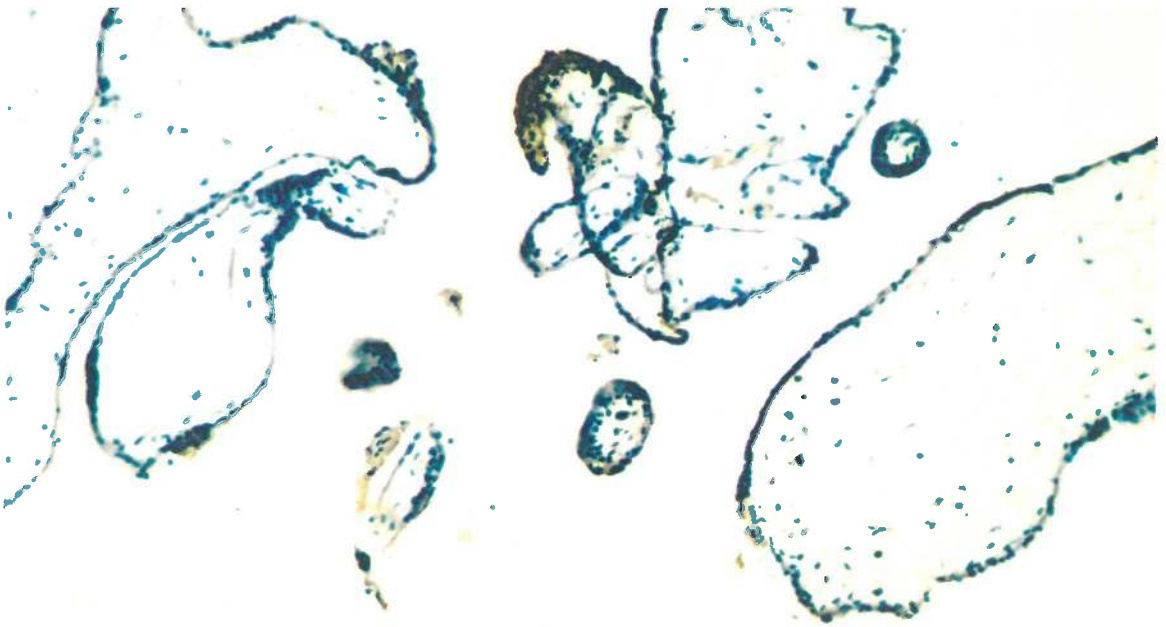
Resim 5: normal gebelik grubu: Desidual hücrelerde P selektin ile boyanmanın çok hafif (+/-) olduğu, bez yapı ve sinsisyotrofoblast hücrelerde ise boyanma olmadığı (-) görülmektedir.



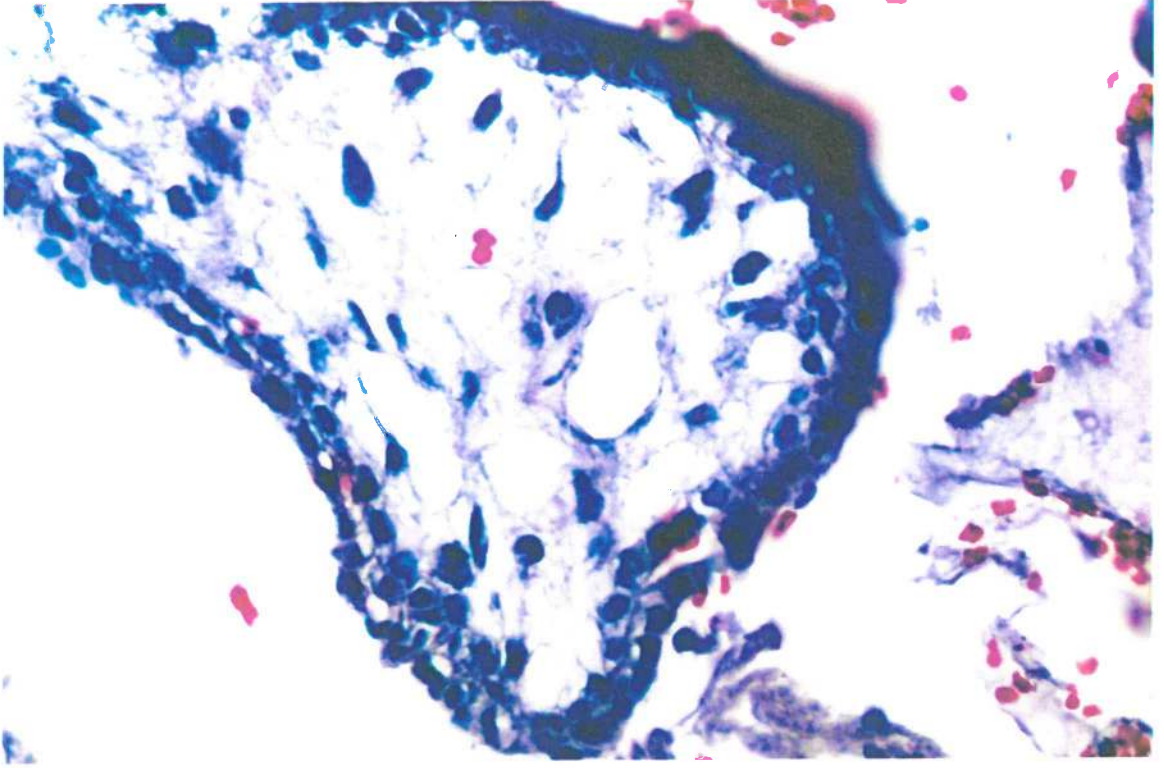
Resim6: Normal gebelik grubu : P selektin ile boyamada villusta bulunan sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblast hücrelerinde boyanma oldukça az (+) olarak görüldü ,villusun mezenşimal dokularında boyanma gözlenmedi.



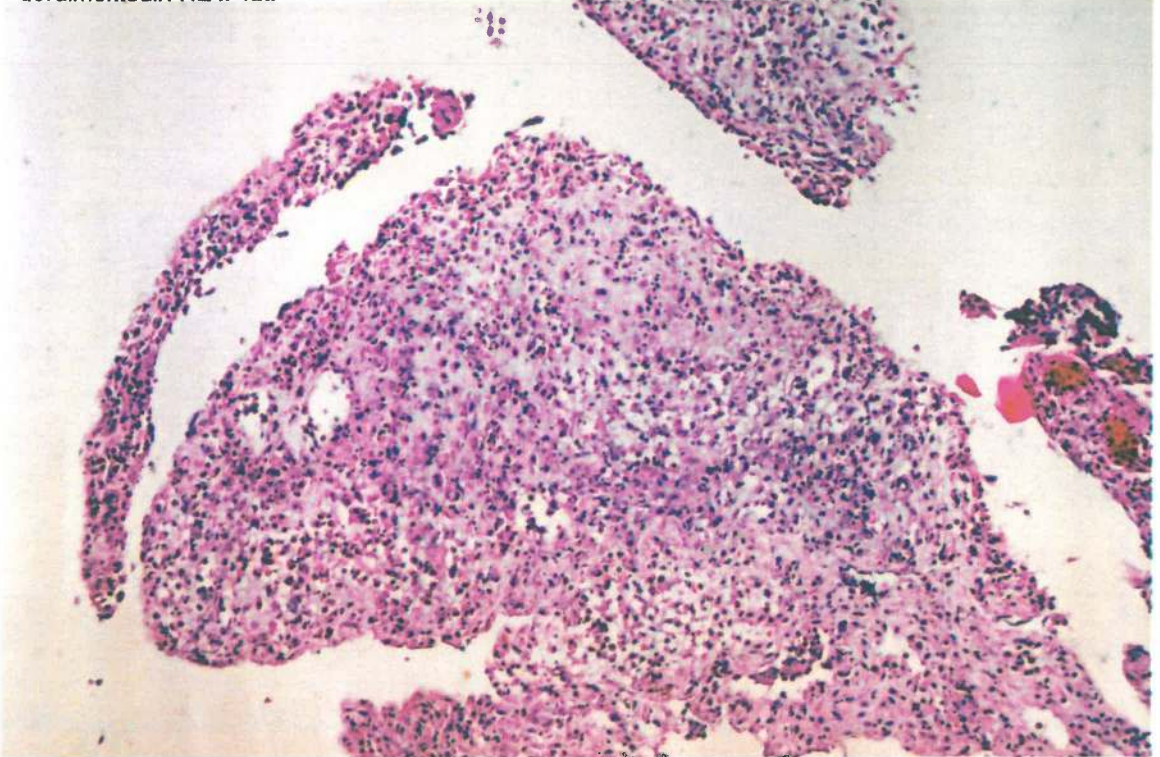
Resim 7: Normal gebelik grubu :E selektinle boyamada Desidual hücrelerde boyanma çok az (+/-) olarak görülmektedir. Desidual sinsisyotrofoblastlarda boyanma (-) olarak gözlenmektedir.



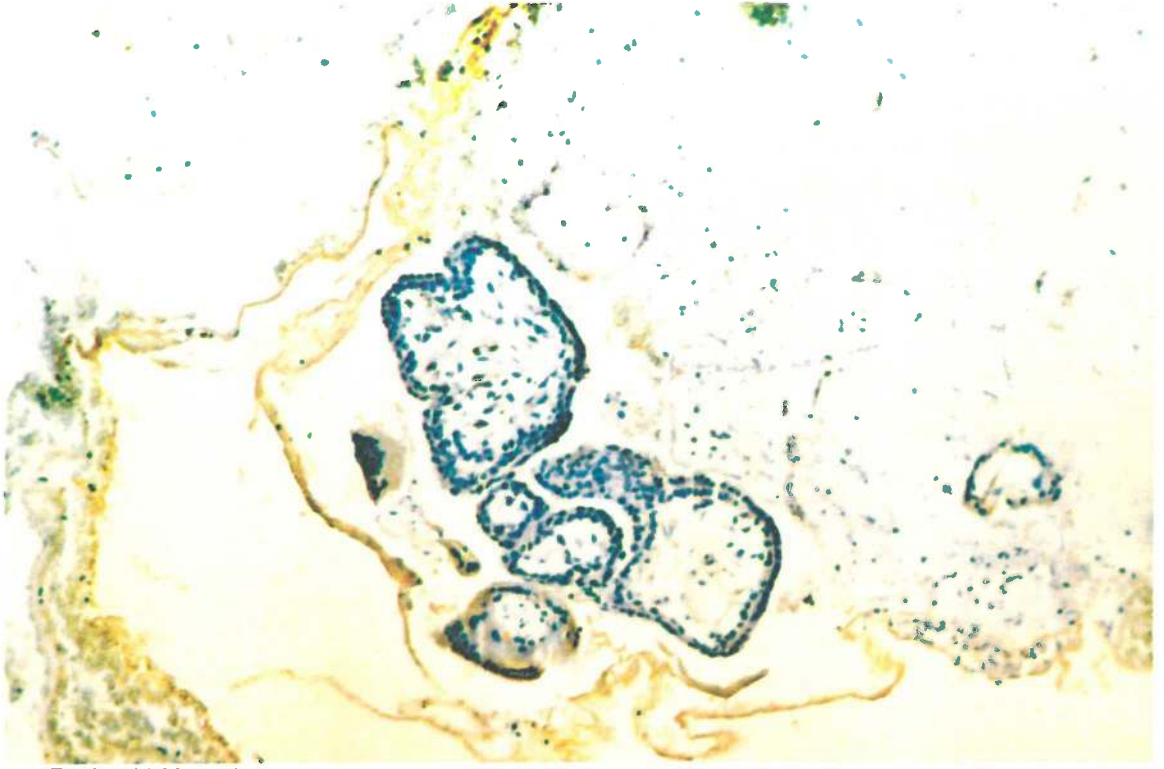
Resim 8: Normal gebelik grubu: Villusta sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblastlarda E selektinle immunoreaktivite orta derece (++) görülmekte. Mezenşimal dokuda ise boyanma az (+) miktarda görülmektedir.



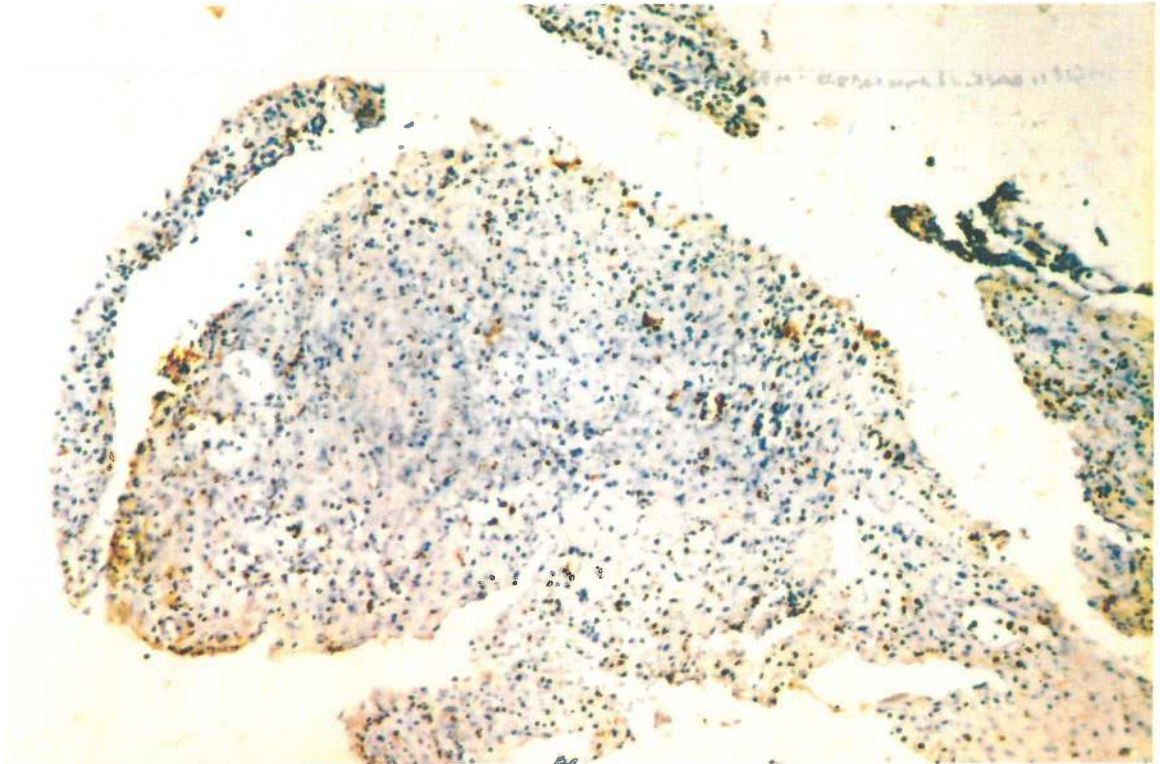
Resim 9: Missed abortus grubu: İçi mezenşimal doku ile dolu olan villusların çevresi sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblast hücrelerince sarılmış ve iki sıralı bir yapı olarak görülmektedir. sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblastların oluşturduğu tabakanın tahliye grubundan farklı olarak daha kalın olduğu görülmektedir. HE x 400



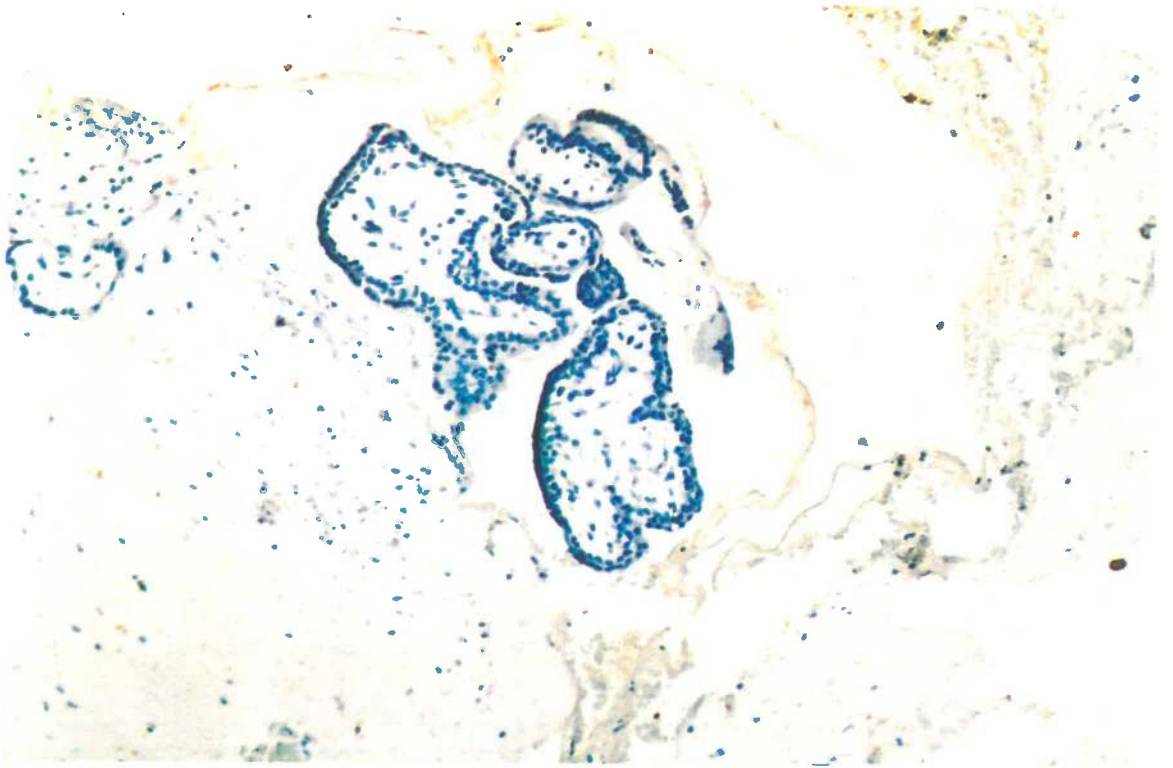
Resim 10: Missed abortus grubu : Desiduaya bakıldığında ise stromal hücrelerdeki desidualizasyonun tahliye grubuna göre daha az olduğu görülmektedir. Çok nükleuslu sinsisyotrofoblastlar tahliye grubundakilerle kıyaslandığında sayıca daha çok görülmektedir. HE x100



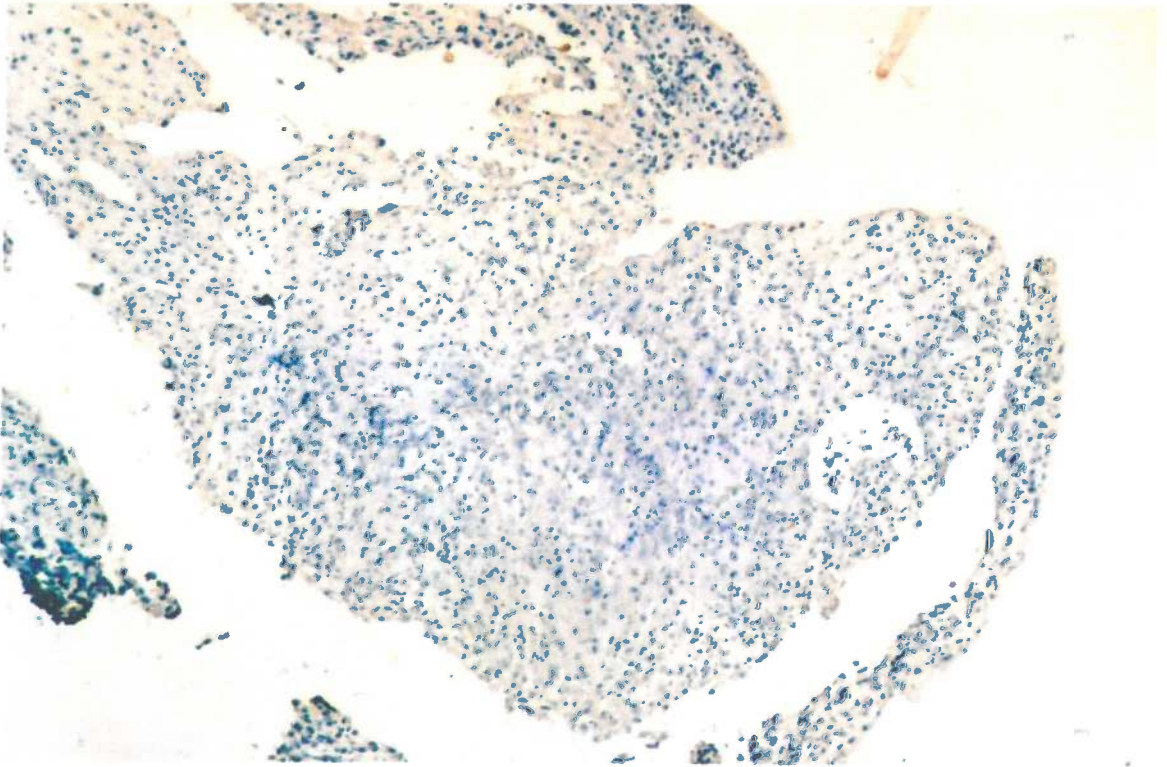
Resim 11:Missed abortus grubu: L selektin ile villustaki sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblastların az miktarda boyandığı (++) görülmektedir. Villus içi yapılarda ise çok hafif bir immünoreaktivite (+) görülmektedir.



Resim 12:Missed abortus grubu: Endometrial desidual hücrelerin L selektin ile boyanması orta derecede (++) olduğu görülmektedir. Desidual sinsisyotrofoblastlar L-selektin ile (++) olarak boyandığı görülmektedir. Bez yapılarında ise boyanma (-) görülmemektedir.



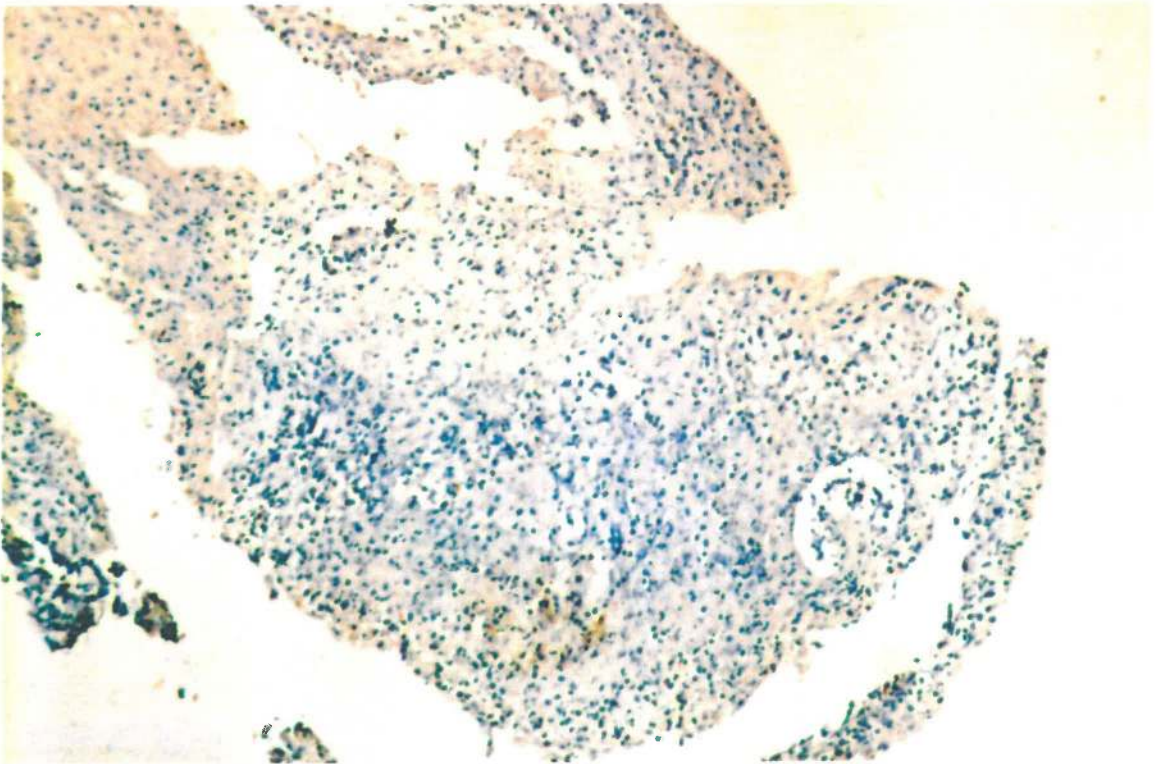
Resim 13: Missed abortus grubu: P selektin ile Sinsisyotrofoblast ve sitotrofoblastlarca meydana getirilen iki katlı yapının boyanması (+/-) olarak görülmektedir. Villus içi mezenşimal yapılarda boyanma (-) gözlenmemektedir.



Resim 14: Missed abortus grubu: Desidual hücrelerde P selektinle boyanmanın (+/-) olduğu görülmektedir. Desidual bez yapılarda ise boyanma (-) görülmemektedir.



Resim 15: Missed abortus grubu: E-selektinle boyamada villusta iki katlı dış tabakada bulunan sito ve sinsisyotrofoblastlarda boyanma (+) olarak görülmektedir. İç mezenşimal dokularda boyanma görülmemektedir.



Resim 16: Missed abortus grubu: Desidual stromada ve desidual sinsisyotrofoblastlardaki E selektin ile boyanmanın (+) olduğu görülmektedir.