



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DECİDUAL ve PLAZMA KOMPLEMAN
DÜZENLEYİCİ GENLERİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİ ile MATERNAL SERUM
ANTI-TROPHOBLASTİK ANTİKOR(ATA)
DÜZEYLERİNİN İDİYOPATİK
TEKRARLAYAN ve SPONTAN
ABORTLARDA ARAŞTIRILMASI**

İPEK YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. PINAR ATA

2020 - İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DECİDUAL ve PLAZMA KOMPLEMAN
DÜZENLEYİCİ GENLERİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİ ile MATERNAL SERUM
ANTI-TROPHOBLASTİK ANTİKOR(ATA)
DÜZEYLERİNİN İDİYOPATİK
TEKRARLAYAN ve SPONTAN
ABORTLARDA ARAŞTIRILMASI**

İPEK YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. PINAR ATA

2020 - İSTANBUL

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Öğrencinin Adı, Soyadı

İpek YILMAZ

İmza

Teşekkür

Öncelikle sözlerime yüksek lisans eğitimimin sonuna gelmiş olmanın heyecanı ve şaşkınlığıyla başlamak istiyorum.

Özellikle bana çok temel olanı göstermekte bile çok sabırlı olan ve ihtiyacım olduğunda her zaman maddi ve manevi yardımına koşan danışman hocam sayın Prof. Dr. Pınar Ata'ya,

Tez konusunun oluştuğu süreçte olguların toplanması aşamasında yardımcı olan sayın Prof. Dr. Esra Esim Büyükbayrak ve asistan Dr. Nihan Karakaş'a,

Gerek laboratuvar çalışmalarında gerekse rutin koşturmalarımnda bana çok yardımcı olan laboratuvar partnerim Ebru Arslan'a,

Başım sıkıştığında alternatif çözüm önerileriyle yardımlarını aldığım, Tıbbi Genetik rutin laboratuvar ekibimizden sevgili Uzm. Bio. Özlem Yıldırım ve Bio. Banu Adıgüzel'e,

Her şeyden önce, bu uzun soluklu çalışmalarım ve eğitimim boyunca bana en büyük manevi desteği veren ve beni hep ilgiyle dinleyen sevgili babam, annem ve kardeşim Eylül'e,

Hayatıma sonradan dahil olan, ailem dışında benden manevi desteğini esirgemeyen ve akademik yolculuğumun başında beni her anlamda destekleyen yol arkadaşım Fehmi Düzgün'e,

Bilgisayar ve teknolojik işler konusunda yardımlarını sunan sevgili arkadaşlarım Selin Çaput ve Berfu Ege Söbe'ye,

Ufacık da olsa tezime yardımları dokunan ve hatırlayamadığım herkese,

Çok teşekkürler...

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-YLP-241018-0565 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. TEŞEKKÜR.....	i
2. İÇİNDEKİLER.....	ii
3. KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ.....	iii
4. ŞEKİL LİSTESİ	vii
5. RESİM LİSTESİ	ix
6. TABLO LİSTESİ	x
7. ÖZET	1
8. SUMMARY	2
9. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
10. GENEL BİLGİLER.....	4
10.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları ve Abortus Tanımı	5
10.1.1. Gebelik Kayıplarının Patofizyolojisi ve Nedenleri	6
10.1.1.1. Embriyo Kaynaklı Gebelik Kayıpları	6
10.1.1.2. Maternal Kaynaklı Gebelik Kayıpları.....	6
10.1.1.3. Paternal Kaynaklı Gebelik Kayıpları	7
10.2. Gebelik İmmünitesi ve Sensitizasyon.....	8
10.2.1. Bağışıklık Düzenleyici Ajanlar ve Gebelikte Bağışıklık Yanıtları	22
10.3. İnsan Endometriyumunun Yapısı ve Fonksiyonu	31
10.3.1. Desidualizasyona Etki Eden Yolaklar	39
10.4. Kompleman Sistemi ve Önemi.....	42
10.4.1. Membran-Bağlı Kompleman Regülatörleri.....	47
10.4.2. Gebelikte Kompleman Sistem Aktivasyonunun Rolü.....	51
11. GEREÇ ve YÖNTEM	57
11.1. Çalışma Planı	57
11.1.1. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri	57
11.1.2. Çalışma Dışında Tutulma Kriterleri	58
11.1.3. Çalışmadan Çıkarılma Kriterleri	58
11.2. Maternal Periferik Kandan DNA İzolasyonu	58
11.3. Parafin Bloktan Fetal Kaynaklı DNA İzolasyonu	60
11.4. Kantitatif Floresan PZR (QF) Fragman Analizi	62
11.5. Atık Düşük Materyali Hazırlanması ve Desidual RNA İzolasyonu	66
11.6. cDNA Sentezi.....	68
11.7. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	69
11.8. ELISA (Enzim Bağlı Immunosorbent Deneyi) Yöntemi ile Maternal Serum ATA(Anti-trophoblastik Antikor) Düzeylerinin Belirlenmesi.....	71
11.9. Eşler arası Flow Sitometrik Cross-match	74
11.10. İstatistiksel Analiz	77
12. BULGULAR	78
13. TARTIŞMA ve SONUÇ	87
14. KAYNAKLAR	97
15. EKLER.....	110

3. KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

ATA : Anti-trophoblastik antikor

Ag: Antijen

Breg: Düzenleyici B hücre

BMP2: Kemik morfogenetik protein 2

CSF: Koloni uyarıcı faktör

CFH: tamamlayıcı faktör H

CFI: tamamlayıcı faktör I

CCP:Kompleman kontrol proteini

CRP: C-reaktif protein

CR1: CD35

CD59: Protektin

CRH: Kortikotropin salgılatıcı hormon

c-AMP: Siklik adenosin monofosfat

COX2: Siklo-oksijenaz 2

Ct değeri: Floresan değerlerinin eşik değerini geçtiği nokta

dNK: Desidual doğal öldürücü

DAF: CD55

DC: Dendritik hücre

EVT: Ekstravillöz trofoblast

ECM: Ekstraselüler matris

E₂: Estradiol

eCTB: Endovasküler sitotrofoblast

FSH: Folikül uyarıcı hormon

FI: Faktör 1

FOSL1: FOS benzeri aktivatör 1

GM-CSF: Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör

GPI: Glikosil-fosfatidil inositol

GC: Trofoblast dev hücre

GH: Büyüme hormonu

GAPDH: Gliseraldehid 3-fosfat dehidrojenaz iç kontrol geni (housekeeping gen)

HLA: İnsan lökosit antijeni

HB-EGF: Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü

hCG: insan koryonik gonadotropin

HESC: İnsan endometrial stromal hücre

HIF-1: Hİpoksi indüklenabilir faktör 1

IL: İnterlökin

IFN: İnterferon

IDO: İndoleamine 2.3-dioksijenaz

IVIG: İntravenöz immunglobulin

IGFI: İnsülin benzeri büyüme faktörü

IGFBP-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlama proteini 1

ICM: İç hücre kütlesi

iCTB: İnterstisyel sitotrofoblast

KIR: İmmunoglobulin benzeri katil hücre reseptörü

Kb: kilobaz

LRC: Lökosit reseptör kompleksi

LIF: Lösemi inhibe edici faktör

LT: Lenfotoksin

LH: Luteal hormon

LGL: Büyük granüler lenfosit
MCP: CD46
MS: Multipl skleroz
MAC: Membran atak kompleksi
MMP: Matris metaloproteinaz
MMP3: Matris metaloproteinaz 3
MR: Mineralokortikoid reseptör
MHC: Majör histo-uyumluluk kompleksi
MBL: Mannoz bağlayıcı lektin
M2: Anti-inflamatuar makrofaj tipi
mHA: Küçük histo-uyumluluk antijeni
OD: Optik yoğunluk
PKA: Protein kinaz A
PR: Progesteron reseptörü
PS: Primer sinsityum
PTX: Pentraksinler
PA: Fosfatidik asit
PLD1: Fosfolipaz 1
PD: Programlı hücre ölümü
PRL: Prolaktin
PGE: Prostaglandin E
PIBF: Progesteron kaynaklı bloklama faktörü
PBS: Fosfat tamponlu salin
RSA: Tekrarlayan spontan düşükler
RLX: Relaksin

RA: Rheumatoid Arthritis (Romatizmal Eklem İltihabı)

RT-qPCR: Eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

Rh: Rhesus

STAT3: Sinyal transducer ve aktivatör transkripsiyon 3

SCR: Kısa konsensus tekrarları

STR: Kısa tandem tekrarı

SSTR2: Somatostatin reseptör alt tipi

SLE: Sistemik lupus eritematozus

TIMP: Metalloproteinaz doku inhibitörü

TE: Trofektoderm

TESC: Trofektoderm kök hücre

TF: Doku faktörü

TCF4: T hücre faktörü 4

TGF: Dönüştürücü büyüme faktörü

Th: T yardımcı hücre

TSH: Tiroid uyarıcı hormon

TGK: Tekrarlayan gebelik kaybı

TNF: Tümör nekroz faktörü

Treg: Düzenleyici T hücre

uNK: Uterin doğal öldürücü

uSA: Uterus spiral arter

UC: Uterin kılcal damar

WHO: Dünya sağlık örgütü

VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü

4. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Majör Histokompatibilite Uyumluluk Kompleksi (MHC) lokusu.

Şekil 2. HLA G izoformları.

Şekil 3. Sağda, umbilikal kordda ve koryonik villuslarda fetal dolaşım ile insan plasentasının şematik enine kesiti. Solda, sinsitiyotrofoblast tabakası ve fetüse ait kılcal endotelyal hücreleri içeren plasental bariyerin temsili.

Şekil 4. Desidual NK (dNK) hücrelerin maternal-fetal arayüzdeki fonksiyonu.

Şekil 5. KIR'lerin yapısı.

Şekil 6. Trofoblast ve HLA etkileşimleri.

Şekil 7. Gebelikte Rh faktörü.

Şekil 8. Normal fizyolojik durumda ve hamilelik sırasında Th1/Th2 sitokin kayması.

Şekil 9. T yardımcı tip 17 (Th17) / düzenleyici T (Treg) dengesinin (a) gebelik komplikasyonları ve otoimmünite ve (b) sağlıklı bir hamilelik olarak açıklaması.

Şekil 10. Desidual transformasyon oluşumu.

Şekil 11. Desidualizasyonun dinamik yolağı.

Şekil 12. Placenta ve farklı trofoblast alttipleri.

Şekil 13. Kompleman aktivasyon yollarının şematik gösterimi.

Şekil 14. Kompleman kaskadında bulunan membran bağımlı ve sıvı faz kompleman regülatörlerinin şematik gösterimi.

Şekil 15. Membran bağılı kompleman regülatörleri.

Şekil 16. Endometrial doku ve immün hücre tiplerinin şematik gösterimi.

Şekil 17. Embriyo varlığında endometriyum dokusundaki değişiklikler.

Şekil 18. Embriyo varlığında, trofoblastın maternal bağışıklık reddi.

Şekil 19. Hasta analiz planlamasını gösteren şema.

Şekil 20. DNA izolasyon aşamaları.

Şekil 21. PZR çalışma protokolü.

Şekil 22. ChromoQuant Optima Plus kiti markör boyutlarını ve renklerini gösteren tablo.

Şekil 23. Devyser Compact v3 kiti markör boyutlarını ve renklerini içeren tablo.

Şekil 24. RNA'dan RT-qPZR'a kadar olan aşamaların gösterimi.

Şekil 25. GeneGlobe Programı Uygulama Şeması.

Şekil 26. Süspansiyonun ilk hali ve santrifüj edildikten sonraki hali.

Şekil 27. Neubauer lamında hücre sayımı.

Şekil 28. Flowsitometri çalışma mekanizması.

Şekil 29. Lenfosit kapılama analizi. SSC(Side scatter):Yan saçılma, FSC(Forward scatter):İleri saçılma.

Şekil 30. T Hücre Crossmatch Analizi.

Şekil 31. B Hücre Crossmatch Analizi.

Şekil 32. Ekspresyon analizi yapılan hedef kompleman CD59, CD55, CD46 düzenleyici genlerin sütun grafiği.

Şekil 33. Hedef genlerin ekspresyon değişimini gösteren sütun grafiği.

Şekil 34. Gruplara göre $\Delta\Delta C_t$ CD55 dağılımı ($p<0,05$).

Şekil 35. Gruplara göre C3a dağılımı ($p<0,05$).

Şekil 36. Tekrarlayan gebelik kayıpları ve maternal yaş ilişkisi.

5. RESİM LİSTESİ

Resim 1. Desidua hedef hücrelerinin 40 X mikroskopik görüntüsü.

Resim 2. Buz aküsü üzerinde parçalanarak santrifüj tüpüne alınan desidua dokusu.

Resim 3. İnkübasyona hazır ELISA plakası.

Resim 4. Sırasıyla C3a, C5a ve ATA ELISA plakalarının stop solüsyonundan sonraki görüntüsü.

Resim 5. Kaluza versiyon 2.1 programı kullanılarak yapılan hasta flow analiz örneği

Resim 6. Aynı markörler için anne ve fetüs QF-PZR analizi karşılaştırılması.



6. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. QIAamp DNA Kan Mini Kit içeriği.

Tablo 2. ROCHE Hücre ve Doku DNA İzolasyon kitinin içeriği.

Tablo 3. Devyser Compact v3 kitinin içeriği (50 testlik).

Tablo 4. ChromoQuant® Optima Plus kitinin içeriği.

Tablo 5. Devyser Compact v3 ve ChromoQuant Optima, ABI 3500.

Tablo 6. ChromoQuant PCR protokolü.

Tablo 7. RNAzol®RT Kit içeriği.

Tablo 8. SCRIPT cDNA Sentez Kitinin içeriği (100 Rxn).

Tablo 9. Kantitatif Eş Zamanlı PCR (qPCR) Sybr Master kitinin içeriği.

Tablo 10. Dizayn edilen hedef primerlerin ileri ve geri sekansları.

Tablo 11. ELISA SunRed İnsan C3a, C5a ve ATA kitinin içeriği.

Tablo 12. Gruplara Göre Demografik Özelliklerin Dağılımı.

Tablo 13. Gruplara Göre Tanımlayıcı Özelliklerin Dağılımı.

Tablo 14. Gruplara Göre Laboratuvar Bulgularının, ELISA ile Çalışılan Parametrelerin ve Kompleman Düzenleyici Genlerin Değerlendirilmesi.

Tablo 15. Düşük Sayısına İlişkin Farklı Değişkenlerle İlgili Korelasyon Analizleri.

Tablo 16. Medikal Özgeçmiş, Cerrahi Özgeçmiş, Kan Grubu ve Akraba Evliliği Varlığına Göre Düşük Sayılarının Değerlendirilmesi.

7. ÖZET

Decidual ve Plazma Kompleman Düzenleyici Genlerin Ekspresyon Düzeyleri ile Maternal Serum Anti-Trophoblastik Antikor (ATA) Düzeylerinin İdiyopatik Tekrarlayan ve Spontan Abortlarda Araştırılması

Öğrenci Adı: İpek YILMAZ

Danışman Adı: Prof. Dr. Pınar ATA

Amaç: Tekrarlayan gebelik kaybı, yirminci gebelik haftası öncesi, iki ya da daha fazla gebelik kaybı olarak tanımlanır. Bu komplikasyon, multifaktöriyel patogenezi nedeniyle bazı durumlarda tam olarak açıklanamamaktadır. Bu çalışmada, patogeneizde etkili kompleman gen ekspresyonu ve C3a, C5a kompleman ürünlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca antikor aracılı reaksiyon gelişiminin tespiti için anti-HLA ve ATA serum faktörlerine bakılması planlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Spontan düşüğü olanlar (n=9), kontrol grubu olarak, tekrarlayan gebelik kaybı olanlar (n=16) hasta grubu olarak kullanılmıştır. Doku CD55, CD46 ve CD59 ekspresyon düzeyleri, eş zamanlı PZR yöntemiyle çalışılmıştır. Fetüs survisi için önemli olan C3a, C5a ve anti-trophoblastik antikor ise ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda hasta grubunda, kontrol grubuna kıyasla CD55 ekspresyon seviyesi yüksek, serum C3a düzeyi düşük saptandı ($p<0,05$). CD46 ekspresyon seviyeleri ise iki grup arasında farklı olmasına rağmen, CD55 ekspresyon artışı kadar dikkat çekici bulunmadı ($p>0,05$). Analiz edilen hastaların eşlerine karşı HLA açısından duyarlılaşma reaksiyonu saptanmadı.

Sonuç: Sonuç olarak çalışmamızda vaka grubunda kontrollere kıyasla görülen yüksek CD55 ekspresyonu, kompleman aracılı doku hasarına işaret etmektedir. Tekrarlayan düşüklerin gerçekleşmeden öngörülebilmesi, erken ve uygun tedavi ile önlenmesi için kompleman sistemi düzenleyicilerin, özellikle CD55'in ve C3a'nın potansiyel bir biyobelirteç olabileceği düşünülebilir.

Anahtar kelimeler: Tekrarlayan gebelik kaybı, desidual CD59/CD55/CD46 ekspresyonu, kompleman aktivasyonu

8. SUMMARY

Investigation of Expression Levels of Decidual and Plasma Complement Regulating Genes and Maternal Serum Anti-Trophoblastic Antibody (ATA) Levels in Idiopathic Recurrent and Spontaneous Abortions

Student Name: İpek YILMAZ

Name of Supervisor: Prof. Dr. Pınar ATA

Objective: Recurrent pregnancy loss is defined as the loss of two or more pregnancies before the twentieth gestational week. This complication cannot be fully explained in some cases due to its multifactorial pathogenesis. In this study, it was aimed to investigate complement gene expression and C3a, C5a complement products effective in pathogenesis. In addition, it was planned to examine anti-HLA and ATA serum factors for the detection of antibody-mediated reaction development.

Materials and methods: Those with spontaneous abortion ($n = 9$) were used as the control group, and those with recurrent pregnancy loss ($n = 16$) were used as the patient group. Tissue CD55, CD46 and CD59 expression levels were studied with the simultaneous PCR method. C3a, C5a and anti-trophoblastic antibodies, which are important for fetal survival, were analyzed by ELISA method.

Results: In our study, CD55 expression level was higher and serum C3a level was lower in the patient group compared to the control group ($p < 0.05$). Although CD46 expression levels were different between the two groups, it was not as remarkable as the increase in CD55 expression ($p > 0.05$). No sensitization reaction in terms of HLA was detected against the spouses of the analyzed patients.

Conclusion: In conclusion, the high CD55 expression observed in the case group in our study compared to controls indicates complement-mediated tissue damage. It can be thought that complement system regulators, especially CD55 and C3a, can be a potential biomarker in order to predict recurrent miscarriages before they occur and to prevent them with early and appropriate treatment.

Key words: Recurrent pregnancy loss, decidual CD59/CD55/CD46 expression, complement activation

9. GİRİŞ ve AMAÇ

Tekrarlayan düşükler, sebebi çoğu zaman anlaşılamayan ve tedavi için belirgin bir yol izlenemeyen bir sağlık problemidir. Sıklıkla etiyolojisi multifaktöriyel olduğu için hem tedavide hem de tanı basamaklarında çiftlerin genetik, endokrin ve üreme sistemleri ile ilgili problemleri öncelikli olarak hedef alınmaktadır. Ancak gebelik kayıplarının büyük bir çoğunluğunda tanı konulamamaktadır. İmmünolojik duyarlılık çiftler arasında kan grubu uyumsuzluğu bulunduğunda fetal hidrops ve düşüklere neden olmaktadır. Günümüzde artık tekrarlayan düşüklerde çiftler arası immünolojik duyarlılık da önem kazanmıştır.

Bu çalışmada hamilelik sırasında ortaya çıkabilecek immünolojik komplikasyonlar ve düşük arasındaki ilişkinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu ilişkide rol alan genler ve mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmıştır. Desidua ve plazmada kompleman düzenleyici genlerin ekspresyon düzeyleri ile maternal serum anti-Trophoblastik Antikor (ATA) düzeylerinin idiyopatik tekrarlayan ve spontan gebelik kayıpları olan hastalarda analiz edilmiştir. Düşüklerden elde edilen desidua dokularında DAF/CD55, MCP/CD46 ve protektin/CD59 mRNA'larının ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Bu kapsamda tekrarlayan düşüklerin olası tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve uygun hedef biyomarkerların belirlenmesi mümkün olacaktır.

10. GENEL BİLGİLER

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) sık karşılaşılan bir jinekolojik problemdir. TGK, 20 hafta öncesi iki ya da daha fazla gebelik kaybı olarak tanımlanır ve tüm çiftlerin %1-5'ini etkileyen önemli bir komplikasyondur. TGK multifaktöriyel ve patogenezi olguların yaklaşık %50'sinde çoğu zaman netleştirilemeyen bir durumdur (Deniz ve ark., 2016; Ford ve Schust, 2009; Kar ve B, 2017). Uterin anomaliler, kromozom anomalileri, trombofili, antifosfolipid sendrom, immün hastalıklar, annedeki enfeksiyonlar etiyolojide yer alan faktörlerdir. Sitokin, inflamasyon ve koagülasyon faktörlerindeki varyasyonlar ile seks hormon reseptör genlerindeki polimorfik varyantlar TGK'da risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Ancak tüm bu etiyolojik faktörlerin değerlendirilmesine rağmen olguların %50'sinde sebep belirlenmemektedir (Atasü ve Şahmay, 2001). Etiyolojinin netleştirilmesi için moleküler düzeyde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Son dönemde patogenezin belirlenmesinde olası genler ve ürünlerinin ekspresyonlarının değerlendirildiği genomik, transkriptomik ve proteomik düzeyde çalışmalar mevcuttur. TGK hastalarının kromozomları normal koryonik villuslarından yapılan beş farklı gen grubunun (immünsupresyon, embriyonun desidüaya tutunması, anjiogenez, apoptozis ve diğer etyoloji ile ilişkili genler) ekspresyon analizinde anlamlı farklılıklar saptanmıştır (Beksaç ve ark., 2001; Roman, 1984; ACOG, 2002). Son dönemde yapılan proteomik çalışmalarında ise trombofilik faktörlerin anormal ekspresyonunun TGK ile ilişkisi de ortaya konulmuştur (von Schonfeldt ve ark., 2016).

TGK'da komplemanın uygunsuz aktivasyonunun etiyolojide sorumlu faktörlerden biri olabileceği düşünülmektedir. Kompleman aracılı TGK'da çeşitli mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır. Bu mekanizmaların aydınlatılması gebelikte doğal immün sistemin anlaşılması ve tekrarlayan düşükte tedavi açısından da seçenek oluşturması açısından önemlidir. Gebelikte kompleman aracılı doku hasarının engellenmesi için kompleman-inhibitör proteinlerinin kontrolüne ihtiyaç vardır. Plasenta gestasyon boyunca kompleman düzenleyicilerini yüksek düzeyde eksprese eder. Hayvan modellerinde tekrarlayan düşükte kompleman aktivasyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir. Ayrıca, C3 aktivitesinin fetüsün survisi için önemli olduğu fare modellerinde ortaya konulmuştur. (Young ve ark., 2002; Schwartz ve ark., 2016; Qu ve ark., 2008).

10.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları ve Abortus (Düşük) Tanımı

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK); Amerikan Üreme Tıbbi Derneği'ne göre ardışık olması gerekmemek ile birlikte iki veya daha fazla; Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği'ne göre ise art arda üç hamilelik kaybı olarak tanımlanır.

TGK etiyojisi birincil, ikincil ve üçüncül olmak üzere sınıflandırılabilir; birincil TGK daha önceden canlı doğumu olmayan bir kadında gerçekleşen iki veya daha fazla gebelik kayıplarına karşılık gelirken, ikincil TGK yirminci gebelik haftasından daha erken gebeliği olan kadınlarda tekrarlayan kayıplara karşılık gelir. Üçüncül TGK ise, normal gebelik gerçekleştiği halde bu gebelikler arasındaki çoklu gebelik kayıplarını ifade eder (El Hachem ve ark., 2017).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre 1977 yılında düşük tanımı, gebelik ürününün 20. gestasyonel haftadan önce, embriyo/fetüs ve eklerinin, tamamının ya da bir kısmının uterus kavitesinin dışına atılması şeklinde yapılmıştır.

Buna göre, düşük vakalarını; belirlenemeyen, erken ve geç düşük olarak üç şekilde inceleyebiliriz.

Klinik olarak tespit edilememiş ve sadece biyokimyasal olarak doğrulanmış gebeliği bulunan olgulardaki, birkaç gün geciken menstrüel kanama şeklinde gelişen düşükler belirlenemeyen düşüklere aittir. Erken düşüklere; 12. gebelik haftasının sonuna kadar meydana gelen ve geç düşüklere ise 13. ve 20. gebelik haftasının sonuna kadar gerçekleşen düşüklere aittir. Düşükleri oluş şekline göre ayırırsak; spontan ve tetiklenmiş düşüklere diyebiliriz. Spontan düşüklere, kendiliğinden meydana gelmiş ve hiçbir cerrahi girişim olmaksızın oluşurlar(Kılıççı, 2004). Spontan düşük oranları 2005'te tüm gebeliklerin yaklaşık %10 ila %15'ini oluştururken, bu oran 2011 yılında tüm gebeliklerin % 17-22'si olarak belirtilmiştir (Weintraub ve ark., 2005; Weintraub ve Sheiner, 2011).

Buna ek olarak ultrasonografide fetüs canlılığının gözlemlenemediği ve diğer düşük tiplerinde bulunan kanamanın olmadığı olgular ise missed abortus diğer bir deyişle ölü düşük olarak tanımlanır. Tekrarlayan düşüklere bir diğer adı da habitüel düşüklere aittir.

10.1.1. Gebelik Kayıplarının Patofizyolojisi ve Nedenleri

Erken gebelik kayıpları; embriyo kaynaklı, maternal faktörlerden kaynaklı veya paternal etkenlerden kaynaklı olarak incelenebilir.

10.1.1.1. Embriyo Kaynaklı Gebelik Kayıpları

İlk trimesterde gerçekleşen düşüktür. Fetüsün kromozomlarında görülen sayısal veya yapısal farklılıklar, diğer deyişle anomalilerden kaynaklı olarak gerçekleşebilir. Gebelik kayıplarının yaklaşık %65'i kromozom anomalilerinden kaynaklanmaktadır. En sık neden olarak Monozomi X (45XO) tek başına bir risktir ve oransal olarak %14.6 civarlarındadır (Buster ve Pisarska, 1999). Trizomiler ise abortus kayıplarının %46'sını oluşturmaktadır (Cunningham ve ark., 1997). Trizomi olgu patolojisi olarak ilk mayoz bölünmedeki homolog (kardeş) kromozomların ayrılmaması durumunda meydana gelmektedir ve bu durum “non-disjunction” olarak tanımlanır. Sıklıkla anneden gelen oosit (yumurta)’ten kaynaklanan ayrılmama %81 iken, babadan gelen sperm kaynaklı ayrılmama durumu %19 civarlarındadır. Trizomi 16 kaynaklı gebelik kayıpları en sık rastlanan trizomiler olmakla birlikte, anomalilerden kaynaklı düşüklerin en sık rastlanana olarak triploidiler %20’lik bir oranla bunu takip etmektedir. Sonraki trizomi sıklığı, kromozom 21 ve kromozom 22’de görülmektedir ve bu olgulardan kaynaklı düşüklerin gerçekleştiği söylenebilir. Eğer gebelik kayıplarının fetüs kaynaklı kromozom anomalilerinden sorumlu diğer yüzdelerini belirtmek gerekirse; %1,5 mosaizm, %3,8 translokasyonlar (kromozom üzerindeki parça değişimleri), %5,6 tetraploidi, %15,5 triploidi şeklindedir.

Tüm bunlardan ayrı olarak, nöral tüp defekti gibi konjenital organ anomalileri de embriyonel kaynaklı düşüğün bir başka nedenlerindendir (Child ve ark., 2001).

10.1.1.2. Maternal Kaynaklı Gebelik Kayıpları

Anneden kaynaklanan düşük nedenleri arasında sıklıkla enfeksiyonlar, hormon bozuklukları, beslenme bozuklukları, immünolojik nedenler, trombofililer, servikal yetmezlikler, travmalar, kronik renal veya tüberküloz gibi diğer sistem hastalıkları vb. durumlar gösterilebilir. Genellikle bir bakteri veya virüs kaynaklı

enfeksiyöz bir durum oluştuğunda, uterus duvarında meydana gelen bazı hücrel ve biyokimyasal değişiklikler olur. Bu değişikliklerden kaynaklı uterus kasılmaları oluşarak abortus gerçekleşir. Sadece virüsler, bakterilerden daha küçük olması nedeni ile fetüsü de etkileyip fetal anomaliye yol açarak düşüğün gerçekleşmesine yol açabilir.

Endokrin bir bozukluk olan Corpus Luteum yetmezliği, progesteron salgılanmasında problem olması nedeniyle düşüklerde en sık görülen nedenler arasındadır. Gebelik sırasında, fetus gelişiminde büyük rol oynayan progesteron ayrıca annenin gebeliğe olan immün yanıtına destek olur ve desidual reaksiyonun oluşmasında büyük rol oynar. Buna ek olarak tiroid hormonunun çalışmasındaki bozukluklar (hipo/ hiper durumları) da gebelik kayıplarında sık görülen bir durumdur. Kan şekeri düzensizliklerinden kaynaklı oluşan Diabetes Mellitus (DM) olgularında da ölü düşük veya “missed abortus” sıkça gözlemlenmektedir. Gebelikte en önemli faktörlerden biri olan immün tolerans, immün sistemde bir yetersizlik görüldüğünde fetüsü reddederek gebeliğin sonlanmasına yol açar. Kan grubu uyumsuzlukları, paternal ve maternal orijinli antijenlerin benzerlikleri veya farklılıkları gebelik kayıplarına neden olabilir (van Pampus ve ark., 1999).

10.1.1.3. Paternal Kaynaklı Gebelik Kayıpları

Oosit ve spermatozoon, embriyonun genomuna eşit derecede katkıda bulunduğundan, idiyopatik tekrarlayan düşük vakalarının bir kısmı paternal (baba) faktörlerle açıklanabilmektedir (Fossé ve ark., 2019). Baba kaynaklı gerçekleşen düşük; sperm DNA anormallikleri, %8-18 Y kromozomundaki mik rodelesyonlar, paternal yaş artışı ile DNA kırıklarının artması, belirli nedenlerden dolayı sperm kalitesindeki düşüşten dolayı meydana gelebilir (Puscheck ve Jeyendran, 2007). DNA bütünlüğü bozuk olan spermatozoa, oositi dölleyebilir ve sonraki embriyonik gelişimi etkileyerek tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olabilir. İdiyopatik tekrarlayan düşüklere neden olan Sperm DNA hasarı ve oksidatif stres çalışmaları gittikçe önem kazanmaktadır (Dhawan ve ark., 2018; Imam ve ark., 2011).

Sperm RNA modifikasyonları ve düzensiz sperm transkriptleri epigenetik bilginin kuşaklar arası aktarımında etkili olarak fetüslerin sağlığını olumsuz

etkileyebilir (Dhawan ve ark., 2018). Buna ek olarak, seminal bağışıklık düzenleyicilerdeki dengesizlikler tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olabilmektedir. Seminal sıvı, lenfosit proliferasyonunu uyaran, NK hücre aktivitesini etkileyen ve antijen sunan hücrelerden salınan sitokin ortamını değiştiren çeşitli sinyal molekülleri içerir (Fossé ve ark., 2019). Tekrarlayan gebelik kayıpları yaşayan bazı kadınların, paternal lenfosit antijenlerine karşı güçlü bağışıklık tepkileri verebileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bu tür lenfositotoksinlerin ortaya çıkmasının, daha sonra fetal ölümle sonuçlanabilecek, uygun olmayan maternal bağışıklık tepkileri olduğu ileri sürülmüştür (McConnachie ve McIntyre, 1984). Önceden karşılaşılan seminal plazmadaki paternal antijenler, maternal bağışıklık sistemi tarafından tanındığı için hücre aracılı hasarı baskılayarak implantasyonu destekleyebilmektedir (Robertson ve ark., 1997).

10.2. Gebelik İmmünitesi ve Sensitizasyon

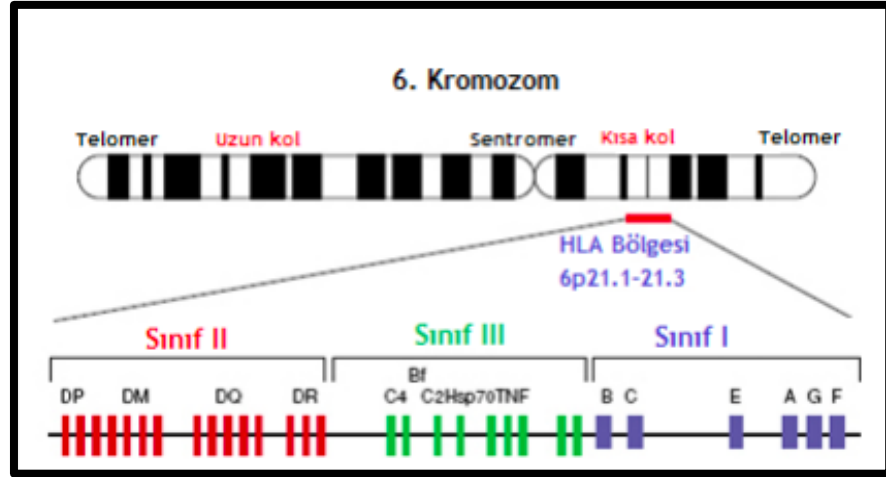
İmplantasyon öncesi embriyo gelişimi ve / veya endometriyal reseptivite bozuklukları, üreme kapasitesinin azalmasının ana nedenleridir ve ileride plasenta gelişimi ve fetal büyümeyi de etkilemektedir. Bu olayın kilit düzenleyicileri, maternal sistem sitokinleri ve bağışıklık hücreleridir. Blastosist gelişimi ve implantasyon yeterliliği her ikisi de dişi üreme sistemi içindeki sitokin ortamından etkilenirken, endometriyumun reseptivitesi (alıcılığı) implantasyon bölgesinde bulunan bağışıklık hücre popülasyonlarına bağlıdır. Bu bağışıklık popülasyonlarının birincil rolü işgalci mikroorganizmalara ve tümörlere karşı bir organizmayı savunmaktır. Bununla birlikte yerleşme ve gebelik boyunca yabancı ya da 'kendinden olmayan' ve baba kromozomlarından türetilen büyük histo-uyumluluk kompleksi (MHC) de dahil olmak üzere antijenleri ile etkileşimdedir. Bağışıklık yanıtını aktivasyona ya da toleransa doğru yönlendirmekle görevlidir. Bağışık yanıtta tolerans gelişiminin kilit unsuru, düzenleyici T hücreleri (Treg hücreleri) olarak bilinen özel T hücrelerinin gelişmesidir. Embriyo implantasyonundan önce uterusda bulunan ve indüklenen Treg hücreleri; embriyo, fetüs ve plasenta arasında gerekli olan etkileşimleri sağlar (Robertson ve ark., 2014).

İmplantasyon, yerleşme ve gebelik boyunca fetal ve majör histokompatibilite kompleks antijenleri maternal bağışıklık sistemine özel bir şekilde sunulur ve bu

antijenlere bağışıklık sistemi tarafından yanıt verilir. Aynı türün bir ferdinden başka bir ferdine nakledilen doku veya organ bütününe allogreft denir. Feto-plasental birim olarak anne rahmine yerleşen bu allogreftin kabul edilmesinde etkili bazı immünolojik mekanizmalar bulunmaktadır. Allojenik fetoplasental birimlerin reddedilmemesi için olası mekanizma ve faktörler şu şekildedir:

1. Maternal ve fetal kan dolaşımının tamamen birbirinden ayrılması,
2. Desidual dokunun yerleşimi nedeniyle, plasentadaki lenfatik akımın engellenmesi,
3. Maternal – fetal arayüzünde immünolojik bariyer veya tampon bölge oluşması,
4. Trofoblast hücreleri üzerindeki yüzey alloantijenlerinin maskelenmesi,
5. Maternal immünolojik efektör ajanların trofoblast ile spesifik olarak bağlanması ve inaktivasyonu,
6. Bağışıklık yanıtı baskılayıcı hormonlardan olan progesteron, östrojen ve koryonik gonadotropin gibi hormonların ve benzeri ajanların sentezlenmesi,
7. Fetüs tarafından üretilen alfa-fetoprotein gibi bağışıklık baskılayıcı ajanların üretimi,
8. Feto-plasental birimin korunmasında önemli rol oynayan ve anne tarafından üretilen bağışıklık düzenleyici faktörler:
 - a. Adrenal kortikosteroidlerin sentezinde artışı, Plazma proteinleri ;“Pregnancy Zone” (PZ protein), Erken gebelik faktörü ; alfa 2 globulinler
 - b. Bloke edici antikorlar,
 - c. Baskılayıcı hücreler,
 - d. Periferik kanda T ve B lenfosit oranlarının değişmesidir.

MHC, insan 6. kromozomunun kısa kolundaki sentromer yakınında bulunan, yaklaşık 300’den 1000’e kadar ayrı genetik lokus içeren ve birçok lokusta ise farklı allel bulunduran, vücudun tüm çekirdekli hücrelerinde bulunan hücre yüzeyi molekülleri kodlayan bir moleküldür.



Şekil 1. Majör Histokompatibilite Uyumluluk Kompleksi (MHC) lokusu (Abbas ve ark., 2015'ten değiştirilerek kullanılmıştır.)

Bunlara doku uyumluluk veya bu moleküllere ilk kez lökositlerde rastlandığı için insan lökosit antijeni (HLA) de denmektedir. Bu antijenlerin temel görevleri arasında, eritrosit antijenlerini ve kompleman bileşenlerini belirlemek, kimyasal olarak modifiye edilmiş hücrelerin veya virüs ile enfekte olmuş hücrelerin hücre aracılı sindirimini yapmak, antikor üretiminde makrofaj-lenfosit iş birliği yapmak ve T hücre yardımcı ve baskılayıcı faktör üretimi yer almaktadır (Beer ve ark., 1981). HLA sınıf 1b olarak adlandırılan HLA geni üç insan lökosit antijen geni içerir. HLA sınıf 1a genleri olan HLA-A, -B ve -C'nin aksine, HLA 1b genleri HLA-E, -F ve -G olmak üzere klasik olmayan HLA grubu olarak da adlandırılır. HLA-E, HLA sınıf 1a molekülleri gibi çok çeşitli tüm çekirdeklenmiş hücrelerde eksprese edilir.

HLA-E'nin birincil fonksiyonu, CD94 / NKG2A reseptörlerine ve antijen sunumuna bağlanarak NK hücrelerinin inhibisyonudur ve bu nedenle HLA-E, hem doğal hem de adaptif immün yanıtta rol oynamaktadır.

Feto-plasental immünolojik mekanizmalarda da bahsedildiği gibi plasenta içinde fetal ve maternal kan havuzları birbirine karışmadan çok yaklaşır ve sonuç olarak HLA gibi immünojenik fetal antijenler annenin bağışıklık sistemine erişemez. HLA sınıf I ve II fetal hücrelerde eksprese edilmezken (Tilburgs ve ark., 2009), babadan türetilen paternal HLA antijenleri, fetal beyaz kan hücreleri ve diğer fetal hücreler üzerinde eksprese edilir ve bununla birlikte koryonik villuslarda saptanabilir. Maternal duyarlılaşma (sensitizasyon), bu plasenta mekanizmasının bozulmasının ardından fetüs ve annenin kan akımları birleştğinde ortaya çıkabilir. Bu durum,

çoğunlukla doğumda gerçekleşmektedir ancak fetomaternal kanama ve ardından sensitizasyon gebelikte daha erken de ortaya çıkabilmektedir (Kaufman ve ark., 2013). Babadan türetilmiş fetal HLA'ya yönelik maternal antikorlar, birden fazla doğum yapmış kadınların serumunda yaygındır, ancak baba HLA'sına özgü sitotoksik T lenfositlerini göstermek zordur (Hunt ve Orr, 1992). Paternal HLA uyumsuzluklarına yönelik antikorlar, hamile kadınların yaklaşık %15 – 30'unda görülmüştür. İlk olarak Rood ve arkadaşları; Payne ve arkadaşları tarafından 1958'de tanımlanan anti-paternal antikorların (APA), gebelik için klinik önemi tartışmalıdır (Regan ve ark., 1991; Dankers ve ark., 2003). Gebelik sırasında paternal HLA antijenlerinin immünojenitesi, annenin HLA antijenlerinden etkilenir ve daha yeni çalışmalar, paternal HLA'ya karşı antikorların uyarılmasının, yabancı epitopların sayısı ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir. HLA veya paternal antikorların varlığı ve yokluğu gebelik komplikasyonlarında tanımlanmıştır. Artan çalışmalar, preeklampsi ve tekrarlayan düşük gibi gebelik komplikasyonlarının patojenik mekanizmasında, anti-paternal antikorların rolünü göstermektedir. APA'ların üretilmesindeki etmenlerin; plasentadan geçen fetal hücre sayısı, çocuk ve anne arasındaki HLA uyumsuzlukları, anti-HLA antikorlarına karşı oluşturulan antikorların gelişimi veya önceki gebeliklerin olduğu düşünülmektedir (Lashley ve ark., 2013).

HLA olmayan anti-paternal spesifik antikorların, tekrarlayan düşüklere yatkınlık yaratan, trofoblastlara karşı patolojik bir humoral immün yanıtı yansıttığı öne sürülmüştür. Anne kanındaki bu antikorlar, sinsitiyo-trofoblasta bağlanabilir ve kompleman veya hücre aracılı sitotoksik reaksiyonları tetikleyebilir. Anti-trofoblastik antikorlar tarafından hedeflenen kesin antijenik epitoplar bilinmemektedir (Rogenhofer ve ark., 2011).

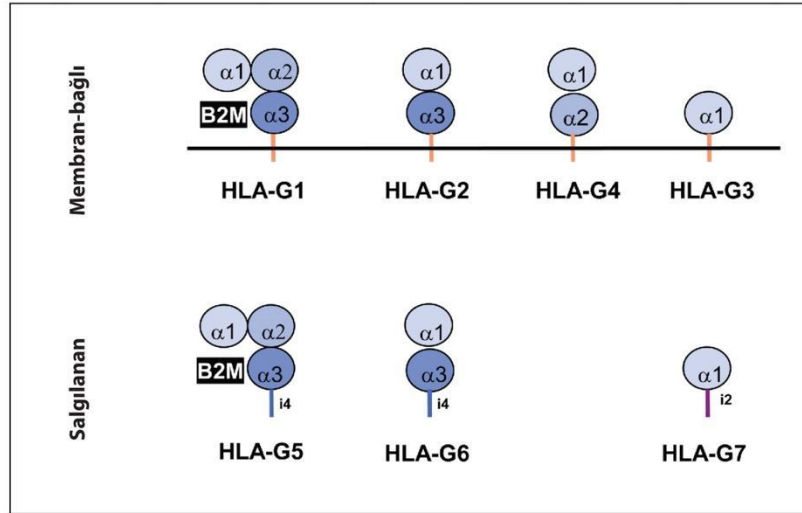
Maternal bağışıklık sistemini aktif hale getiren plasental genler bazen seçici olarak baskılanmaktadır. Birçok araştırmacı bu baskılanmanın maternal-fetal toleransın oluşmasında etkili olduğu konusunda hem fikirdir. HLA-A ve HLA-B'nin trofoblast hücre yüzeyinde eksprese edilmemesinin, maternal bağışıklık sisteminin fetüs yabancılığına tepkisiz kalmasına neden olduğu düşünülmektedir (Petroff, 2006).

Paternal antijenler; maternal bağışıklık sistemi, cinsel ilişki, gebelik veya paternal lökosit bağışıklaması gibi farklı yollardan uyarılabilirler. Birden fazla gebeliği olanlarda, tek gebeliği olanlara kıyasla daha fazla paternal antijenlere

rastlanmıştır; bu durumun partnerinin spermiyle daha az karşılaşmasından dolayı olduğu düşünülmektedir (Vianna ve Chies, 2008). Yapılan bir çalışmada çiftlerdeki A, B ve DR antijenleri dahil olmak üzere 3 veya daha fazla HLA antijen paylaşımının, tekrarlayan düşükleri olan grupta, kontrol çiftlerine göre daha yaygın olduğu bulunmuştur (Unander ve Olding, 1983). Bu fazla paylaşım baba antijenlerine karşı aşırı duyarlılık oluşturarak düşüğe yol açabilmektedir. Bazı transplant merkezlerinde de, gebeliği olan kadınlara, eşleriyle aynı HLA antijenlerine sahip donörlerden nakil yapılmamaktadır (Kampen ve ark., 2002).

Maternal sensitizasyondan sorumlu diğer maternal faktörler Rh uyumsuzluğu, majör cerrahi prosedür, kan transfüzyonu, multiparite (birden fazla doğum olması) veya plasentanın operatif olarak çıkarılması gibi faktörleri içerir. Sonuç olarak, fetüse maternal toleransın sağlanamaması, gebeliği olumsuz etkiler ve tekrarlayan spontan düşük, fetal büyüme kısıtlanması ve preeklampsi gibi komplikasyonlara yol açar (Singh ve ark., 2019).

Fetal-maternal ara yüzde, fetal dokuda eksprese olan insan lökosit antijeni, HLA-G gen polimorfizmlerine ve ekspresyon düzeylerinin değişikliğine bağlı olarak düşük ile sonuçlanabilir. HLA-G, erken dönem gebelikte uterin doğal öldürücüler (uNK) aracılı fetüs ve plasenta bağlantısının korunmasında rol oynamaktadır (Puscheck ve Jeyendran, 2007). İlk olarak 1984'te Redman ve arkadaşları klasik olmayan HLA-G'nin, maternal uterin doku ve maternal bağışıklık hücrelerine yakın temasta olan ve plasentanın villuslar dışında bulunan sitotrofoblastta eksprese edilen bir molekül olduğunu tanımlamışlardır. Tanımlanan bu HLA-G yapısının plasentada HLA-E ve HLA-C ile birlikte eksprese edildiği ve kırılma varyantlarının olduğundan bahsedilmiştir. HLA-G mRNA'sının alternatif kırılması ile üretilen farklı izoformları; HLA-G1 ile -G4, membrana bağlı moleküller iken HLA-G5 ile -G7, çözünür proteinlerdir (Ishitani ve Geraghty, 1992).



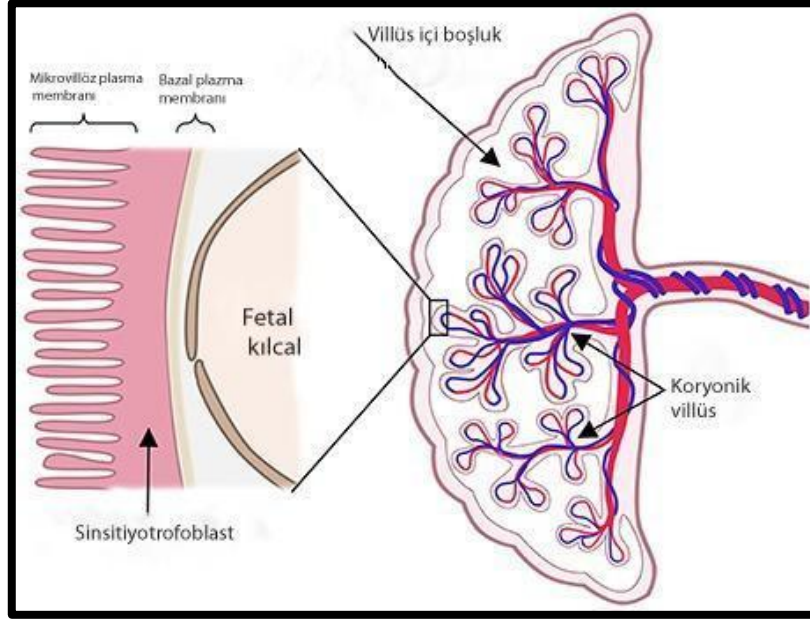
Şekil 2. HLA G izoformları (HoWangYin ve ark., 2012'den değiştirilerek kullanılmıştır.).

HLA-G'nin ekspresyon paterninin anlaşılması ve genotip farklılıklarının sonuçları için, gebelik patolojileri ile seyreden ve normal gebelerde yapılan çalışmalar sonucunda bazı farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin, preeklampitik (PE) gebeliklerde bir dizi HLA-G çalışmasına göre, HLA-G proteini ekspresyonunun PE gebelerinin plasentalarında normal gebeliklere kıyasla azaldığından söz edilmiştir (Aldrich ve ark., 2001). HLA-G'nin genotip farklılıklarının, gebelik kaybı öyküsü olan hastalarda etiyolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi amacı ile Aldrich ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, özellikle HLA-G genotipinde *0104 ve *0105N alellerini taşıyanlarda, gebelik kayıpları daha sık gözlenmiştir (Aldrich ve ark., 2001). Daha sonraki çalışmalarda, HLA-G'nin, insan üreme sisteminin bağışık yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol aldığı ve sınırlı doku ekspresyonu ile immünotolerogenik bir molekül olduğu vurgulanmıştır. Feto-maternal arayüzünde villus dokusu dışında bulunan trofoblast hücrelerinin (EVT), ve aynı zamanda da timus, prostat ve bazı tümör hücre hatlarının da HLA-G'yi eksprese ettiği gösterilmiştir. HLA-G, spesifik reseptör etkileşimleri yoluyla, doğal öldürücü (NK) hücrelerin sitolitik fonksiyonunu inhibe edebilir, desidual NK (dNK) hücre proliferasyonunu teşvik edebilir, Treg oluşumunu geliştirebilir ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) sekresyonunu indükleyebilir. HLA-G 'nin bilinmeyen endometrial ekspresyon paterninde, bazı fonksiyonlarının, endometriyumun embriyo için hazırlanmasında etkili olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca bir çalışma, HLA-G ekspresyonunun azalmasının desidual NK hücrelerinin işlevini baskıladığını ve dolayısıyla tekrarlayan spontan düşüklere (RSA)

yol açabileceğini bildirmiştir. Bir başka çalışmada, HLA-G geninin promotor bölgesindeki 1573T>C ve 1746C>A polimorfizmlerin RSA ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, serum HLA-G seviyesinin gebelik komplikasyonu ile ilişkili olduğu bilindiğinden dolayı, HLA-G proteininin serumdaki ölçümünün, gebelik komplikasyonlarının patogeneğinde ve tanısında etkili olabileceğinden söz edilmiştir (Singh ve ark., 2019). Klasik olmayan bir başka HLA 1b geni ve proteini olan HLA-F, düşük polimorfizm gösterir. Ishitani ve Geraghty, in vivo olarak, birinci trimester maternal desidua ile doğrudan temas halinde birincil olarak villuslar dışında dışında bulunan trofoblast (EVT) ile sınırlı HLA-F ekspresyonu göstermiş; ayrıca sinsitiyotrofoblastta hücre içi HLA-F gözlemlemiştir. EVT ekspresyonunun gebelik yaşı ile birlikte arttığı bulunmuş ve HLA-G 'nin, yarı-allojenik fetüsün maternal kabulü için önemli olduğu vurgulanmıştır. Buna göre önceki yapılan çalışmalarda; endometriyal dokudaki azalmış HLA-G ve HLA-F ekspresyonlarının düşük ile ilişkilendirildiği, infertil kadınlarda fertil kadınlara kıyasla daha düşük miktarlarda endometrial CD56+ NK hücrelerinin eksprese olduğu gözlemlenmiştir. Buna ek olarak infertil hastalarda CD16+ hücre miktarlarında artış ve endometrial Foxp3+ ve Treg hücre sayısında düşüş görülmüştür. Ayrıca, HLA-G ve -F etkileşimleri sonucu oluşan proteinler ve uNK hücrelerinin mevcut olduğu belirtilmiştir (Kofod ve ark., 2017).

Nükleer bir transkripsiyon faktörü olan ve Treg hücrelerinde immunosupresif fonksiyonda rol alan Foxp3, insan villusunda ve desiduada eksprese edilir. Villus, özel fonksiyonları olan çeşitli trofoblast tiplerinden oluşmaktadır ve bunlardan bir tanesi villusun iç tabakasında bulunan sitotrofoblast hücreleridir. Villusun ucunda, çeşitli invaziv villus dışı trofoblast (EVT)'lara yol açan hücre dizilerini oluşturmak için çoğalan sitotrofoblastlar; plasental villöz ağacı oluşturan mezenkim ve fetal damarları çoğaltır ve örterler. EVT'ler yeterli plasental perfüzyon sağlamak için plasental damarlarının yeniden modellenmesini sağlamak için uterus duvarını ve uterus spiral arterlerine entegre olurlar. Yeniden modelleme ve sitotrofoblast gen ekspresyonunda önemli olan EVT invazyonundaki anormallikler tekrarlayan gebelik kayıplarında ve intrauterin büyüme kısıtlanması gibi gebelik komplikasyonlarında bildirilmiştir. Sinsiotrofoblastlar ise, iç tabaka sitotrofoblastlarının füzyonu ile sürekli olarak üretilmektedir ve hem yüzen villusların yüzeyini kaplar hem de gebeliğin sürdürülmesi

ve immünolojik adaptasyonu için gerekli olan insan koryonik gonadotropin gibi çok sayıda hormonu anne dolaşımına salgırlar (Hu ve ark., 2019).



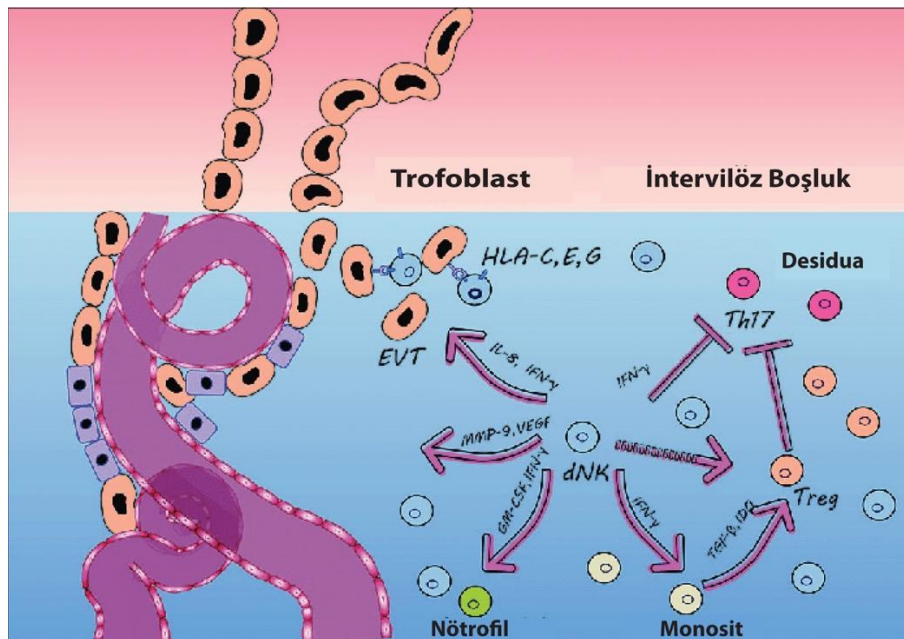
Şekil 3. Sağda, umbilikal kordda ve koryonik villuslarda fetal dolaşım ile insan plasentasının şematik enine kesiti. Solda, sinsitiyotrofoblast tabakası ve fetüse ait kılcal endotelial hücreleri içeren plasental bariyerin temsili (Gaccioli ve Lager, 2016'dan değiştirilerek kullanılmıştır).

HLA-F ise ilk olarak 1990'da Geraghty ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır ve gen yapısı olarak HLA sınıf 1 antijenlerine benzerlik gösterdiği ve 8 ekzon bölgesinden oluştuğu rapor edilmiştir. HLA-G'ye kıyasla daha az polimorfik olan HLA-F, 6 farklı protein kodlayan DNA seviyesinde 44 allele sahiptir. Feto-maternal arayüzde trofoblast üzerinde eksprese edilen tüm HLA molekülleri, HLA-C, -E, -F ve -G, NK hücreleri üzerindeki reseptörlerle etkileşime girmektedir. NK hücreleri, gestasyonel dönemin ilk trimesterinde, uterustaki bağışıklık hücrelerinin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. NK hücre miktarı, adet döngüsüyle beraber değişiklik gösterir ve implantasyon sırasında en yüksek miktara ulaşarak dalgalanma yapar. HLA-F ve NK hücre etkileşimlerinin embryo implantasyonu sırasında optimum ortam yaratabilmek için gerekli olduğu düşünülmektedir (Persson ve ark., 2020).

Fetal trofoblast dokusu, yukarıda bahsedildiği gibi, alloreaktif T hücreleri için ana hedef olan HLA-A, -B, -DR, -DQ ve -DP moleküllerini eksprese etmez. Trofoblast hücreleri, doğal katil (NK) hücre aracılı sitotoksitenin önlendiği HLA-C, -E ve -G moleküllerini eksprese ettiği için, HLA-G Treg hücrelerini indüklerken;

HLA-C ise allojenik bir T hücresi tepkisini ortaya çıkarmaktadır. Bir çalışma, gebelikte HLA-C uyumsuzluğunun aktive T hücre sayısı artışı ve desiduada Treg varlığı arasında anlamlı bir korelasyon olduğunu bildirmiştir (Tilburgs ve ark., 2009). Açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda, HLA-B35'in anlamlı derecede daha düşük sıklığı, Th2 ile ilişkili bağışıklık reaksiyonunun bu hastalarda eksik olduğunu göstermektedir (Imai ve ark., 2001).

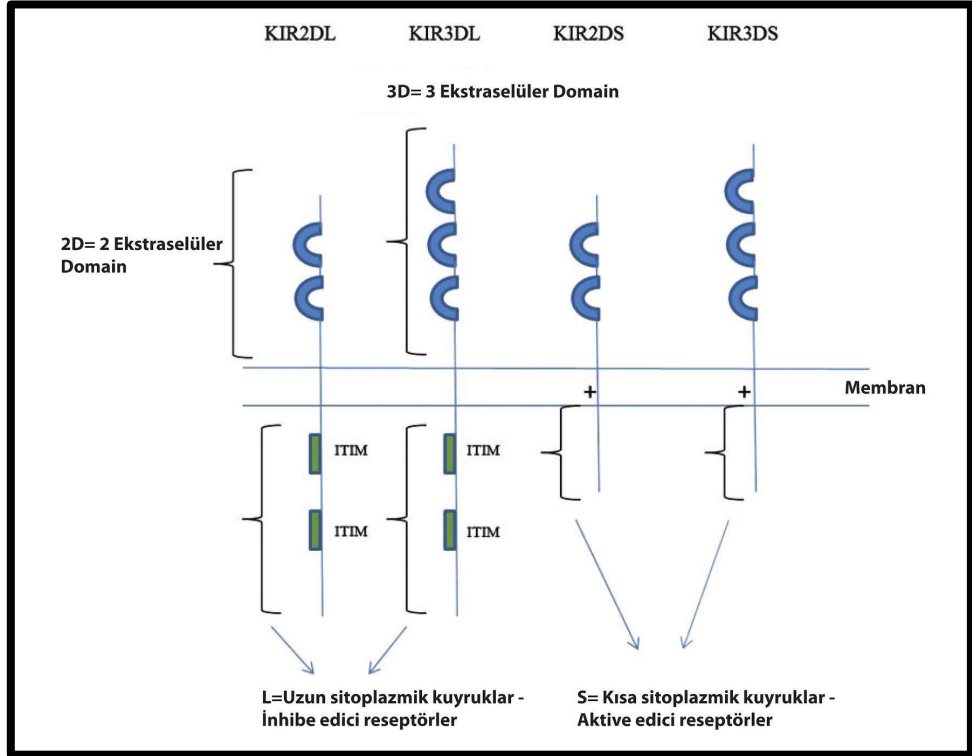
Hamilelik sırasında bir fetüsün sağlığı, plasentaya besin ve oksijen verilmesine bağlıdır. Yerleştirme sırasında fetal trofoblast hücreleri uterus duvarına sızar ve spiral arteri (plasentaya kan sağlayan maternal arter) yüksek iletkenliğe sahip bir yapıya dönüştürür, böylece kan akışını yaklaşık 100 katına çıkarır. Bu dönüşüm, gaz alışverişi için yeterli zaman sağlar ve ayrıca fetüse yeterli beslenmeyi sağlar. Trofoblast hücrelerinin uterusu kusurlu infiltrasyonu arteriyel dönüşümde başarısızlığa yol açar ve bozulmuş yerleştirme oksijenin azalmasına sebep olur. Bu düzensizlik fetüs açısından yetersiz beslenme ile sonuçlanarak klinik olarak tekrarlayan düşükler veya ölü doğumlarla sonuçlanabilir (Singh ve ark., 2019). dNK hücreleri maternal-fetal arayüzde doğrudan placentaya temas halindedir ve kökeni hala belirsiz olmakla birlikte heterojen bir popülasyon olduğu düşünülmektedir. Bazıları periferik kandan göç ederken bazılarının da lokal endometriyal NK hücrelerinden köken aldığı belirtilmiştir.



Şekil 4. Desidual NK (dNK) hücrelerin maternal-fetal arayüzdeki fonksiyonu (Yang ve ark., 2019'dan değiştirilerek kullanılmıştır).

Bu hücreler sınırlı sitotoksiste sergileyip maternal spiral arterlerin uygun bir şekilde modifiye olması için gerekli sitokinleri, büyüme faktörlerini ve anjiyojenik faktörleri üretmektedir. Böylece anjiyogenezi teşvik ederek desidüaya invaziv trofoblastları çeker. Desidual NK hücreleri tekrarlanan gebelikleri daha iyi desteklemeye katkıda bulunan bellek özelliklerine sahiptir ve ilk hamileliklerde daha az verimli çalıştığı görülmüştür (Gamliel ve ark., 2018).

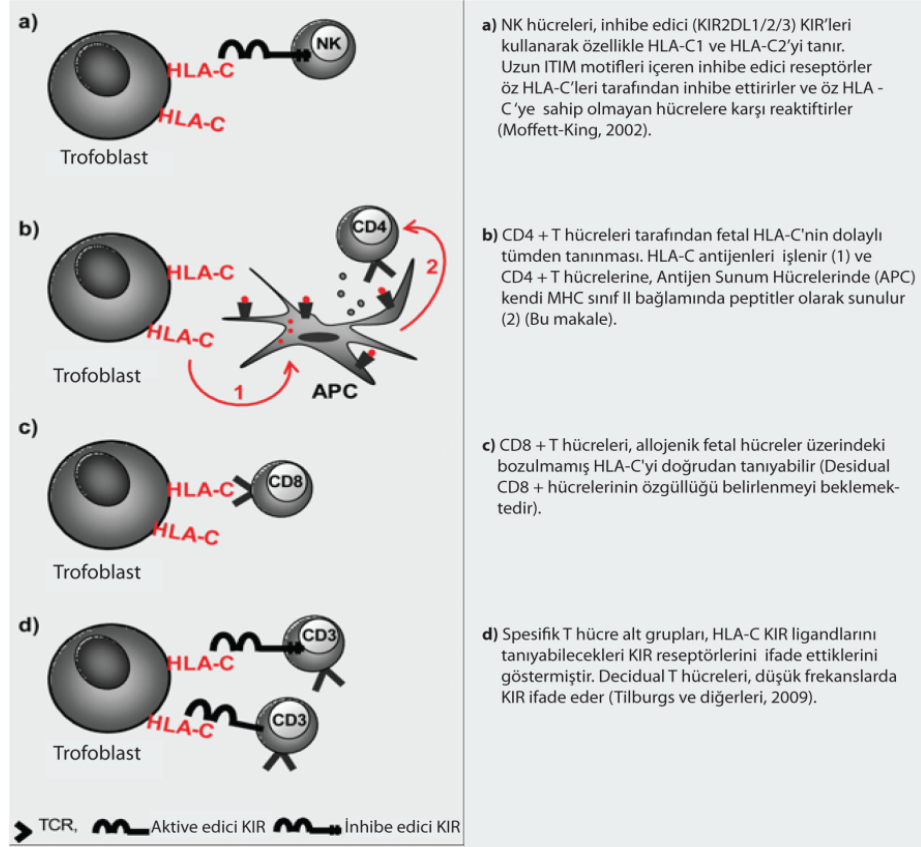
İmmunoglobulin-benzeri katil hücre reseptörleri (KIRs) ligandı olan ve yaklaşık 4000 allel içeren HLA-C antijeni, plasenta/fetüs gelişimi sırasında önemli rol oynar. uNK hücreleri üzerindeki maternal KIR etkileşimleri ve buna karşılık gelen, fetüsün trofoblast hücreleri üzerinde eksprese edilen tek klasik HLA sınıf I antijeni, HLA-C'nin plasantasyon sürecini düzenlediği düşünülmektedir. KIRler, 19q13.4 kromozom bölgesinde, lökosit reseptör kompleksinde (LRC) doğrusal bir dizide yaklaşık 14 farklı şekilde bulunmaktadır ve hücre dışı Ig benzeri alan ile birlikte uzun veya kısa kuyruk sayısına göre ayrılır. KIR'lerin, NK hücrelerinin aktivitesini etkileyen, uzun sitoplazmik bir kuyruğa sahip olan inhibe edici (KIR2DL2/3) veya kısa sitoplazmik kuyruğa sahip olan aktive edici (KIR2DS1) bir sinyal verdikleri bilinmektedir (Singh ve ark., 2019).



Şekil 5. KIR'lerin yapısı (Kaur ve ark., 2012'den değiştirilerek kullanılmıştır).

HLA-C ise KIR'ler tarafından bu sayede HLA-C1 ve HLA-C2 allotipi olarak iki gruba ayrılır. HLA-C'nin 80.pozisyonunda asparajin aminoasidi bulunduranlar HLA-C1 allotipini; aynı pozisyonda lizin aminoasidini bulunduranlar HLA-C2 allotipini temsil etmekle birlikte; HLA-C1 allotipi inhibe edici KIR'ler ile etkileşime girerken, HLA-C2 allotipi aktive edici KIR'ler ile etkileşimdedir (Singh ve ark., 2019). Genetik ve in-vitro veriler, maternal KIR ve fetal HLA-C genotiplerinin kombinasyonunun trofoblast invazyonunun derinliğini etkilediğini düşündürmektedir (Male ve ark., 2011). NK hücreleri, villus dışı trofoblast hücrelerine entegrasyonda üç HLA sınıf I molekülü (HLA-G, HLA-E ve HLA-C) reseptörleri üzerinden fonksiyon gösterirler. Bu üçünden sadece HLA-C yüksek oranda polimorfiktir ve dolayısıyla trofoblast tarafından sunulan HLA-C allotipleri, fetüse hem maternal hem de paternal katkıya bağlı olarak değişkenlik gösterir. KIR lokusu değişken sayıda gen içermesine rağmen, haplotipler A ve B olmak üzere iki gruba ayrılır. A haplotipi esas olarak inhibitör KIR içerirken, B haplotipinde baskın olarak aktive olan ilave KIR genleri bulunur. Bu nedenle, A haplotipinin (AA) iki kopyası olan bireylerde KIR aracılı NK tepkileri esas olarak inhibitördür. Tekrarlayan düşük olgularında, B haplotipindeki KIR geni olan KIR2DS1'nin koruyucu olduğu ve yokluğunda komplikasyon riskinin artabileceği vurgulanmıştır (Male ve ark., 2011; Hiby ve ark., 2008). C2 grupları için aktive edici reseptör olan KIR2DS1, bir C2-KIR2DL1 etkileşiminin aracılık ettiği güçlü inhibisyonun üstesinden gelerek fonksiyonel bir etki yaratmaktadır (Hiby ve ark., 2008). KIR aracılığıyla NK hücresi aktivasyonu, kendi kendine MHC sınıf I varlığında inhibe edilir, ancak kendi MHC sınıf I moleküllerinin yokluğunda aktive edilebilir (Tilburgs ve ark., 2009).

Birçok araştırmacı, uNK'nın trofoblastı öldürmediğini, ancak spiral arterlere invazyonu ve göçünü düzenleyen çeşitli sitokinleri ve kemokinleri salgıladığını belirterek, bu hücreler tarafından üretilen anjiyojenik faktörlerin ve kemokin seviyelerinin, KIR2DL1'in C2'ye bağlanmasından sonra azaldığını belirtmişlerdir. Bu yüzden, KIR / HLA-C etkileşimleri üreme performansını etkilemekte ve bilinen faktörleri düzenleyebilmektedir. Böylece, doğru aktivasyon dengesi ve uNK'nın bu fizyolojik fonksiyonlarının inhibisyonu başarılı implantasyonun önemli bir parçası olmaktadır (Hiby ve ark., 2008).



Şekil 6. Trofoblast ve HLA etkileşimleri (Tilburgs ve ark., 2009'dan değiştirilerek kullanılmıştır.).

H-Y antijenleri ise, Y-kromozomu üzerinde kodlanan küçük histo-uyumluluk antijenleri (mHA'lar) sınıfıdır, fetal ve trofoblast hücreleri de dahil olmak üzere tüm erkek hücrelerinde bulunur. H-Y antijenleri, X-kromozomu üzerinde kodlanmış H-X antijenine büyük miktarda benzerlik gösterir, ancak onları doğada oldukça immünojenik yapan birkaç farklı bölgeye sahiptirler. H-Y alloimmünitesi, RSA'nın potansiyel nedenlerinden biri olmakla birlikte, erkek bir fetüs ile gebeliğin, annenin bağışıklık sistemi tarafından HY antijenine karşı alloimmün yanıtının gelişmesiyle sonuçlandığı bilinmektedir. Genellikle hamilelik sırasında hücre ve humoral anti-HY bağışıklık yanıtı fetüs tarafından iyi tolere edilir, ancak bazı durumlarda H-Y alloimmün yanıtı erken veya geç hamilelik sırasında komplikasyonlara yol açabilmektedir (Popli ve ark., 2014). H-Y antikoru ile birlikte, H-Y kısıtlı HLA alellerinin varlığı da RSA ve diğer gebelik komplikasyonlarının gelişimi ile ilişkilendirilmiştir.

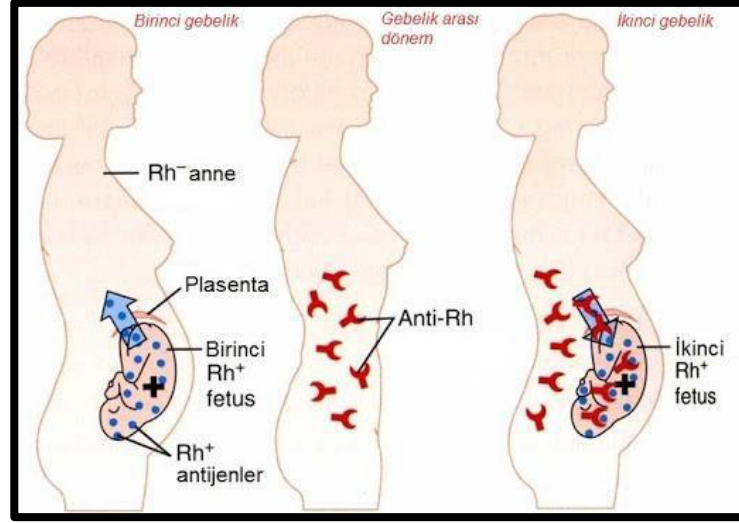
H-Y kısıtlayıcı HLA'lar, H-Y peptitleri sunan HLA sınıf I alelleri (HLA-A * 01, HLA-A * 02, HLA-B * 07, HLA-B * 08, HLA-B * 52, HLA-B * 60) ve HLA sınıf

II alelleri (HLA-DRB1 * 15, -DQB1 * 0501/2, -DRB3 * 03) olarak iki grupta da bulunmaktadır.

H-Y kısıtlayıcı bir HLA sınıf II aleline sahip olmak, RSA'lı olgularda; ilk doğan erkek çocuklarda canlı doğum olasılığını, ilk doğan kızlara kıyasla önemli ölçüde azaltır.

HY kısıtlayıcı HLA sınıf II alellerinin maternal olarak bulunması, tekrarlayan düşüğü olan olgularda; bir erkek çocuktan sonra, uzun vadeli canlı doğum şansını azaltmaktadır (Kolte ve ark., 2016). H-Y antikorlarının RSA'dan sorumlu faktörlerden biri olduğu düşünüldüğünde, genellikle IVIG (intravenöz immünoglobulin) infüzyonlarının dolaşımdaki antikorları nötralize etmek için tedavi olarak kullanıldığı ve bu olgularda doğum oranlarını iyileştirdiği gösterilmiştir (Popli ve ark., 2014).

Sensitizasyon için bir diğer önemli unsur Rhesus (Rh) alloimmunizasyonudur. ABO kan grubu sisteminden sonra, transfüzyon tıbbında Rh kan gruplama sistemi klinik olarak önem taşımaktadır. Rh 50'den fazla bağımsız antijenden oluşmakla birlikte oldukça polimorfiktir. Ortak Rh antijenleri D, C veya c ve E veya e'dir. Bunlardan, D-antijeni büyük ölçüde immünojeniktir ve genel olarak bir birey eritrositler üzerinde Rh D antijeni eksprese ederse Rh(+), eritrosit yüzeyi üzerinde D antijeni eksprese etmez ise Rh(-) olarak sınıflandırılır. Rh(-) bir kişinin, Rh(+) bir kişinin hücreleri ile karşılaşır % 80 oranında uyarılmış bağışıklık yanıtının olduğu görülmektedir. Gebelikte D-alloimmunizasyonu (Rh alloimmunizasyonu), anne ve fetüs arasındaki D-antijeninin uyumsuzluğundan dolayı ortaya çıkar. Bu uyumsuzluk, annenin D-antijenine duyarlılaşmasına ve ayrıca fetüsün Rh(+) eritrositlerine bağlanabilen ve hücre yıkımına neden olan anti-D antikorlarının üretimine yol açar. İlk gebelikte henüz D antijenine karşı duyarlılaşma gerçekleşmediği için Rh uyuşmazlığı sorun yaratmaz ancak daha sonraki gebelikler için olumsuz sonuçlar doğurur (Costumbrado ve ark., 2020).



Şekil 7. Gebelikte Rh faktörü (<https://coreem.net>. Erişim tarihi: 2021).

HLA antijen sistemi, hücre yüzeyi moleküllerinin, bağışıklık yanıtı farklılıklarının ve hormon reseptörleriyle hücre-hücre regülasyonu gibi çeşitli immünolojik fonksiyonları kontrol eden lokuslar içermektedir. HLA antijenlerinin, tekrarlayan spontan düşüklerin belirteci olduğu ve önemli olduğu belirtilmektedir.

Maternal periferik kan utero-plasental dolaşım sırasında sinsitiyotrofoblast tabakasıyla etkileşime girer. Sinsitiyotrofoblastlar, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 veya HLA-DQB1 moleküllerini eksprese etmediği için allojenik T hücresi aktivasyonunu indükleyemez. Bununla birlikte, plasental lezyonlar durumunda, fetal kan doğrudan maternal dolaşıma girebilir ve bir allojenik T hücresi tepkisine neden olabilir. Böyle bir yanıt, fetal HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 alloantijenlerinin tanınmasını sağlar (Tilburgs ve ark., 2009).

Desidua parietalis, koryonun invaziv olmayan trofoblastlara bağlı zarların maternal kısmını oluşturmakta iken; desidua basalis, implantasyon alanındaki plasentanın invaziv fetal trofoblastlara bağlı olan maternal kısmıdır. T hücre alt küme farklılıklarının yanı sıra, desidua basalis ve desidua parietaliste farklı NK hücre ve makrofaj alt kümeleri bulunur. NK hücreleri ve makrofajlar, desidua basalis ve desidua parietalis'teki immünolojik ortamı etkileyebilir ve böylece desidua basalis ve desidua parietalis'de T hücrelerinin akını, genişlemesini veya olgunlaşmasını farklı şekilde etkileyebilir. Bununla birlikte, dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), indoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO) ve FAS gibi moleküllerin ekspresyonundaki farklılık, desidua

basalis ve desidua parietalis'de T hücresi aktivasyonu ve regülasyonunu etkileyebilir (Tilburgs ve ark., 2009).

10.2.1. Bağışıklık Düzenleyici Ajanlar ve Gebelikte Bağışıklık Yanıtları

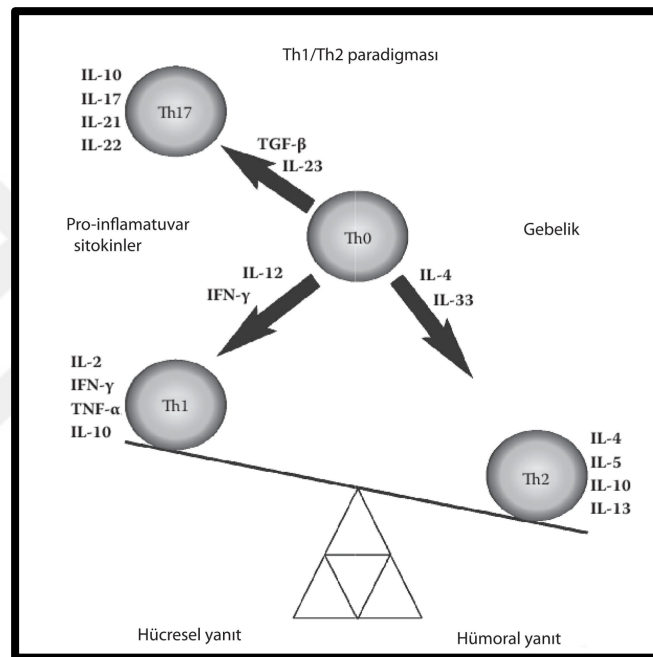
Uterin bağışıklık düzenlenmesi, uterin ortama hareket eden sitokinler, progesteron ve prostaglandinler gibi bağışıklı düzenleyici moleküllerin uyarılması ile sağlanır (Gupta, 2018).

Sitokinler, bağışıklık tepkisinin yerel/sistemik olaylarının, inflamatuvar reaksiyonların, iyileşmenin ve hematopoezin kontrolünde rol oynayan polipeptitlerdir. Trofoblastik ve desidual hücreler arasındaki iletişime sitokinler ve hücre yüzeyi reseptörleri aracılık eder. Desidua içinde bulunan trofoblastik ve lenfomiyeloid hücreler tarafından üretilen sitokinler, başlıca T lenfositleri (CD8 +), makrofajlar ve doğal öldürücü (NK)(CD56 +) hücreleri etkilemektedir. Hücreler arası iletişimin bir sonucu olarak, sitokin tiplerinin ve miktarlarının ekspresyonunda bazı değişiklikler meydana gelir. T-yardımcı (Th) hücreler, iltihabı uyarmak için sitotoksik T hücrelerini ve makrofajları aktive eder ve pro-inflamatuvar olan interlökin (IL)-1, IL-2 ve interferon (IFN) üretilen hücrelerel bağışıklıkta yer alır, Th1 hücreleri ve B hücreleri tarafından antikor üretimini uyarır. Th1'e antagonistik olarak etki eden IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13 ve benzeri sitokinleri üreten Th2 hücreleri humoral bağışıklığa da etki eder. Diğer bir sitokin paterni olan Th3 ise, IL-2, IFN, IL-4 veya IL-10 salgılamayan TGF salgılayan CD4+ hücrelerdir. Bu hücre grubu mukozal T yardımcı fonksiyonu içeren ve Th1'in diğer bağışıklık hücreleri ile birlikte kendisinden sonraki kaskadı düzenleyen bir T hücre altkumesidir. T yardımcı hücrelerin yanısıra birçok hücre tipi, genel bir Th1 veya Th2 sitokin paternine katkıda bulunduğundan, bu yanıtların tip 1 veya tip 2 olarak tanımlanması önerilmiştir.

Th3 hücreleri tarafından üretilen ve güçlü proliferatif hücrelerel yanıtları inhibe ederek gebelikte önemli rol oynayan TGFβ2'nin, düşük vakalarının desidualarında, normal gebeliği olan kontrol grubuna kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir. Desidual anti-proliferatif aktiviteden sorumlu olabilecek TGFβ2'den dolayı, gebelik sitokin yanıtlarının Th3 bağışıklık yanıtını da içerdiği belirtilmiştir (Raghupathy, 2001).

Th1 hücreleri, transkripsiyon faktörü TGF- β , ekspresyon artışı sağlayan STAT 4 ile karakterize edilirken; Th1'e antagonistik olarak etki eden Th2 hücreleri, GATA-3 ve STAT6 transkripsiyon faktörleri ile karakterize edilir.

Gebelikte Th1 bağışıklık yanıtı, akut allogreft reddinde merkezi bir rol oynarken, Th2 tipi sitokinlerin üretimi, allogreft toleransının indüksiyonu ve sürdürülmesi için merkezi rol üstlenmiştir. Başarılı gebelik Th2 tipi sitokin cevabına bağlı olabilirken, zayıf bir gebeliğin Th1 sitokinlerindeki artışla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Bates ve ark., 2002; Saini ve ark., 2011; Raghupathy, 2001).

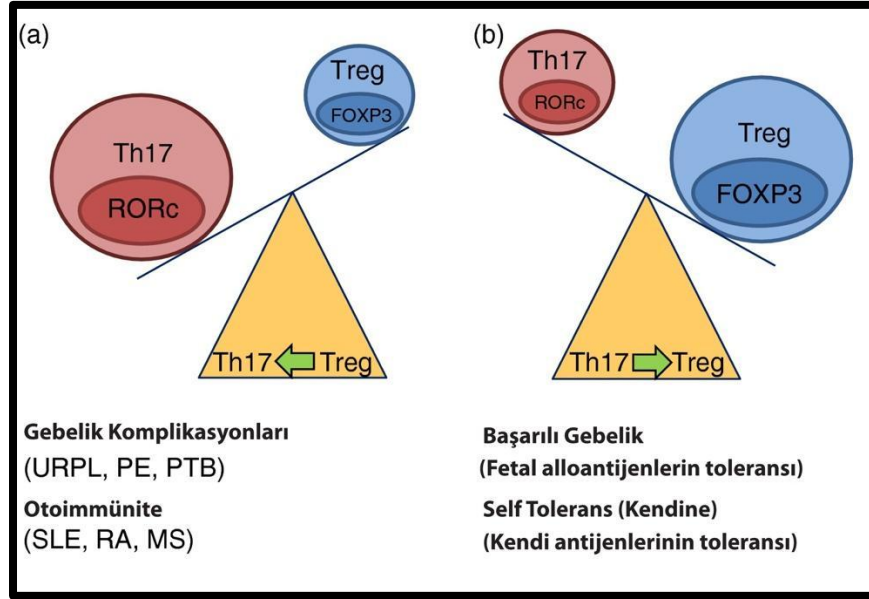


Şekil 8. Normal fizyolojik durumda ve hamilelik sırasında Th1/Th2 sitokin kayması (Pandya ve ark., 2015'ten değiştirilerek kullanılmıştır).

Ayrıca Th1 sitokinleri olan IL-1 β ve TNF- α 'nın polimorfizminin, iki veya daha fazla düşük yapan kadınlarda normal gebelikleri olan kadınlara kıyasla daha belirgin olduğu gösterilmiştir (Costeas ve ark., 2004). Bununla birlikte, tekrarlayan düşük vakalarında Th2 baskın bağışıklık yanıtının varlığı bildirilmiştir. Maternal- fetal arayüzde üretilen Th2 sitokinlerinin, hücresel sitotoksititeyi baskıladığı için gebeliğin sürdürülmesinde yararlı olduğu düşünülmektedir. Th1 sitokinlerinin, maternal-utero plasental kan damarlarında vasküler endotel hücre pro-koagulanlarının aktivasyonu ile trombotik ve inflamatuvar süreçleri tetiklediği öne sürülmektedir. Bu sitokinler, bir

pıhtılaştırıcı faktör olan fg12'nin kendisinden önceki kaskad basamaklarını etkileyerek gebelik kaybına neden olabilir. Başarısız gebeliği olan ve normal karyotipteki embriyolara sahip insanların trofoblast hücrelerinde, protrombini trombine dönüştürebilen fg12'nin arttığı bildirilmiştir. Bu durum, fibrinin birikmesine ve plasentanın vasküler kaynağını azaltabilecek polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonuna yol açmaktadır. Th-1 tipi sitokinler, semiallojenik fetüsün annenin bağışıklık sistemi tarafından 'farklı' olarak algılanmasını sağlayarak fetal ret veya kürtaja yol açan trofoblast bariyerlerini etkileyen apoptoza neden olur. Th2/Th3 tipi sitokinler ise, Th1 yanıtını baskılayarak bu işlemi antagonize edebilir (Raghupathy, 2001).

Maternal bağışıklık hücrelerinin fetüse tolerans mekanizmasını açıklamak için yetersiz olan Th1 / Th2 paradigması üzerine; Th1 / Th2 / Th17 ve Treg hücre paradigması da eklenmiştir. Pro-inflamatuar sitokin olan IL-17 üreten Th17 hücreleri, inflamasyonun indüksiyonu ve otoimmün hastalıkların patogeneğinde kritik bir rol oynar. Th17 hücreleri, (ROR) C2 reseptörü veya ROR-a ile eksprese etmektedir. Farklı bir yardımcı T hücresi grubu olan Th17, hücre dışı bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara karşı koruma sağlamaktadır. Farklılaşmak ve çoğalmak için IL-1 β , IL-6 ve IL-23 gibi sitokinlere ihtiyaç duyarlar (Teirilä ve ark., 2019). Son yapılan çalışmalarda, Treg ile Th17 arasındaki dengenin ve Th17/Treg oranının Th17 yönünde bir profile doğru kayması anne-fetüs arayüzünde inflamatuvar bir mikro çevreye sebep olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle Th17 yönündeki yangı reaksiyonunun tekrarlayan düşükleri olan kadınlarda arttığı gözlemlenmiştir (Abdol Mohammadi Vahid ve ark., 2019). Th17 hücrelerinin, Th1 / Th2 paradigmasındaki eksik bileşen olabileceği ve Th1 veya Th2 bağışıklığı ile açıklanamayan iltihaplanma sürecinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Treg, Th17 hücreleri gibi efektör hücrelere karşı koymak için önemli düzenleyici rol oynamaktadır ve düzenleyiciler arasındaki bağışıklık dengesi, implantasyonu sağlamak ve gebeliği sürdürmek için önemli rol oynar. Th1 ve Th2 bağışıklığına ek olarak, Th17 bağışıklığı ve düzenleyici T hücre aracılı bağışıklık düzenlenmesi, RSA patogeneğinde önemli rol oynar (Lee ve ark., 2012).



Şekil 9. T yardımcı tip 17 (Th17) / düzenleyici T (Treg) dengesinin (a) gebelik komplikasyonları ve otoimmünite ve (b) sağlıklı bir hamilelik olarak açıklaması (Figueiredo ve ark., 2019'dan değiştirilerek kullanılmıştır).

Embriyonik ve fetal gelişimi inhibe eden TNF- α ve IFN- γ sitokinleri embriyonik fibroblast benzeri hücrelere sitotoksiktir ve dolaşımdaki seviyeleri başarılı bir hamileliği etkilemektedir. Genel olarak NK hücreleri ve mononükleer fagositler tarafından salgılanan ve birden fazla fenotipe etki eden sitokin, TNF- α hormonlarla birlikte hareket eder ve plasentada tromboza neden olarak spontan düşüğe neden olabilir. TNF- α ve lenfotoksin- α (LT- α) 'nın bilinen düşüğü tetikleyen etkileri ile beraber pro-apoptotik gen ekspresyonunun fetal membranlarda indüklenmesi, membran bozunumunu hızlandırmaktadır. Bunun beraberinde NK hücreleri ve makrofajlar aktive olarak düşük yapmayı kolaylaştırır. Bu nedenle açıklanamayan tekrarlayan düşük vakalarında sitokinlerin anormal üretimi, anormal plasental büyümesi ve devamında düşüklerle sonuçlanabilir. Tekrarlayan düşük yapmış olan vakaların trofoblast tabakasında desidua lara kıyasla daha az TNF- α olduğu gözlemlenmiştir. Sitokinler, hipofiz hücre fonksiyonlarını da etkilemektedir ve büyüme hormonu (GH), prolaktin (PRL) dahil hipofiz hormonları, tiroid uyarıcı hormon (TSH), LH ve folikül uyarıcı hormon (FSH); IL-1 α ve β , IL-6, TNF- α ve IFN- γ sitokinlerinin etkisi altındadır. Östrojen hormonu da T hücreleri tarafından IFN- γ üretimini indükleyerek IL-2 ve IFN- γ tarafından düzenlenen, NK hücre fonksiyonunu arttırabilir. Bu iki sitokin, NK sitotoksitesini arttırmak için aynı görevi

üstlenmektedir. Bu nedenle, hormonal etkiler materno-fetal arayüzde T hücresi, sitokin paterninin belirlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Saini ve ark., 2011).

Piccinni ve arkadaşları, progesteronun Tip 2 sitokinleri üreten insan T hücrelerinin gelişimini desteklediğini göstermiştir ve feto-maternal arayüzde kısmen Tip 1/Tip 2 anahtarından sorumlu olabileceğini önermiştir. Th1 / Th2 dengesini etkilemeye yönelik progesteronun izlediği başka bir yol Szekeres-Bartho ve Wegmann tarafından 1996'da gösterilmiştir. Hamile kadınlardan alınan lenfositler, progesteron kaynaklı bloklama faktörü (PIBF) olan bir immuno-modülatör protein üretmektedir. Bu durum in vitro olarak birkaç Th1 tipi yanıtı inhibe etmektedir.

Th1 / Th2 dengesini iyi yönde etkileyen progesterona ek olarak, Prostaglandin E (PGE)'nin, IL-2 üretimini inhibe ederek Th1 hücrelerini inaktif etme ve NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesini durdurması nedeniyle bu sitokin kaskadında önemli olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle PGE'nin de Tip 2 bağışıklık yanıtının lehine olan faktörlerden biri olduğu belirtilmiştir. Bunun yanı sıra glukokortikoid hormonlarının, IL-2 ve IL-4 üretimi üzerinde farklı etkileri olduğu bilinmektedir. Normalde IL-2'nin baskın olduğu tepkiler, IL-4 baskın olan bir duruma kaymaktadır. Bu nedenle gebelikteki steroid hormon değişiklikleri desidual lenfositleri etkileyerek Tip 2 bağışıklık yanıtı lehine dönüşebilmektedir. (Raghupathy, 2001).

Sitokin ortamını etkileyen faktörlerden olan steroid hormonlarına ek olarak, embriyonun kendisi IL-8 gibi kemokinlerin endometriyal ekspresyonunu düzenleyebilir. Desidual dokulardaki maternal bağışıklık yetkin hücreler tarafından çeşitli sitokinlerin üretimi, trofoblastik hücrelerin büyümesini teşvik etmektedir. Bunlardan bazıları, CSF2 olarak da bilinen GM-CSF (granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör), CSF1 (koloni uyarıcı faktör), LIF (lösemi inhibe edici faktör), heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF), insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGFI) ve IGFII olarak bildirilmiştir. Yaygın olarak incelenen faktörlerden biri uterusu kaplayan epitel hücreleri tarafından üretilen GM-CSF'dir. Normal blastosist gelişimi, fetal canlılık için gerekli olan GM-CSF, stres yanıtını baskılayarak, apoptozu inhibe eder ve glikoz alımını kolaylaştırarak ve güçlü bir anti-hücre stres etkisi uygulayarak embriyonun blastosist aşamasına kadar gelişmesini destekler. CSF2 geninde, RNA'ya

kopyalanmamasına ve/veya fonksiyonel bir protein ürününe dönüştürülmemesine yol açan bir mutasyon (null mutasyon) olduğunda, hücre sayısı azalır ve blastosistlerde apoptozu arttırarak değişmiş fetal ve plasental büyüme ile yavrularda hızlandırılmış büyüme yörüngesi oluşturarak erişkinlerde metabolik disfonksiyon gibi olumsuz sonuçlar doğurur.

Sitokin ortam implantasyondan önce Th1, Th2 veya Th17 fenotiplerinin aksine Treg hücrelerinin üretilmesinde ve ortama uygun sitokin uyarılarının salınması için büyük önem taşımaktadır. Bağışıklık baskılayıcı ve anti-inflamatuar etkileri ile tanınan TGF- β , indüklenabilir Treg gelişimi için özellikle önemlidir ve dendritik hücrelerin işlevini, sinyalleme özelliklerini modüle ederek olgun Treg hücrelerinin çoğalmasını sağlayabilir. Treg hücrelerinin üretimini ve inhibe etme kapasitesini arttırmak için TGF- β ile sinerji oluşturan PGE₂ de gereklidir. Peri-implantasyon döneminde aşırı inflammatuar sitokinler olan TNF (tümör nekroz faktörü), IFN- γ ve IL-2'nin de implantasyon başarısını engellediği bildirilmiştir (Robertson ve ark., 2014).

Ayrıca, T-yardımcı 1 (Th1) ile tetiklenen hücre aracılı bağışıklıktan T-yardımcı 2 (Th2) ilişkili humoral bağışıklığa geçiş, gebeliğin immünolojik olarak başarılı devam etmesi için gereklidir (Imai ve ark., 2001). Ağırlıklı olarak Th-1 sitokin profili ile ilişkili olan tekrarlayan düşük vakalarında, TNF-a, IFN- γ ve IL-10 gibi birçok sitokin genlerinde polimorfizmlerden bahsedilerek, bu değişimlerin birçok komplikasyon ile ilişkilendirilebileceği belirtilmiştir. Özellikle IL-10 promotör polimorfizmlerinin tekrarlayan düşük patogenezinde rol aldığı düşünülmüştür. IL-10 gebeliğin korunmasında önemli bir Th-2 tipi sitokindir (Saini ve ark., 2011).

Th-2 tipi sitokinlerin hamilelik için gerekli olmadığı ancak Th-1 tipi sitokinlerden sapma sağlayabileceği daha ön plandadır. Th2 bağışıklık yanıtının önemli düzenleyicilerinden olan IL-10; IL-12 ve IFN- γ gibi Th1 bağışıklık yanıtı sitokinlerinin azaltıcı yönde düzenlenmesini sağlayarak gebeliğin korunması için büyük önem taşımaktadır. Gebelikte Th1 indükleyici rol oynayan IL-12, tekrarlayan düşük öyküsü olan vakalarda, normal gebeliği olanlara kıyasla anlamlı düzeyde artış gözlemlenmiştir. Desidual büyük granüler lenfositler (LGL) tarafından IFN- γ salınımını uyarayan IL-12'nin bu etkisi desidual makrofajlarla çoğaltılır (Raghupathy, 2001).

Gebeliğin korunmasında gerekli olan bağışıklık baskılayıcı durum, IL-10 ve tümör büyüme faktörü (TGF;Th3)'nün maternal dokular tarafından ekspresyonu ve eşzamanlı pro-inflamatuar Th1 sitokin, IFN- γ ve tümör nekroz faktör (TNF)'ünün inhibisyonu ile kurulmaktadır (Costeas ve ark., 2004).

Son zamanlarda, spiral arterlerin yeniden modellenmesi için gerekli olan IFN- γ 'nin hamilelik için yararlı olabileceği ve Th-1 sitokinlerinin ifade zamanlarına, gebelik evrelerine ve konsantrasyonlarına bağlı olarak gebelikte olumlu rol oynayabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, tekrarlayan spontan düşük vakalarında ilk trimesterde IFN- γ düzeylerinin, normal gebeliğe kıyasla daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Normal gebelikte tip 2 bağışıklık yanıtı sapması, RSA grubuna oranla daha belirgindir ve RSA'lı kadınlarda tip 2 sitokinleri olan IL-6 ve IL-10'un ve TNF serum düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (Saini ve ark., 2011).

Hamilelikte uterus, gebe kalmadan başlayan ve doğumla sonlanan süreç boyunca birçok dönüşüme uğrar. Yeni döllenmiş bir yumurtanın blastosist aşaması, embriyo gelişimini başarması ve uterus dokusuna başarılı bir şekilde istila etmesi için, bağışıklık hücresi alt kümelerinin ve bu mekanizmalara eşlik eden diğer faktörlerin oluşturduğu bir denge gereklidir. Hem önceden var olan yerleşik hücrelerin çoğalması hem de çevreden göç ile ortaya çıkan uterin bağışıklık hücreleri; sağlıklı bir rahimde, tolerans/ret arasındaki ve doku yeniden modellenmesi ile yaşlı hücrelerin temizlenmesi arasındaki ince dengeyi kontrol eder. Lokal mikro çevresel sinyalleri tanıyıp bunlara yanıt oluşturur. Spermatozoa taşıyan seminal sıvı, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerini toplar ve implantasyonun inflamasyon benzeri T hücre yanıtını başlatır ve fetüsün kaderini aslında bu yanıt belirler. Bu yüzden seminal sıvıdaki bağışıklık düzenleyici sinyallerin dengesi; kadın bağışıklık toleransının kalitesi ve implantasyonu destekleme, ve tam süreli gebelik elde etme yeterliliği açısından kritik öneme sahiptir. Seminal sıvı ile indüklenen Treg hücrelerinin kandan endometriuma geçişi ise, başarılı embriyo implantasyonu için gerekli olan endometrial reseptiviteyi teşvik etmektedir. Böylece, trofoblast hücrelerinin istilasına ve sağlam plasental gelişim için gerekli vasküler değişikliklere neden olmakla birlikte, embriyo ölümüne neden olacak aşırı inflamasyonu da baskırlar. Bu durum nötrofillerin akınına, ardından makrofajlara ve dentritik hücre (DC)'lere ek olarak insan servikal

epitelyumuna ve daha derin stromal bölmelere bol miktarda bellek T hücresi indükler. Daha sonra, lökosit alımına sitokin sinyali, inflamasyon, antijen (Ag) sunumu ve lökosit alımı ile ilişkili genlerin indüksiyonu da eşlik eder. Bazı in vitro çalışmalar, primer endometriyal epitel hücrelerinde CSF2, IL-1B, IL-6, CXCL8, LIF, VEGFA ve TGF- β 'yi kodlayan genlerin indüklediğini göstermiştir.

İmplantasyon sırasında adaptif bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan dendritik hücreler ana rol olarak antijen sunmakla görevlidirler. Ancak mürin sistemde yapılan bir çalışma dendritik hücre azalması sonucu meydana gelen düşüklerde progesteron hormonunun kurtarıcı olduğunu belirtmektedir. Bu durum bağışıklık hücre yanıtının yanısıra hormon ortamının önemine işaret etmektedir. Bununla birlikte in vitro çalışmalar, yumurtalık hormonlarının insan DC (dendritik hücre)'lerinin, T hücrelerini uyarma yeteneğini inhibe ettiğini ve bu implantasyonda bağışıklık düzenlemesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Olgunlaşmamış DC'ler endometriumda bol miktarda bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, desidual DC+ işaretli hücrelerin oranının, normal gebeliklere kıyasla, düşük olgularından alınan numunelerde önemli ölçüde düşük miktarda olduğu saptanmıştır (Tirado-Gonza'lez ve ark., 2010). İnsan desidual makrofajları invaziv trofoblastın yakınında lokalize olur ve trofoblast invazyonu ile birlikte plasental gelişime katkıda bulunur. İmmünoşüpresif fenotip gösteren makrofajlar; TGF- β , IL-10 ve IDO salgılayarak iki farklı insan desidual makrofaj alt kümesi oluşturarak farklı gen ekspresyon paternleri gösterir.

Maternal tarafta, desidual makrofajlar ağırlıklı olarak anti-inflamatuar (M2) tiptedir. Sağlıklı bir gebelikte, desidua'nın erken M2 polarizasyonu mevcutken, M1 baskın gebelikler spontan düşüklerle ilişkilendirilmiştir (Teirilä ve ark., 2019). Makrofajların aksine, DC'lerin desidual proliferasyon ve farklılaşmayı teşvik ederek desidualizasyon sürecine doğrudan dahil olduğu varsayılmaktadır. Feto-maternal arayüzünün tolerans mekanizmasında önemli rol oynayan IDO'nun ortamındaki T hücresi aktivasyonu, enerjik ve düzenleyici T hücrelerini indükler. IDO ve daha sonraki bölümde anlatılacak kompleman sistemi arasındaki tam etkileşim bilinmemekle birlikte, mürin sistem çalışmalarında IDO inhibisyonunun lokal kompleman aktivasyonunu açığa çıkardığı ve iltihaplanmayı teşvik ettiği belirtilmiştir (Teirilä ve ark., 2019).

Öte yandan, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinden biri olan mast hücreleri, uNK'lar ile birlikte uterus spiral arterlerinin (uSA) yeniden modellenmesinde kritik öneme sahiptir. Farelerde, hem uNK hem de uterus mast hücrelerinin eş zamanlı olarak tükenmesinin gebeliği kritik bir şekilde bozduğu belirtilmiştir.

Doğuştan gelen bağışıklık hücrelerine ek olarak, fetomaternal arayüzde gebelik boyunca mevcut kalan adaptif T ve B hücreleri bulunmaktadır. Gestasyonel dönemde aşamalı olarak artan T hücre repertuarı, T hücre havuzunun yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır. Bu oran periferik kandaki prevalansın neredeyse iki katıdır. Mürin sistemde, desidual CD4⁺ ve CD8⁺ hücreleri eşitken, insan desiduasında CD8⁺ hücrelerinin miktarı CD4⁺ hücrelerinden daha fazladır. Desidual efektör T hücreleri, daha fazla IFN- γ ve IL-4 salınımını indüklemekle birlikte, lokal hormonal ortamda gerekli olan progesteron da T hücrelerine katkıda bulunarak özellikle IL-4 indüklenmesine yardımcı olmaktadır. T hücrelerinin, fetüse özgü koruma sağladığı üç farklı mekanizması bildirilmiştir. Bunlardan ilki; inhibitör kontrol nokta proteinlerinin ekspresyonu; ikincisi, desidual stroma hücrelerinde kemokin geni susturması nedeniyle efektör T hücrelerin sınırlı infiltrasyonu; üçüncüsü ise, Treg hücrelerinin varlığıdır. Hamilelik boyunca sürekli genişlemesinin gerekli olduğu düşünülen ve orta gestasyonel dönemde ortadan kaldırılması fetal ret ile sonuçlanan mürin Treg hücreleri, birçok araştırmacı tarafından insan desiduası için hala tartışma konusudur. Normal gebelik koşullarında, desidual stromal ve sitotrofoblast hücreler ile birlikte desidual lökositler çeşitli kemokinler üretir. Örneğin; mürin sistemde CCL19 kemokini, CCR7 eksprese eden Treg hücrelerini çekerek yerel bir T hücre popülasyonu oluşturur. CCR7 ekspresyonu olmayan farelerde ise, Treg hücre bulunmaması, aktive edici T hücre artışına sebep olarak uterus inflamasyonu ile sonuçlanmaktadır. FoxP3 ifadesinde ve dolayısıyla Treg hücrelerinin ifadesindeki azalma tekrarlayan implantasyon başarısızlıkları ile ilişkilendirilmiştir.

Diğer bağışıklık hücresi popülasyonlarının aksine, B hücreleri dişi üreme sisteminde nadir olarak bulunur. Th2 sitokinlerinin varlığı, fetomaternal arayüzde plasental B hücrelerini etkileyerek asimetrik antikor üretimini sağlar. Bu asimetrik antikor, yabancı fetal antikora karşı koruma sağladığı bilinen spesifik bir antikor çeşididir. Bu antikoru salınımından sorumlu, trofoblast kaynaklı insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu B hücrelerini etkileyebilir ve hamileliği koruyucu bir

fenotipe sahiptir. Aynı zamanda hCG, geleneksel B hücrelerinin düzenleyici B (Breg) hücrelerine dönüştürülmesine neden olmakla birlikte, yüksek seviyelerde anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 salgılar. İnsan Breg hücrelerinin indüksiyonu, normal gebeliğin bir özelliğidir ve bozulmuş bir Breg hücresi büyümesi, gebelik yetmezliği ile ilişkilendirilmektedir (Schumacher ve ark., 2018).

Özet olarak; gebeliğin korunmasında immünolojik açıdan anne-fetüs arayüzünde oluşan mikroçevre tipi ve çeşitli bağışıklık hücrelerinin etkileşimleri arasındaki denge oldukça önemlidir. Tekrarlayan düşüğü olan hastalarda, sağlıklı gebelere kıyasla inflamasyonun varlığı ve mikroçevrenin genel olarak Th1 veya Th17 fenotipinde olduğu görülmektedir. Eşler arası HLA antijenleri üzerinden oluşabilecek bir ret cevabı da tekrarlayan düşük ile sonuçlanabilir.

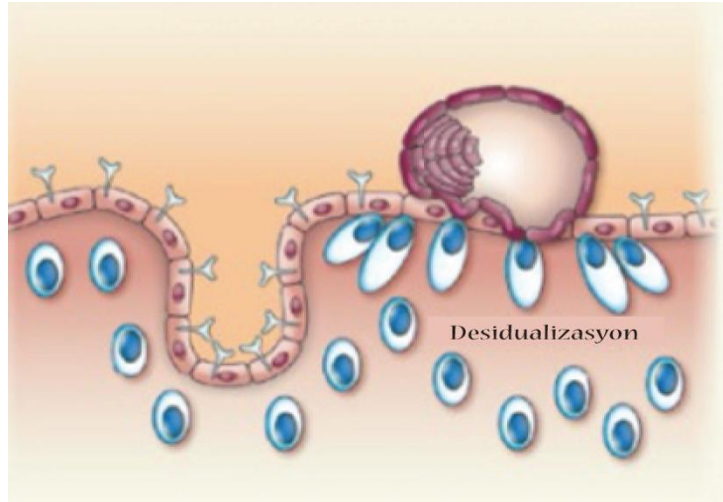
NK hücreleri, sitotoksik T hücreleri, Treg hücreleri ve sitokin ağlarını içeren çeşitli hücrelerel bağışıklık tepkileri bu süreçle ilişkilidir. Dolayısıyla, başarılı implantasyon ve gebelik için kompleks hücrelerel ve humoral bağışıklık yanıtları ön plandadır.

10.3. İnsan Endometriumun Yapısı ve Fonksiyonu

Endometrium, genellikle yarı allogreft olarak kabul edilen, immünolojik olarak anneden farklı olan ve bir embriyo ile doğrudan teması bulunan maternal dokudur.

Embriyonun uygun şekilde yerleştirilmesi, implantasyonu, istilası ve gelişimini / olgunlaşmasını sağlayan, bir endokrin / parakrin bağışıklık ortamı yaratmaktadır (Ticconi ve ark., 2019). Yaşam boyunca yaklaşık 450 kez yenilenen insan endometriumu döngüsel olarak yoğun büyüme aşamalarından geçerek kadın seks hormonlarının sıralı ve kontrollü etkileşimi ile oluşan düzenli adet döngüsü, adet onarımı, proliferasyon ve salgı farklılaşması döngülerine maruz kalmaktadır. Lokal otokrin ve parakrin molekül seviyeleri adet döngüsü sırasında değişir ve uterus fonksiyonunda önemli rol oynar. Karmaşık çok hücreli yapıya sahip olan insan endometriumu, gebeliği desteklemek için yeniden şekillenerek uygun bir mikro ortam oluşturur. Desidualizasyon, implantasyon ve yerleştirme olaylarını içeren gebelik süreci boyunca bu geçişlerin oluşturulması için yüksek estradiol (E₂) ve progesteron gibi steroid hormonlarına yanıt olarak ortaya çıkan bir süreçtir (Şekil 4).

Desidual transformasyonu teşvik eden peptit hormonları ve prostanoidler arasında ise gonadotropinler, luteinize edici hormon / insan koriyonik gonadotropin (LH / hCG), kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH), relaksin (RLX) ve PGE₂ bulunur (Gellersen ve Brosens, 2003). Bir embriyonun implantasyonu ve maternal plasenta oluşumunda önemli bir rol oynayan ve uterusun bir parçası olan maternal desidua, insan endometriyal stromal hücrelerinden (HESC'ler) oluşur. Desidualizasyon; uzamış, fibroblast benzeri yapının progesteron ve siklik adenosin monofosfat (c-AMP) tarafından uyarılarak morfolojik ve fonksiyonel farklılaşması sonucu yuvarlak, epitelioid benzeri mezenkimal hücrelere dönüşme evresidir (Zhou ve ark., 2019). Desidual sürecin başlatılması, hücre içi ikinci haberci molekülü olan c-AMP seviyeleri ve onun etkileşimde olduğu en büyük alıcısı olan protein kinaz A (PKA) yolunun sürekli aktivasyonunu gerektirmektedir (Gellersen ve Brosens, 2003). İnsan desidual hücreleri epitelioid hücrelerin özelliklerini göstererek genişlemiş ve yuvarlak çekirdekli, artan sayıda nükleole sahip, yoğun membrana bağlı salgı granülleri, glikojen ve lipid damlacıklarının sitoplazmik birikimi ve geniş granüllü endoplazmik retikulum/golgi komplekslerine sahiptir (Okada ve ark., 2018; Pan-Castillo ve ark., 2018).



Şekil 10. Desidual transformasyon oluşumu (Mader R., 2013'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Desidualize olan HESC'ler, desiduada ana hücre tipi olup implante olan blastosist için beslenme kaynağı sağlar. HESC'lerde morfolojik değişiklik, uterus bezlerinin salgı dönüşümü, uNK hücrelerinin akışı ve büyüyen implante olmuş

embriyoya maternal kan akışı sağlamak için vasküler yeniden şekillenme ile karakterizedir. İnsan desidualizasyonu, yumurtlamadan yaklaşık 6 gün sonra, varsayılan implantasyon penceresinin başlangıcında başlar. Gebeliğin oluşması ve sürdürülmesinde merkezi rol oynayan desidual reaksiyonun bozulması; infertilite, tekrarlayan düşükler ve utero-plasental bozukluklar gibi çeşitli gebelik komplikasyonlarına yol açabilmektedir.

Endometriyumda, artmış veya azalmış metabolizma sonucu hücreler tarafından üretilen serbest radikaller, oksidatif strese yol açarak birçok hücre içi reaktif oksijen türlerini indükler. Farklılaşmamış HESC'lere kıyasla oksidatif hücre ölümüne karşı oldukça direnç gösteren desidualize HESC'ler, embriyonik büyüme ve hayatta kalmada kritik bir rol oynayan endometriyal vaskülatürün yeniden şekillenmesini ve gelişmesini destekler (Ruder ve ark., 2008).

İnsan endometriyumu yapısı gereği morfolojik olarak iki farklı katmanda incelenebilir. Üst katmanın üçte ikisine **fonksiyonelis** denirken, alt üçte biri **basalis** tabakası olarak adlandırılmaktadır. Fonksiyonelis tabakası, uterusu menstrüasyon döngüsü sırasında olası bir blastosistin implantasyonuna hazırlamak ve endometriyal dokunun çoğalması, salgılanması ve dejenerasyonundan sorumludur. Basalis tabakası ise menstrüel siklus boyunca önemli ölçüde değişmese de, endometrium dokusunun rejenerasyonunda önemli bir rol oynar. Bulunduğu faza bağlı olarak değişen endometriyum, adet başlangıcında ve adet sırasında nispeten ince ve yoğun olmakla birlikte kararlı bazalis bileşeninden ve azalmış fonksiyonelis tabakasından oluşmaktadır. Fonksiyonel endometriyumun neredeyse üçte ikisi dökülerek kaybedilen dokuyu yerine koyabilmek için hızlı bir onarım başlar; beş ile altı güne kadar yeniden tüm uterus boşluğunu kaplayan yeni bir yüzey epitelyumu oluşturulur.

Proliferatif fazın sonunda 0,5 mm'den 3,5-5 mm'ye kadar büyüyen endometriyum, sekiz ile onuncu günlerde östrojenin de etkisiyle en yüksek çoğalma dinamiği gösterir. Gebelik olmadan da insan desidua hücresi rutin olarak oluşup endometriyumda bir embriyo olmadan dökülmektedir (Mader, 2013; Okada ve ark., 2018). İnsan endometriyumu uterus boşluğunu oluşturan **parametrium**, **miyometriyum**, **endometriyum** olarak üç katmandan ve buna ek olarak çok katmanlı bir **mukozadan** oluşur. Çok katmanlı mukozaya, bir embriyonun implantasyonu ve aynı

zamanda gebelik boyunca optimum koşulların sağlanması için önemlidir (Mader, 2013).

Endometriyumun salgı fazındaki progesterona yanıt vermesine izin veren progesteron reseptörünün (PR) ekspresyonunda E₂ önemli bir rol oynar. Hamileliğin kurulması ve sürdürülmesinde önemli olan progesteronun ovulasyon sonrası düzey yetersizlikleri infertilite ve tekrarlayan düşüklerle ilişkilendirilmiştir. Progesteron, PR nükleer reseptörüne bağlanıp onu aktive ederek gebelik hazırlık aşamasında endometrial homeostazı korunmasını uyarır. A ve B alternatif transkriptleri olmak üzere iki ana formdan oluşan PR, sekretuar fazda ve gebelik sırasında stromal hücrelerde yüksek oranda ifade edilirken, ovulasyon sonrası epitel hücrelerindeki ekspresyonu azalmaktadır. Bu yüzden, insanlarda PR aracılı ancak özellikle PR-B formu aracılı progesteron sinyalleme; desidualizasyon ve başarılı bir implantasyon için önemlidir.

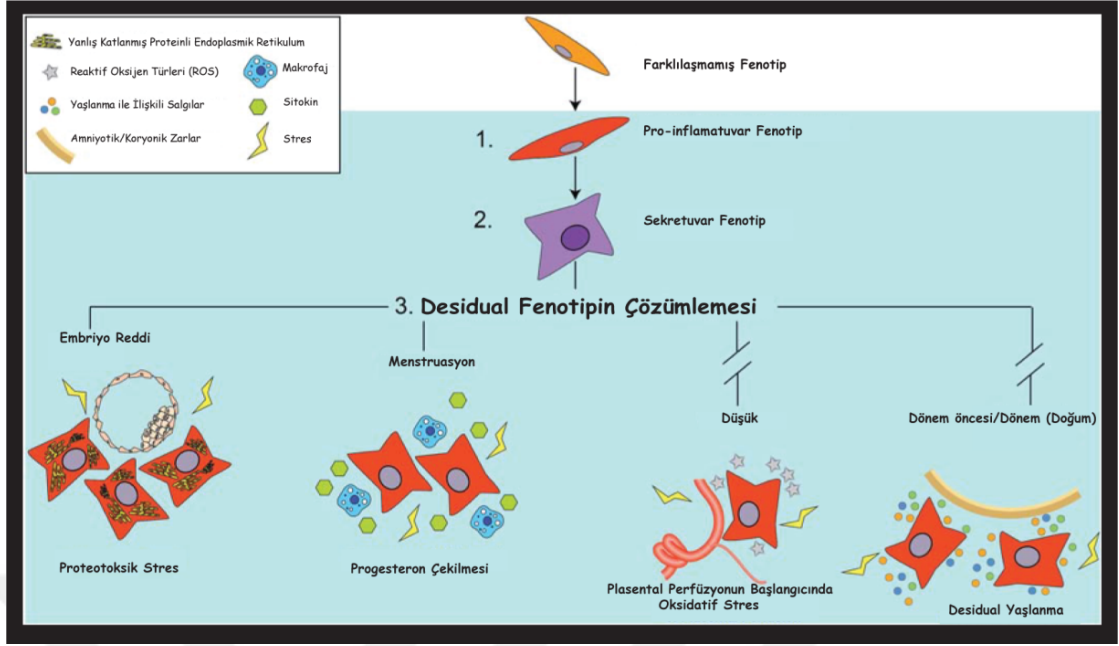
Trofoblast istilası, proteolitik degradasyon ve hücre dışı matrisin (ECM) yeniden modellenmesi gibi mekanizmaları gerektirir. ECM yeniden şekillenmesi implantasyon için embriyonun hazırlanması ve hormonal olarak ortamın düzenlenmesi açısından gereklidir. Desidualize olan stromal hücreler tarafından üretilen başlıca ECM proteinleri, fibronektin, tip IV kolajen, laminin, dekanin ve heparindir. ECM yapısında bulunan FBLN1 gibi glikoproteinler ise hücre adezyonu, göçü, proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynayarak epitelyumdan mezankimik geçişi sağlar. Bu geçiş sırasında, N-cadherin ekspresyonunun yerini E-cadherin alır, vimentin seviyeleri düşer ve Snail ekspresyonları artar (Pan-Castillo ve ark., 2018).

Trofoblastlar tarafından salgılanan matris metaloproteinazlar (MMP'ler), ECM yıkımına dahil olur. Desidua aynı zamanda, trofoblastlar tarafından salgılanan MMP'lerin, ECM yıkımına sebep olan proteolitik aktivitesini antagonize etmek ve trofoblast istilasını sınırlayarak endometriyumu hasardan korumak için metaloproteinaz doku inhibitörü (TIMP) üretir. Bu nedenle, desidua fiziksel ve biyokimyasal bir bariyer oluşturarak kendini korumaktadır (Okada ve ark., 2018).

Trofoblast istilasının koordine edilmesi ve plasental formasyonun düzenlenmesinde gerekli olan desidualizasyon, görülmemiş bir salgı fenotipine sahiptir. Desidualizasyonun belirteçleri olarak kullanılan iki protein olan insülin benzeri büyüme faktörü bağlama proteini 1 (IGFBP-1) ve PRL, desidual stromal

hücrelerin başlıca salgı ürünleridir. Bu faktörler, uNK hücre akışını düzenleyerek ve bağışıklık reddini önleyerek anjiyogenezi teşvik etmektedir. Ayrıca, desidual-plasental arayüzde trofoblast büyümesini ve istilasını uyarak desidualizasyonun kontrolünde önemli rol oynarlar (Okada ve ark., 2018). Adet döngüsü sırasında meydana gelen endometrial anjiyogeneze, E2 ve progesteron gibi hormonların kontrolü altında olmasına rağmen diğer düzenleyiciler tarafından da kontrol edilmektedir. Endometriyal anjiyogeneze için önemli düzenleyiciler arasında VEGF, fibroblast büyüme faktörü, trombospondin, relaxin, adrenomedullin, stromal hücreden türetilmiş faktör 1, prostaglandinler, prokinetkinler, anjiyojeninler gibi faktörler bulunmaktadır (Albrecht ve Pepe, 2010; Tsuzuki ve ark., 2013).

Interlökin seviyesinde, HESC'lerin desidualize olması IL-11 sekresyonunun PRL ve IGFBP-1 ifadesine paralel olacak şekilde gerçekleşir. IL-11 sinyalleşmesinin inhibisyonu, bu farklılaşma belirteçlerinin ekspresyonunu zayıflatmaktadır. IL-11 ve reseptör ünitesi IL11R orta tabaka salgı endometriyumunun desidualize edici stromal hücrelerinde yer alır. IL-1 ise, laminin, fibronektin, vitronektin ve osteopontin gibi çeşitli ECM ligandlarını bağlayan bir anahtar gören ve implantasyon yapışma molekülü olan α_3 integrin'i yukarı regüle ederek fetal implantasyonu ve desidualizasyonu destekleyen önemli bir embriyonik sinyaldir. Ayrıca IL-1, siklo-oksijenaz 2 (COX-2) ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek PGE₂ üretiminin ve c-AMP birikiminin artmasını sağlar. Daha sonrasında IL-1, matris metaloproteinaz-3 (MMP-3)'ün aktivitesini artırarak ECM degradasyonunu ve hücre iskeletinin yeniden şekillenmesini teşvik ederek stromal hücrelerin morfolojik dönüşümünü kolaylaştırır (Gellersen ve Brosens, 2014).



Şekil 11. Desidualizasyonun dinamik yolağı (Gellersen ve Brosens, 2014'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Normal fizyolojik koşullarda, endometriyal stromal hücreler başlangıçta pro-inflamatuvar bir fenotipte iken sonrasında anti-inflamatuvar bir fenotipe geçmesi gerekir. Tekrarlayan düşüklü vakalarda, bağışıklık sistemi araçlarını ve hücrelerini içeren düzensiz desidual farklılaşma ve bu oluşumun zamanlama hatalarından dolayı anti-inflamatuvar fenotipe geçememesi söz konusudur (Okada ve ark., 2018; Pan-Castillo ve ark., 2018; Gellersen ve Brosens, 2014).

İlk haftadan implantasyon sonrası sürecine kadar plasenta gelişimi şu şekilde oluşmaktadır;

Öncelikle insan blastosistinin dış katmanını oluşturan trofektoderm (TE), döllenmeden sonraki yaklaşık 4-5 gün sonra gelişmeye başlar; daha sonra gelişim sırasında iç hücre kütesinden (ICM) ayrılarak embriyoya uygun ortam oluşturur. ICM'ye yakın olan polar TE ile uterus luminal epitelyumu, gebe kalındıktan sonraki 6-7 gün içerisinde implantasyon ile sonuçlanarak plasenta gelişim sürecinin başlatır. İmplantasyondan sonra TE'nin kök hücreleri (TESC), gebe kalındıktan sonraki 8.günde ilk troblast hücrelerini, erken mononükleer sitotrofoblastları ve maternal desiduaya doğru genişleyen ilk invaziv plasenta hücre tipi olan çok çekirdekli primer sinsitiyumu (PS) oluşturur. Bunlar oluşurken, ICM sırasıyla epiblast ve ilkel endoderm olarak da adlandırılan iki katmanlı bir epitel yapıya dönüşmektedir. Bu yapılar

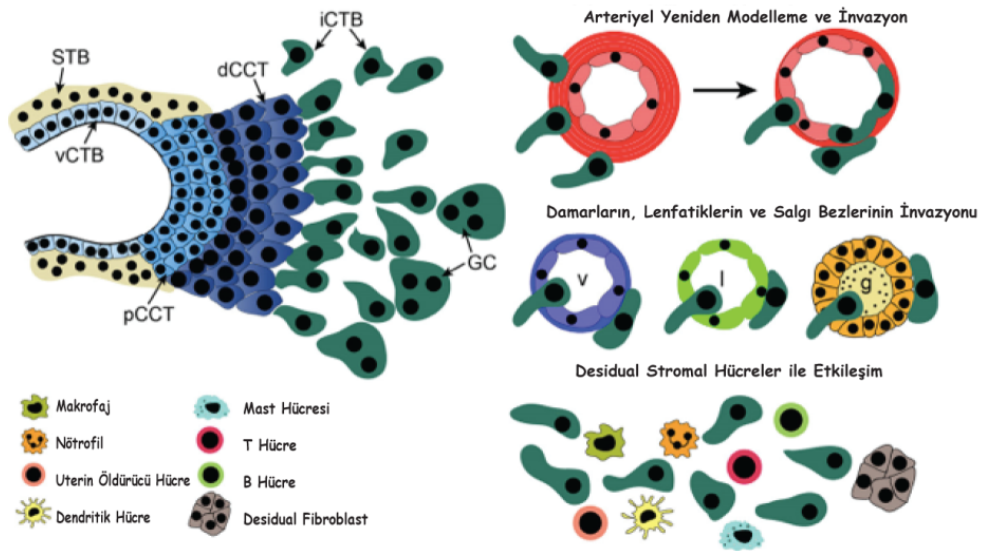
embriyo ve ilkel yolk sac kesesidir. Gebelik sonrası 10. günde plasental villusun gelişme ve morfogenezi başlamaktadır.

Gebelik sonrası 15. günde epiblast üç embriyonik germ katmanını ve amniyonu oluşturmaktadır. PS'de yaklaşık olarak 9. günde vakuoller görülür ve 12-13. günlerde maternal uterin kılcal damarları (UC) ihlal eden arterler üzerine oluşan laküner bir boşluk oluşur. Ps genişlemesi sırasında proliferatif sitotrofoblastlar genişleyerek birincil villusları oluşturur ve bu villuslar da alt tabaka maternal desiduaya doğru genişleyerek uterus kan damarlarını ve bezlerini aşındırırlar. Sonraki günlerde ekstra-embryonik hücrelerin birincil yapılara göçü ile ikincil villuslar oluşturulur; eş zamanlı olarak villöz sitotrofoblastların gelişip çoğalması ve hücre füzyonu ile epitelyal yüzey artışı görülür.

Sonraki süreçte dışta çok çekirdekli bir sinsitiotrofoblast tabakası oluşturularak anne ve fetüsün arasındaki besin ve gaz değişimi için bir arayüz oluşturulur. İnsanda koryonik gonadotropin (hCG) ve plasental laktojen salgıladığı düşünülen sinsitiotrofoblastlar asimetric hücre bölünmesi yaparak, var olan sinsitium ve villöz sitotrofoblastların farklılaşması ve füzyonu ile oluşmaktadır. On yedinci gün civarında ikincil villus üçüncül villuslara dönüşür ve embryonik mezoderm dışında plasental vasküler ağın genişlemesi sağlanır. Gebeliğin 4.haftasından sonra ise fetüsün vaskülatörü olan plasental damarlar oluşarak dallanma birinci ve ikinci trimesterde de genişlemeye devam eder. Hamileliğin son aşamalarında ise plasental kılcal damarlar uzayarak terminal villusun sinsitiotrofoblast tabakasına karşı döngüler oluşturulur. Böylece maternal ve fetal dolaşım arasındaki değişim mesafesi azaltılarak fetüse yeterli ve üst düzeyde besin ve oksijen taşınması sağlanmış olur.

Distal bölgelerde çoğalarak yanlamasına genişleyen sitotrofoblastlar plasentanın dış kabuğunu oluşturarak plasentanın desiduaya sabitlenmesi ve embryonun oksidatif strese karşı korunması için gelişir. Bu trofoblastik dış kabuk ikincil farklılaşmış trofoblast hücre tipini (invaziv EVT) oluşturur. Desidual stromaları istila eden interstisyel sitotrofoblastlar (iCTB) ve maternal spiral arterleri kolonize eden endovasküler sitotrofoblastlar (eCTB) olmak üzere iki farklı EVT popülasyonundan söz edilebilir. iCTB'ler plasental / fetal allogreftin immünolojik kabulü için desidual stromal hücreler, makrofajlar ve uNK hücrelerle etkileşime girerler (Knöfler ve ark., 2019). iCTB'ler spiral arterleri, lenfatikleri ve bezleri istila

ederek (Şekil 12) farklılaşmanın son aşaması olan çok çekirdekli trofoblast dev hücreleri (GC) oluşturur (Pollheimer ve ark., 2018). Daha sonra iCTB'ler göç edip endotelial hücre apoptozunu indükleyen, damarlardaki maternal endotel hücrelerinin tamamen değişimini sağlayan ve vasküler adezyon fenotipte olan eCTB'lere farklılaşır. eCTB'ler, gebeliğin ilk haftalarında implantasyon bölgesinin altında bulunan desidua basalliste spiral arterleri tıkayan trofoblast yapıları oluşturarak 6-7 haftaya kadar kan akışını önler. Daha sonraki süreçte tıkaçlarda sınırlı bir akışa izin veren dar kanallar oluşmaya başlar. Bu trofoblast tıkanması ilk 3 aylık dönemde plasenta için düşük oksijen ortamı oluşturur; bu durum erken dönemde reaktif oksijen türlerinin üretiminin engellenerek fetal-plasenta ünitesinin oksidatif hasarına yol açmaması içindir (Knöfler ve ark., 2019).



Şekil 12. Plasenta ve farklı trofoblast alttipleri (Pollheimer ve ark., 2018'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

Trofoblastların invazyon derinliğini geçici olarak kontrol eden desidua ise, miyometrium tabakasına kadar genişleyen trofoblastların göçünü kısıtlayarak plasantanın tümör benzeri anormal genişlemesini önlemektedir (Pollheimer ve ark., 2018).

10.3.1. Desidualizasyona Etki Eden Yolaklar

Sinyal transdüser ve aktivatör transkripsiyon 3 (STAT3) ve FOS benzeri 1 (FOSL1) aktivatörü gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ve yolakların farklı trofoblast hücre modellerinde trofoblast istilasını ve EVT spesifik gen ekspresyonunu kontrol ettiği belirtilmiştir. Örneğin, erken plasentada hipoksi indüklenebilir faktör 1 (HIF-1) sadece EVT'ler tarafından ifade edilmektedir. Düşük oksijen seviyeleri, in vitro EVT oluşumunu ve EVT progenitör markörü olan Notch1'in artmasını desteklemektedir. EVT fonksiyonunu düzenleyen bir başka kritik yol ise kanonik Wnt sinyalidir. Nükleer Wnt-bağımlı T hücre faktörü 4 (TCF4) / β -katenin komplekslerinin aktivitesi, TCF4'ün bozulmuş motilitesi, EVT-markör ekspresyonunun susturulması ve EVT formasyonu sırasında indüklenir. EVT'nin işlevinin şekillenmesinde desidua rol oynamaktadır (Knöfler ve ark., 2019).

Desidualizasyonda etkili hücrelerdeki bir başka otokrin sinyali ve TGF β ailesi üyesi, NODAL sinyal yolunun önemli bir inhibitörü olan LEFTY2'nin aşırı ekspresyonudur. Bu durum desidual hücreleri daha az farklılaşmış bir duruma iter ve desidual markörlerin ekspresyonunu zayıflatır. Notch sinyal yolu, hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozunu düzenler. Notch dışında, lipid sinyallemede görev alan endokannabinoidler veya fosfatidik asit (PA) gibi moleküller de desidualizasyonu destekler. PA, hücre iskeleti organizasyonu, yer değiştirme, besin algılaması, çoğalma ve hayatta kalma gibi çok çeşitli hücresel süreçleri etkiler. Lipid messenger PA, membran fosfolipidlerini hidrolize eden bir fosfolipaz D1 (PLD1) ürünüdür. PLD1 aktivitesi HESC'leri farklılaşmasında artar ve bu enzimin kısmen etkisizleştirilmesi desidualizasyonu sınırlamaktadır.

Desidualizasyonda oldukça etkili bir diğer yolak c-AMP sinyallemesidir. C-AMP sinyali, nöropeptid somatostatini kodlayan preprosomatostatin transkriptlerinde hızlı ve belirgin bir artışa neden olur. Çeşitli sinyalleme bileşen bağlantılı bir G proteini bağlı reseptör olan somatostatin reseptör alt tipi 2 (SSTR2) de HESC'lerin desidualizasyonu üzerine indüklenir. Desidual markör genlerin ekspresyonunu arttırmak için salgılanan bir diğer faktör, büyüme hormonu (GH) salgılatıcı reseptör (GHS-R) ligandı olan ve epitelde salgı fazında en yüksek stromal hücrelerde bulunan peptit grelin'dir (Gellersen ve Brosens, 2014).

Endometriyumdaki adenilil siklaz aktivitesi miyometriyum, korpus luteum veya fallop tüpündekinden daha yüksektir ve PGE2 ile uyarılan adenilil siklaz aktivitesi, proliferatiften fazdan salgı fazına yükselerek geç salgı fazında peak yapmaktadır. Bundan dolayı, hücre içi c-AMP konsantrasyonunun sürekli olarak yükselmesi, HESC'lerin desidualizasyonu için c-AMP sinyalleme gereklidir. (Gellersen ve Brosens, 2014).

Wnt4 / β -katenin sinyal yolağı da endometriumda desidualizasyonun sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Endositozun bir düzenleyicisi olan EHD1, diğer hücresel aktiviteler arasında hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozunda görev almaktadır. Bu proteinin artmış ekspresyonu PRL ve IGFBP-1 sekresyonunu azaltır ve desidualizasyon sırasında hücre iskeleti oluşumunu inhibe eder. Wnt4 sinyal yolağında ise Wnt4 ile etkileşime girerek bu yolağı aşağı regule eder ve desidualizasyonu baskılar. Bu nedenle tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan vakaların endometriyumundaki anormal EHD1 sinyalizasyonu desidualizasyonun bozulmasına ve implantasyon başarısızlığına yol açmaktadır. Ancak Wnt4 agonistleri HESC'lerin desidualizasyonunun bozulmasını geri çevirebilmektedir (Zhou ve ark., 2019).

Bunun yanısıra Retinoik Asit Sinyal yolağındaki genlerin de endometriyal hücrelerin zayıf desidualizasyonuna aracılık ettiği belirtilmiştir. Örneğin bu yolda yer alan Retinoik asit bağlayıcı proteinler olan CRABP2 ve FABP5, HESC'nin düzgün bir şekilde desidualize olmasını sağlamaktadır (Pavone ve ark., 2017). PI3K / Akt yolağı aktivasyonu da desidual markörlerin sentezinde etkilidir. Aktin organizasyonu, hücreden hücreye yapışma, hücre motilitesi ve hücre dışı yıkım kontrolü yollarında önemli bir göç düzenleyicisi olan Akt izoformları, desidualizasyona etki ederek hücre farklılaşmasından sorumlu aşağı akış yollarını etkileyebilir. Desidualizasyonun başlatılabilmesi için Akt'nin negatif regülasyonu gereklidir (Fabi ve ark., 2017).

Uterus desidualizasyonunu, TGF- β sinyal yolağı, BMP2, BMP4, BMP7, GDF5, GDF8 ve GDF11 gibi birçok TGF β ailesi ligandlarının ifadesi desteklemektedir. Ancak, TGF β -1'in insan desidualizasyonundaki fonksiyonel rolü tartışmalı olmakla birlikte bir grup bilim insanı TGF β -1'in PRL, IGFBP-1 ve doku faktörünün (TF) ekspresyonunu azalttığı yönünde çalışmalar yapmıştır. Başka çalışmalar ise TGF β -1'in desidualizasyondaki inhibitör rolünün aksine, HESC'lerin in vitro desidualizasyonu

sırasında TGF β -1 salgılanmasının arttığını ve rekombinant TGF β -1'in desidualizasyon sürecini desteklediğini belirtmektedir (Ni ve Li, 2017). TGF- β sinyal yolağında yer alan miR-106b-93-25 epigenetik faktörü, Foxp3 uyarımı ile Treg hücreleri için sitokin salınımında önemli rol oynamaktadır. Tekrarlayan düşüğü olan hastalarda miR106b-25'in artan ekspresyonu TGF- β sinyallemesini tahrip ederek Treg hücrelerinin azalmasına yol açtığı görülmüştür (De Santis ve ark., 2010). TGF β ailesinin üyeleri olan aktivinler, inhibinler ve follistatininler desidual sürecin parakrin / otokrin regülasyon sürecinde önemli rol oynar. A alt birimlerinin bir dimeri olan aktivin A üretimi, c-AMP sinyaline karşılık HESC'lerde indüklenerek PRL salgılanmasına paralel olarak artar ve desidual belirteçlerin ekspresyonunu teşvik eder. Lokal aktivin, hücreleri desidualize ederek MMP-2 üretimini destekler. Bunun yanı sıra TGF β -1, epitel hücreleri ve altta yatan stroma arasındaki crosstalk açısından önemli rol oynar. Buna ek olarak TGF β üst familyasındaki bir morfojen olan kemik morfogenetik protein (BMP-2), HESC'lerin desidualizasyonu üzerine ifade edilerek kısmen WNT4'ün indüksiyonu yoluyla desidual PRL ve IGFBP-1 üretimini teşvik eder. BMP2, WNT4'ten ayrı olarak WNT reseptörleri olarak görev yapan FZD1, FZD3-5 gibi birkaç Frizzled proteininin ve DKK1, DKK2, SFRP3 gibi WNT inhibitörlerinin ekspresyonunu uyarmaktadır (Gellersen ve Brosens, 2014).

Kortikosteroid sinyal yolağında, NADPH bağımlı olan ve kortizonu kortizole dönüştürerek aktiveştiren 11 β -hidroksisteroid dehidrojenaz (11 β HSD1) izoformu içerir. Bu aktif izoform glukokortikoid reseptörüne bağlanır ve yolda aktif rol alır. Ayrıca, 11 β HSD1 / mineralokortikoid reseptörü (MR) sinyallemesi ile kontrol edilen retinoid sinyalleri, endometriyal stromal hücrelerin desidualizasyonu gibi hücre farklılaşması, apoptoz veya yaşlanma gibi olayları destekler. Bu yüzden azalmış 11 β HSD1 ekspresyonu, HESC'lerin desidualizasyonunda kortizol üretiminin yetersiz olmasına yol açar ve açıklanamayan TGK öyküsü olan kadınlarda lokal implantasyon bölgesindeki uNK hücre yoğunluğunun düzenlenmesini bozar. Glukokortikoidler de, güçlü anti-inflamatuar ve immün baskılayıcı etkiler göstererek erken gebelik sırasında embriyo implantasyonu, plasantasyon ve fetal büyümede önemli rol oynar (Kuroda, 2019).

Gebelikte, çeşitli sinyal yollarının rolü ve bu sinyal bileşenlerinin de etkisiyle doğrudan veya dolaylı olarak desidualizasyon ve plasantasyon süreci

oluşmaktadır. Bu sinyallemelemlerde oluşan hatalar ve etkili belirteçlerin azalan/artan ekspresyonları, bu sürecin olumsuz etkilenmesine yol açabilir ve fetus tehlikeye girebilir. Kompleman aktivasyonunun önemli olduğu gebelik sürecinde, birçok sinyal yolağının ve o yolda yer alan bileşenlerin rolü de oldukça önemlidir.

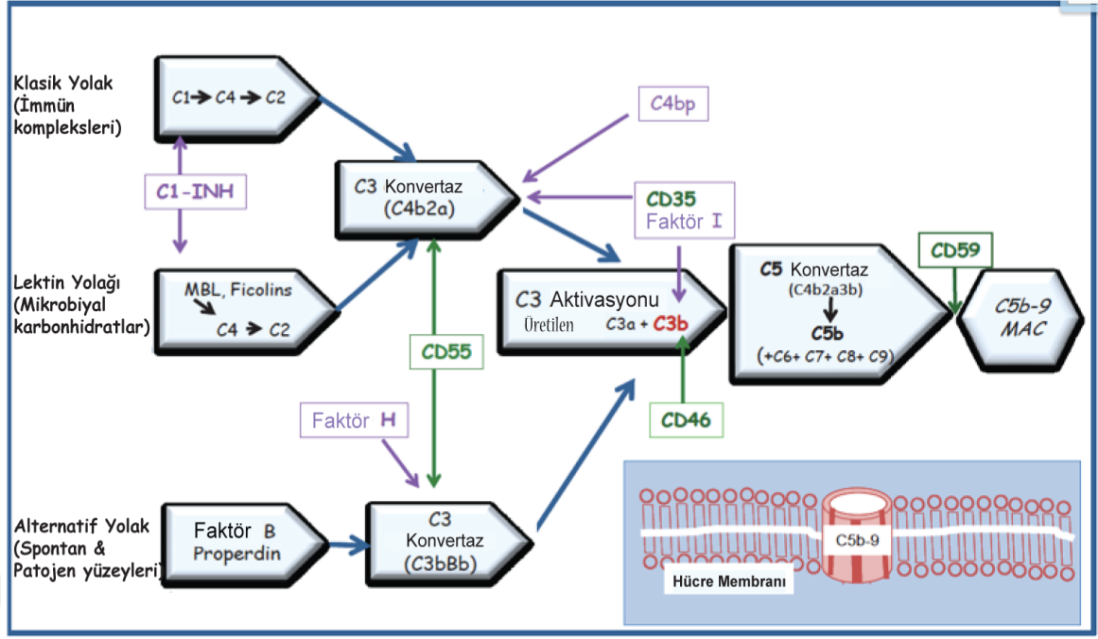
10.4. Kompleman Sistemi ve Önemi

Bağıışıklık sisteminde, inflamatuvar yanıtta önemli rol oynayan ve ilk defa 1890'larda Bordet ve Erlich tarafından tanımlanan kompleman sistemi (Zhao ve ark., 2018; Dunkelberger ve Song, 2010); bakterilerin öldürülmesine yardımcı olduğu için ve tamamlayıcı olduğu düşünöldüğü için bu adı almıştır. Gerek kanda çözünür halde bulunan gerekse membrana bağı otuzdan fazla sayıda proteinden oluşan bu sistem, aktivasyonu sırasında, güçlü anafilatoksin olan C3a ve C5a'nın oluşumuyla sonuçlanan sıralı bir enzimatik yol izlemektedir. Sadece doğuştan gelen ve adaptif bağıışıklıkta değıl, aynı zamanda doku yenilenmesi ve tümör büyümesi gibi olaylarda da rol oynar (Nesargikar ve ark., 2012). Kompleman; anafilaktoksinleri aktive eder, üretir ve aynı zamanda, efektör hücrelerin aktivasyonuna aracılık eden ve embriyoların reddini hızlandıran C3a ve C1q gibi sitokinler üretir.

Kompleman C3, kompleman sisteminin temel molekülüdür ve C3a-C3aR sinyal yolunun T hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve adaptif immün dengesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır (Zhao ve ark., 2018). C3aR, T lenfositler, antijen sunan hücreler (APC) ve çeşitli dokular ve organlar üzerinde yaygın olarak bulunan bir transmembran G protein-bağı reseptördür. APC ve T hücreleri tarafından üretilen kompleman aktivasyon ürünü C3a; karşılık gelen reseptörlere bağılanır. G proteini, majör histo-uyumluluk kompleksi II'nin (MHC II) üretimini ve kostimölatör moleküllerin ekspresyonunu düzenler; T hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve Th1 hücre yanıtını destekler (Zhao ve ark., 2018).

Bilinen üç farklı yolla gerçekleşen kompleman aktivasyonu; alternatif yol, lektin yolağı veya klasik yolağı izlemektedir. Bunlardan alternatif ve lektin yolağları doğal immünitenin efektör mekanizması iken; klasik yol ise edinsel hümoral bağıışıklık yanıtının bir mekanizmasıdır. Yabancı yüzeylerde bulunan karbonhidrat, protein veya lipid partikülleri tarafından tetiklenen kompleman sistemi, alternatif yol izleyerek erken dönemde önce C3 yapısının düşük seviyede hidrolizi sonucu hedefe bağı

bulunan C3b yapılarına dönüşür. Daha sonra bu yapıya bir serin proteaz olan Faktör B'nin de katılmasıyla bunu takiben bir plazma serin proteaz olan ve Faktör B'yi kesen faktör D bağlanır ve C3 konvertazı olan C3bBb yapısı ortaya çıkar. Makrofaj ve T hücrelerinde de bulunan, aktif nötrofiller tarafından salınan bir protein olan Properdin, C3b'ye bağlanarak C3 konvertazının stabilizasyonunu sağlar ve Faktör H ve I tarafından bölünmesini engeller. Böylece daha fazla C3 enzimatik olarak yıkılmış olur ve bu konvertaz aktivitesinin sonucunda C3b ve C3bBb molekülleri hedefe bağlanmış olur. Bu oluşan C3bBb molekülünün bir kısmı C3b'ye bağlanırken, bir diğer kısmı ise C5'i yıkan ve aktivasyonun geç başmaklarını başlatan bir diğer kompleks C3bBb3b'ye dönüşür. Bu kompleks C5 konvertazı olarak rol oynar ve kompleman aktivasyonunun geç dönem basamağını oluşturan bir diğer aktivasyona katılır. Klasik yolak ise; IgM ve IgG bağışıklık komplekslerinin yabancı olan bir antijene bağlanmasıyla başlatılır. Bu bağlanmadan sonra antikorun Fc bölgelerinde iki veya daha fazla kompleman proteininin bağlanabileceği bir konum alır. Böylece, C1q, C1r ve C1s moleküllerinden oluşan C1 multimerik kompleksi, iki komşu Fc bölgesine bağlanır ve C2 ve C4'ü parçalar. Antikora ve antikorun bağlı olduğu mikrobiyal yüzeye kovalent bağlanan C4b2a kompleksi oluşur ve bu yolakta artık C3 konvertazı olarak rol alır. Bu konvertaz C3'ü parçalayarak alternatif yolakta olduğu gibi mikrop yüzeyindeki C3b'nin açığa çıkmasını sağlar. Açığa çıkan C3b'nin bir kısmı C4b2a kompleksine bağlanarak C5 artık C5 konvertazı işlevini görecek olan C4b2a3b yapısını oluşturur. Bu yolakta ek olarak, karaciğerde ve diğer dokularda sentezlenen pentraksinler (PTX) doğrudan patojenleri tanıyarak C1q'ya bağlanarak onları elimine edebilir.



Şekil 13. Kompleman aktivasyon yollarının şematik gösterimi (Nesargikar ve ark., 2012'den değiştirilerek kullanılmıştır.).

Bir diğer yolak olan Lektin yolu; mannoz bağlayıcı lektin (MBL) veya Ficolin, maya, bakteri, parazitler ve virüsler gibi patojenlerin yüzeylerindeki karbonhidrat parçalarına bağlandığında tetiklenmektedir. MBL ve Fikolin, MBL ilişkili proteinler ile serumda kompleks oluşturarak dolaşmaktadır. MBL ilişkili MASP1,2,3 ve MAP19 olarak bilinen MASP2 olmak üzere dört bilinen yapısal protein bulunmaktadır. MASP2'nin bu yolakta aktif rol oynayarak C4'ün C4a ve C4b'ye parçalanmasından sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu yapı patojenlere bağlanarak konformasyonel değişiklikleri indükler ve oto-aktivasyon yapmış olmaktadır. Daha sonrasında açığa çıkan C4b yapısı patojen yüzeyine bağlanarak C2'yi uyarır ve MASP2'nin C2b ve C2a formunu yaratmasını sağlar. Birleşen C2a ve C4b yapısı, bu yolakta C3 konvertazı görevi gören C4bC2a yapısını oluşturur. Bu yapı C3'ü C3b formuna dönüştürerek geç dönemde C5b yapımına katkı sağlar. Başka bir serin proteaz olan MASP3 ise MASP2'nin C4 ve C2'ye bölünme aktivitesini aşağı regüle etmektedir. Diğer 3 lektinin; ficolin-1 (veya M-ficolin), ficolin-2 (veya L-ficolin) ve ficolin-3 (veya H-ficolin veya Hakata antijeni) olan yapıların MASP ile etkileştiği belirtilmiştir. Bu fikolinler genel olarak aktif kompleksler halinde lektin yolunu aktive etmektedir ve buna ek olarak yeni bir C tipi lektin olan CL11'in MASP1 ve/veya MASP3 ile

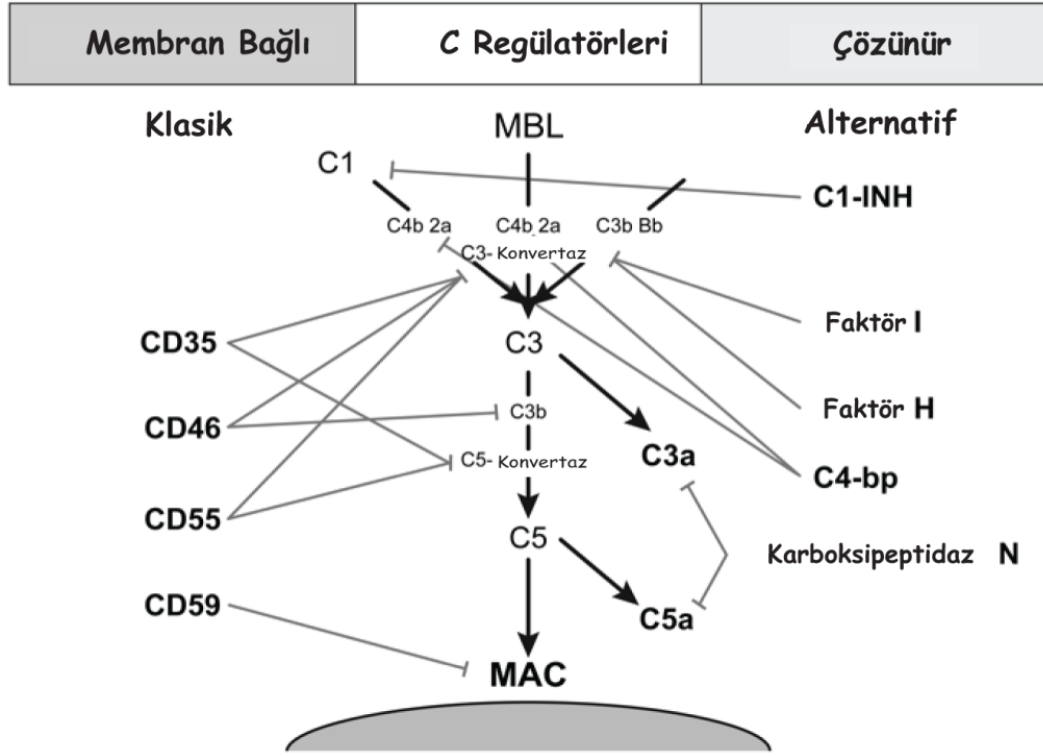
etkileşime girerek lektin yolağını aktive edebildiği yakın çalışmalarda gösterilmiştir (Nesargikar ve ark., 2012).

Her üç yolakta da bir C3 konvertazına ikinci bir C3b eklenmesi, bir C5 konvertaz oluşturarak kompleman aktivasyonunun geç basamaklarına geçişi sağlar. Ardından, C5, güçlü bir anafilatoksin olan C5a ve daha büyük C5b fragmanına ayrılır. C5b, proteoliz olmadan C6 ve C7'ye bağlanarak kompleks olarak bir zara bağlanır. Daha sonra C5b67 kompleksi, hücre membranında polimerize olarak delikli bir poli-C9 membran atak kompleksi, MAC'ı (C5b-9) oluşturmak için önce C8'i ve ardından çoklu C9'ları (~10-15) kendisine bağlar. Bu kompleks geç basamakta delikli yapısı sayesinde su ve iyon girişi sağlayarak hücre ölümüne gider. (Sarma ve Ward, 2011; Abbas ve Lichtman, 2007; Liszewski ve Atkinson, 2015).

Kompleman bileşeni C1q, makrofajlarda anti-inflamatuar sitokinler tarafından ifadesinde arttırıcı yönde düzenlenerek maternal-fetal arayüzdeki kompleman-makrofaj etkileşimi için olası bir tolerans indükleyici rol üstlenmektedir. Böylece, C1q yardımıyla plasental birikintilerin giderilmesi sağlanmış olmaktadır (Teirilä ve ark., 2019). C1q proteini, apoptotik hücrelere bağlanabilir, hücre zarı bütünlüğü kaybolmadan önce makrofajların fagositik işlevini artırabilir, IL-27 ve IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinlerin makrofajlar tarafından üretimini teşvik edebilir ve inflamasyonu azaltabilir (Zhao ve ark., 2018).

Kompleman sistemi regülatörlerinden bazıları membrana bağlı olarak bulunmaktadır. Kompleman sistemi aktivasyonunun bir parçası olan DAF (CD55), CR1 ve MCP (CD46); kompleman aktivasyon düzenleyicileri ve kompleman kontrol proteinleri adı verilen süper ailelerden oluşur ve ortak yapısal motif özelliklerine sahiptir. Sistein kalıntılarından oluşan iki disülfid bağı tarafından yaklaşık altmış aminoasitin bir arada tutulmasıyla kısa konsensus^{1*} tekrarları (SCR) yapılarından meydana gelmektedirler (Nesargikar ve ark., 2012).

^{1*} Evrim boyunca korunmuş olan ve canlı veya hücre için hayati fonksiyonu bulunan DNA üzerindeki kodlanmayan dizilimler.



Şekil 14. Kompleman kaskadında bulunan membran bağımlı ve sıvı faz kompleman regülatörlerinin şematik gösterimi (Ehrnthaller ve ark., 2011'den değiştirilerek kullanılmıştır.).

En iyi bilinen sıvı faz regülatörlerinden olan C1 inhibitörü (C1-INH), C1 kompleksine bağlanarak klasik yolun aktivitesini kontrol etmektedir. Bununla birlikte C1-INH, klasik ve lektin yollarının benzerliğinden dolayı MASP1 ve MASP2 ile de etkileşerek lektin yolağını inhibe etmektedir. Bir serin proteaz olan Factor I ise C3b ve C4b'nin α -zincirinin bölünmesini katalize etmektedir. Bu enzimatik aktivitenin kofaktörleri olarak Faktör H, C4 bağlayıcı protein (C4bp), CD35 (CR1) ve CD46 rol alır. Faktör B ile bağlanma bölgesi için rekabet ederek C3 konvertaz oluşumunu engelleyen Faktör H, aktif halde bulunan C3 konvertazlarının da ayrılmasını kolaylaştırarak C3b'nin Faktör I tarafından proteolitik bölünmesini indükler (Ehrnthaller ve ark., 2011). Ağırlıklı olarak karaciğerde ve daha az ölçüde aktif monositlerle sentezlenen C4b-bağlayıcı protein (C4BP), heparin ve C-reaktif protein (CRP) için de bağlanma yerlerine sahiptir. C4BP, C4b / C3b gibi aktif kompleman bileşenlerinin degradasyonunda Faktör I (FI) için kofaktör görevi görerek klasik ve lektin yollarını kontrol eder. Ayrıca C4b'ye bağlanarak C3 konvertazın bozulmasını hızlandırır. Ana form olarak yedi benzer α -zinciri ve bir β -zincirinden oluşan C4BP'nin α ve β zincirleri, sırasıyla sekiz ve üç kompleman kontrol proteini (CCP) alanı içerir

ve iki ayrı gen olan C4BPA ve C4BPB tarafından kodlanır. C4BP molekülü, antikoagulan protein S ile kompleks halinde, apoptotik ve nekrotik hücrelere güçlü bir şekilde bağlanarak kompleman aktivasyonunu sınırlamaktadır. İmplantasyon penceresi periyodu sırasında, bu düzenleyici faktör C4BPA ekspresyonu normal olarak, artan yönde düzenlenmektedir. Ancak açıklanamayan, tekrarlayan spontan düşüğü olan vakalarda, fertil kontrollerle karşılaştırıldığında C4BPA molekülünün ekspresyonunun daha düşük seviyelerde olduğu gösterilmiştir. (Mohlin ve ark., 2013; Nesargikar ve ark., 2012).

Bir diğer düzenleyici faktör olan Karboksipeptidaz N, anafilatoksin C3a ve C5a'nın ve aktivitesini ortadan kaldırır. Karaciğerde sentezlenen ve kan dolaşımında bulunan peptitlerden (kompleman anafilatoksinler, kininler ve kreatin kinaz MM-iskelet kası gibi) karboksi terminal argininleri ve lizinleri ayıran Karboksipeptidaz N, vücudu lokal otokrin veya parakrin hormonları olarak işlev görebilen zararlı peptitlerin aşırı birikiminden korur (Nesargikar ve ark., 2012).

10.4.1. Membran-Bağlı Kompleman Regülatörleri

CD35 (Kompleman reseptörü 1 [CR1])

İnsan CR1 (CD35) transmembran glikoproteini; B hücreleri, foliküler dendritik hücreler, eritrositler, polimorfonükleer hücreler, fagositik makrofajlar ve böbreğin glomerularındaki podositler (bowman kapsülünün epitel hücreleri) üzerinde bulunur. Hem klasik hem de alternatif yollarında C3/C5 konvertazın bozunmasını kolaylaştıran CD35 ayrıca C3b ve C4b'nin bozunmasında rol alan Faktör I için bir kofaktör görevi görür. CD35; C1q, C3b, C4b, MBL ve ficolin-2 gibi birkaç komplemana bağlı protein tarafından opsonize^{2*} edilen partiküllerin fagositozunu teşvik ederek taşınmasını sağlamaktadır. Ayrıca, patojenlerin ve bağışıklık komplekslerinin dolaşımdan temizlenmesini kolaylaştırır (Teirilä ve ark., 2019).

CD46 (Membran kofaktör proteini [MCP])

C3b ve C4b'nin Faktör I aracılı bölünmesinde kofaktör görevi gören CD46, kemirgenlerde sadece testiste eksprese olurken insanlarda eritrositler dışında geniş bir

² * Antijenin opsonin yardımı ile fagositoza duyarlı hale getirilmesi.

şekilde ekprese edilmektedir. T yardımcı hücrelerinde IFN- γ ve IL-10 üretimini düzenleyerek, adaptif T yardımcı tip 1 bağışıklık yanıtının azaltılmasında rol oynar. CD46 eksikliği, “kendi kendine saldırı” kaynaklı kompleman aracılı birçok hastalık durumu için önemli bir faktördür.

Yaklaşık 43 kilobaz (kb) olan CD46 geni, 14 ekzon ve 13 intron bölgesi içermektedir. Yaygın olarak ifade edilen, zara bağlı CD46, dört ana izoformu (BC1, BC2, C1 ve C2) alternatif kırılma yoluyla ekprese edilir. Her biri sinyal motifleri içeren 16 veya 23 amino asitten oluşan iki homolog olmayan Cyt-1 veya Cyt-2 olan sitoplazmik kuyruktan birini içermektedir. Tüm izoformlar, inhibe edici aktiviteye sahip dört CCP alanı barındırır. Heuser ve ark.'nın 2011'de yaptığı bir çalışmada CD46 genindeki mutasyonların tekrarlayan düşükle ilişkili olmadığı gösterilirken, başka çalışmalardaki RFLP analizleri, CD46 geninde bulunan değişiklikleri tekrarlayan spontan gebelik kayıplarıyla ilişkilendirilmiştir (Mohlin ve ark., 2013).

CD4⁺ T hücreleri tarafından, T-hücre reseptörü ve CD46 birlikte kullanılarak IFN- γ salgılayan efektör Th-1 bağışıklık hücreleri indüklenir. Bu yanıt baskın bir şekilde IL-10 salgılayan Tregler'e dönüşerek CD46 yoluyla fonksiyonel olarak bir sekans başlatılmaktadır. Aktivasyon başlangıçta hızlı bir IL-2 salgısına ve bir pro-inflamatuar IFN- γ ⁺ / IL-10⁻ T hücre fenotipinin oluşturulmasına ve ardından ara aşama bir IFN- γ ⁺ / IL-10⁺ hücre yanıtına sebep olmaktadır. Daha sonra yanıt, kendini düzenleyen bir IFN- γ ⁻ / IL-10⁺ Treg fenotipine geçmektedir. Dolayısıyla, bir bağışıklık tepkisinin başlangıcında kompleman kaynaklı Treg'ler, yüksek IL-10 ve optimum B hücresi aktivasyonu için gerekli faktörlerden olan sCD40L üretimi yoluyla destekleyici bir rol oynamaktadır. Yapılan son çalışmalar, CD46'nın Notch protein ailesinin bir hücre dışı ligand üyesi olan Jagged1'e bağlanması yoluyla olan yeni keşfedilmiş bir mekanizması da olduğunu bildirmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada idiyopatik tekrarlayan düşük vakalarında, hem CD46 hem de C4BP mutasyonları bildirilmiştir. CD46, C4BP ve CD55 proteini kodlayan tüm ekzonlar, hiç çocuğu olmayan ve en az iki düşük yapmış 384 kadın kohortunda dizilenmiş ve sonucunda C4BP mutasyonunun bir hastalıkla ilişkisinin ilk kez tanımlanmasına ek olarak, dört CD46 varyantı tanımlanmıştır. Nadir varyantlarından P324L'nin ekspresyonu azalırken, N213I'nın ekspresyonu ve fonksiyonunun bozuk olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca kompleman düzenleyici fonksiyonunu etkilemeyen,

transmembran domaininde yer alan iki mutasyon ile sitoplazmik kuyrukta olan sinyal fonksiyonunu bozabilecek bir mutasyon bildirilmiştir (Liszewski ve Atkinson, 2015).

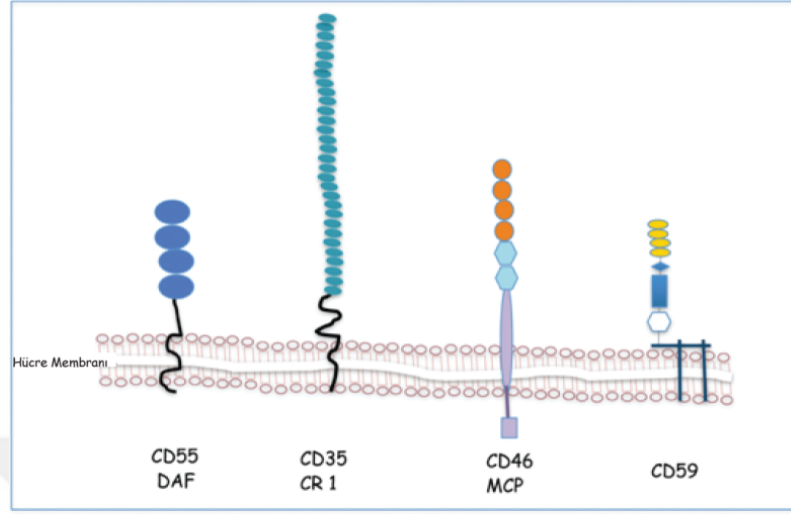
CD55 (Bozunma Hızlandırıcı Faktör [DAF])

Doğal öldürücü hücreler ve özel bir alt grup hariç, vasküler ve vasküler olmayan doku hücreleri üzerinde yaygın olarak ifadesi bulunan CD55 (DAF olarak da bilinmektedir) (Lublin ve Atkinson, 1989), bir glikosil-fosfatidil-inositol (GPI) bağlantılı membran proteini olup 1, kromozomun q32 bölgesinde (Banadakoppa ve ark., 2014) kodlanmaktadır (Ehrnthaller ve ark., 2011; Nesargikar ve ark., 2012). Alternatif splicing veya farklı glikozilasyon şekillerinden dolayı farklı boyutlarda olabilen CD55'in hesaplanan moleküler ağırlığı 43 kilodalton (kDa)'dur. Olgun bir CD55'in moleküler ağırlığı ise hücre tipine bağlı olarak 50 ile 100 kDa arasında değişmektedir (Dho ve ark., 2018). Temel rolü bu komplekslerdeki C2a / Bb'nin yerini alarak klasik ve alternatif yolaktaki C3 konvertaz yıkımının hızlanması ve inhibisyonu olmakla birlikte belirli virüslerin (Echovirüs ve Cocksackie B virüsü vb.) enfeksiyonu için bir reseptör görevi görür (Ehrnthaller ve ark., 2011; Nesargikar ve ark., 2012). Bunun yanısıra, CD55 monositler ve granülositler üzerinde eksprese edilen CD97 için bir ligand görevi görerek T ve B hücre proliferasyonunu teşvik etmektedir. Ayrıca doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık tepkilerini düzenleyen CD55, doğal öldürücü NK hücreleri de inhibe edebilmektedir (Dho ve ark., 2018). CD55'in ligand görevini gördüğü CD97 geni, 19p13.1 kromozomu üzerinde bulunur ve 12 kb'yi kapsayan 18 ekzon bölgesinden oluşur. Epidermal bir büyüme faktörü (EGF) olan CD97 transmembran proteini, bir EGF etki alanı yoluyla ligandı CD55'e bağlanmaktadır. CD97 ve CD55 proteinleri arasındaki bağlanma, kanser farklılaşması, istilası, migrasyonu ve metastazında rol oynayarak multipl skleroz (MS) ve romatoid artrit (RA) gibi birçok patogeneze yol açmaktadır (Dho ve ark., 2018).

CD59 (Protektin)

Protektin olarak da bilinen CD59 (Schönermark ve ark., 1986), 11.kromozomun kısa kolunda kodlanarak (Banadakoppa ve ark., 2014), GPI bağlantıları ile hücre zarına entegre bulunan ve hemen hemen tüm hücreler üzerinde eksprese edilen (Ehrnthaller ve ark., 2011; Nesargikar ve ark., 2012; Kimberley ve

ark., 2007) bir membran proteindir. Komplemanın terminal basamağında görev alan ana membran inhibitörü CD59, C9'un ve C8a-alt zincirinin etkileşimini inhibe eder.



Şekil 15. Membran bağlı kompleman regülatörleri (Nesargikar ve ark., 2012'den değiştirilerek kullanılmıştır.).

CD59, litik membran atak kompleksi (MAC)'nin oluşumunu engelleyerek hücre zarına entegrasyon ve bir transmembran gözeneginin oluşturulmasını önlemiş olur (Ehrnthaller ve ark., 2011; Nesargikar ve ark., 2012). T hücre aktivasyonunu düzenleyen CD59 proteini, SNARE proteinleriyle etkileşim nedeniyle pankreas hücrelerinden insülin salgılanması için çok önemlidir. CD59 mutasyonları/polimorfizleri, kemik iliği hücrelerinde klonal defekt ile sonuçlanırken (Kimberley ve ark., 2007; Blom, 2017); tam eksikliğinde, eritrositler üzerinde kompleman atağına sebep olarak şiddetli hemolitik anemiye ve nöropatiye yol açabilir. Kompleman inhibitörlerinin alternatif işlevlerinin anlaşılması da, kompleman ve diğer fizyolojik sistemler arasındaki bağlantıları çözmek açısından önemlidir (Blom, 2017). Erkek ve dişi üreme yollarından hücre geçişi sırasında kompleman atağını önlemek için üreme hücrelerinde ve seminal plazmada yüksek oranda eksprese edilen CD59 (Jensen ve ark., 1995; Ratnoff ve ark., 1995; Simpson ve Holmes, 1994), ve diğer kompleman inhibitörlerinin yüksek seviyeleri; döllenme ve gebelik sırasında reddi önlemek için gelişmiş bağışıklık toleransına katkıda bulunur. Ayrıca, CD59'un gamet etkileşimi sırasında hücre yapışmasına yardımcı olduğu da bildirilmiştir. CD59, kompleman aktivitesi dışında, bilinen T hücre aktivasyonu ve sinyallemesinde de görev almaktadır. Yapılan ileri çalışmalarda, T hücreleri üzerindeki CD59

aktivasyonunun, özellikle TCR / ZAP70 alt biriminin fosforilasyonuna yol açtığını göstermişlerdir (Kimberley ve ark., 2007).

10.4.2. Gebelikte Kompleman Sistem Aktivasyonunun Rolü

Gebelikte anne ve fetüsü, uteroplasental üniteyi istila eden patojenlerden kaynaklanan enfeksiyonlara karşı korumak önemlidir ve kompleman bu konuda fetomaternal arayüzde anahtar bir role sahiptir. İnsanlarda, başarılı bir gebelikte aşırı kompleman aktivasyonu yukarıda da bahsedilen, trofoblast zarlarında bulunan proteinler olan temelde üç düzenleyici; CD46, CD55, CD59 ile önlenir. CD55, hem C3 konvertaz oluşumunu inhibe eder hem de önceden oluşturulmuş C3 dönüştürücülerin bozunmasını hızlandırırken; CD46, C3b ve C4b'nin inaktif formlarına bölünmesini kolaylaştırır. CD59 ise, MAC'in oluşmasını engelleyerek, kompleman kaskadında daha aşağı yönde hareket eder (Denny ve ark., 2012).

Trofoblast tabakasının komplemana bağlı hasarı fetomaternal bariyer geçirgenliğinin artmasına neden olarak, fetüsü tehlikeye atabilecek bakteri, virüs ve diğer toksik moleküllere maruz bırakabilir. Bu risk göz önünde bulundurulduğunda, istenmeyen kompleman aktivasyonuna karşılık lokal bir koruma sistemine ihtiyaç vardır. Aktivasyon kaskadının farklı adımlarında komplemanı inhibe eden kompleman düzenleyici proteinler olan CD55, CD46 ve CD59'un ekspresyonu, özellikle villöz trofoblastlar dış tabakasını oluşturan ve doğrudan maternal kana maruz kalan sinsitiotrofoblastlar tarafından eksprese edilir. Ayrıca bu seviye, MAC yapısı oluşumunu kontrol eden ve maternal kandan kazanılmış çözünür bir inhibitör olan Vitronektin veya S proteininin bağlanmasıyla korunur. Sinsitiotrofoblastların alt tabakasında bulunan bazal membran sitotrofoblastlar için durum daha az kritik olduğu için CD46, CD55 ve CD59'un daha az ekspresyonu söz konusudur. Bu kompleman düzenleyici proteinlerin ekspresyonu EVT yüzeyinde de mevcuttur fakat bu hücreler anne kanına maruz kalmadığı için özel bir koruma gerektirmez. Ancak, CD59 tercihen EVT yüzeyi üzerinde eksprese edilirken CD55 ve CD46 büyük desidual hücreler üzerinde eksprese olmaktadır.

Kompleman sistemi, villüs içi boşlukta dolaşan anne kanında bulunur ve trofoblastların hücre döküntüleri ve sağlıklı bir gebelikte bulunan bağışıklık kompleksleri ile aktive olabilir. Ayrıca dolaşımdaki C1q seviyeleri dalgalanma

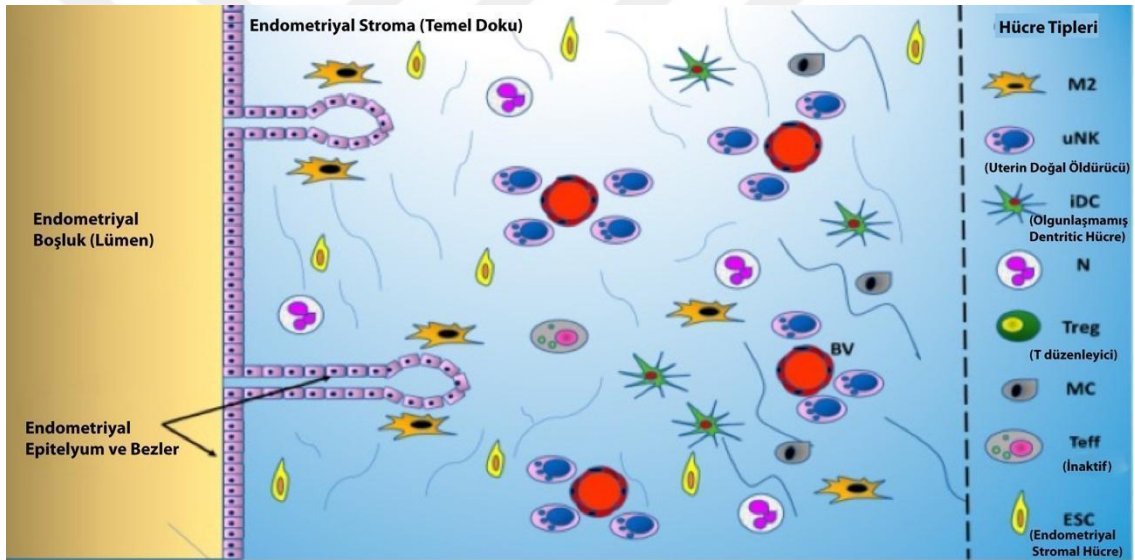
yapmaz ve normal gebelik boyunca aynı kalır. Anne kanındaki kompleman aktivasyonu, villöz trofoblastlar için sürekli bir riski temsil eder ve hücre hasarına veya bariyer bütünlüğünün bozulmasına neden olabilir. Bu durum, C3 konvertazlarının bozunmasını teşvik eden, C3b ve C4b'nin inaktivasyonunu destekleyen, kompleman kaskadının farklı aşamalarında rol oynayan CD55, CD46 ve CD59 dahil olmak üzere trofoblast yüzeyindeki kompleman düzenleyici proteinlerin ekspresyonu ve C5b-9 kompleks oluşumunu önleyerek kontrol altında tutulur (Girardi ve ark., 2006).

Antikordan bağımsız gebelik kaybının patogenezinde kompleman rolünü destekleyen klinik kanıtlara bakacak olursak; yüksek plazma C3 ve C4 düzeylerinin, açıklanamayan tekrarlayan düşükleri olan hastalarda daha sonraki düşükleri tahmin ettiği bulunmuştur (Denny ve ark., 2012). Hamile kadınlarda, hamile olmayan kontrollere kıyasla daha yüksek MBL, C4 ve C3 seviyeleri ve C4d, C3a ve SC5b-9 gibi aktivasyon ürünleri olduğu bildirilmiştir.

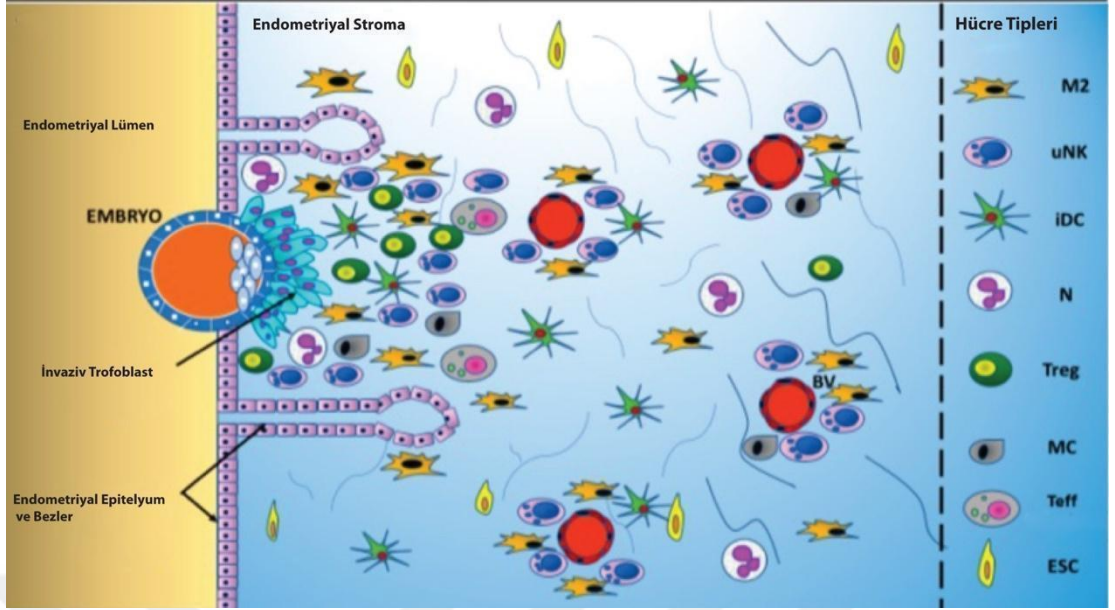
Kompleman bileşenleri; makrofajlar, trofoblastlar ve endotelial hücreler dahil olmak üzere desiduada bulunan farklı hücre türleri tarafından sentezlenir ve yerel bir savunma sistemi olarak çalışır. Bu nedenle, uterusu embriyo implantasyonu, desiduyu istila eden villüs dışı trofoblast tarafından salınan proteolitik enzimler ile indüklenerek inflamatuvar benzeri bir süreç yaratır. Trofoblast istilasının neden olduğu kapsamlı doku yeniden şekillenmesi, NK ve doğuştan gelen bağışıklık sisteminin diğer hücrelerinin yerel olarak toplanmasına ve kompleman düzenleyicilerin yaygın dağılımından dolayı sınırlı hasar verici etkiye sahip aktivasyona yol açar.

Gebelik sırasında ikili rol üstlenen kompleman sistemi, bir yandan gebeliğin başarılı bir şekilde devam etmesini sağlarken; diğer yandan gebeliğin düzenli ilerlemesini engelleyen plasental doku hasarına yol açabilir. Erken gebelik kayıplarında, dolaşımdaki kompleman bileşenleri ve kompleman aktivite seviyeleri ile ilgili bildirilen çelişkiler mevcuttur. Bir çalışmada artmış C3 ve C4 seviyeleri bulunmuş ve fetal kaybın belirtici olarak önerilmişken, başka bir çalışmada tekrarlayan düşükleri olan kadınlarda hipokomplementemi bildirilmiştir. İlginç bir şekilde, kompleman düzenleyicileri CD46 ve CD55'in plasental ekspresyonunda, spontan düşük sonrası aşırı kompleman aktivasyonu ile ilişkili önemli bir azalma gözlenmiş ve başarılı bir gebelik için kompleman aktivasyonunu inhibe etmenin önemi vurgulanmıştır (Chighizola ve ark., 2020).

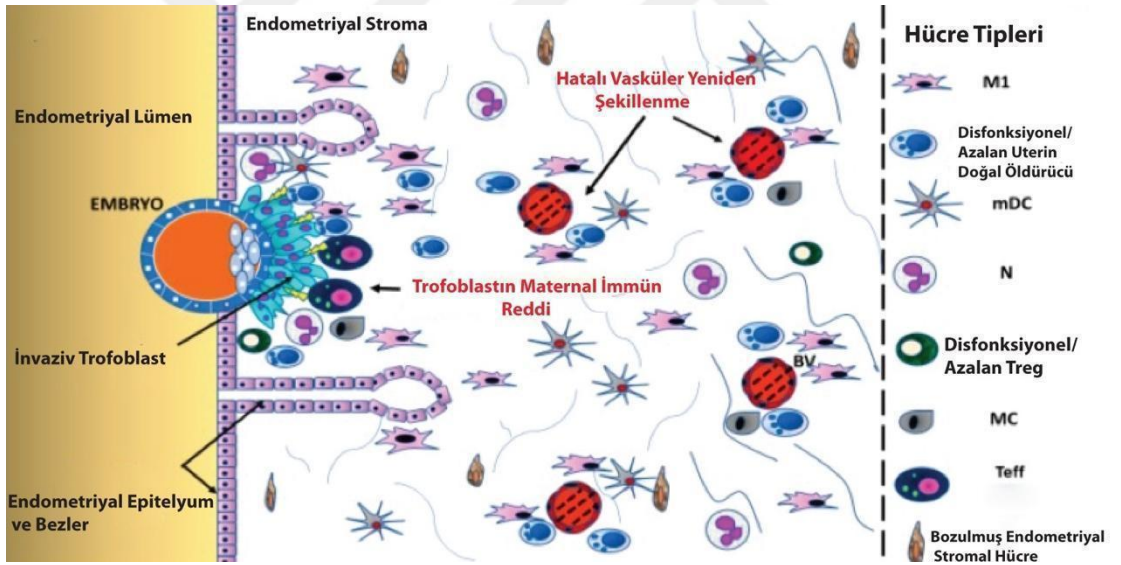
Kontrollü lokal kompleman aktivasyonu, embriyo gelişimini destekleyerek spiral arterlerin fizyolojik olarak yeniden şekillenmesinde rol oynamaktadır (Xu ve ark., 2005; Girardi ve ark., 2006). Plasentada T hücre aktivasyonunu takiben doğuştan gelen bağışıklık sisteminin işlevsel bozukluğu ve kontrolsüz kompleman aktivasyonu fetal kayıp ile sonuçlanabilir. Sistemin sınırsız aktivasyonu ile sonuçlanan, belli miktardaki biyolojik aktif ürünün ortama salınımı, kompleman sisteminin önemli bir problemidir. Bu ürünler kendi bileşenleri arasında ayırım yapmayarak MAC kompleksinin yıkıcı etkisi ve / veya inflamatuvar sürecin tetiklenmesi ile doku hasarına yol açar. Bu durum özellikle feto-maternal arayüzde kurulan bir dengeyi bozarak lokal olarak salınmış aktivasyon ürünleri tarafından hücrelerin saldırıya maruz kalmasına neden olabilir.



Şekil 16. Endometrial doku ve immün hücre tiplerinin şematik gösterimi (Ticconi ve ark., 2019'dan değiştirilerek kullanılmıştır.).



Şekil 17. Embriyo varlığında endometriyum dokusundaki değişiklikler (Ticconi ve ark., 2019'dan değiştirilerek kullanılmıştır.).



Şekil 18. Embriyo varlığında, trofoblastın maternal bağışıklık reddi (Ticconi ve ark., 2019'dan değiştirilerek kullanılmıştır.).

Crry, kompleman sisteminin 3. bileşeni olan C3'ün aktivasyonunu düzenleyen, her yerde bulunan zara bağlı proteinlerdir (Mao ve ark., 2003). Yapılan fare çalışmalarında, Crry'nin, normal gebelik sırasındaki kompleman aktivatörlerin ve inhibitörlerin; hem başarılı bir gebelik için önemli olan maternal-fetal bağışıklık dengesini sürdürmek hem de kompleman bileşenlerini dinamik olarak düzenlemek için gerekli olduğu belirtilmektedir. Fare fetüsünde Crry geni yok edilirse; aşırı kompleman

birikmesine, ardından plasenta dokusunun iltihaplanmasına yol açabilir ve fare fetüsünün ölümüne neden olabilir. İlk olarak farelerde Crry eksikliğinin fetal kayıp ile ilişkisinden yola çıkılarak tekrarlayan spontan düşük vakalarında komplemanın patojenik bir rol oynadığı düşünülmüştür (Zhao ve ark., 2018).

Tekrarlayan spontan düşüğü olan hastalarda insidansın, CD46 düzenleyici kompleman proteinin bazı polimorfik varyantları ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca komplemanın bir veya başka bir bileşeninin eksik olduğu veya miktarının azaldığı bir durumu olan (hipokomplemanik) hastalardan toplanan trofoblast dokularında, normal kompleman aktivitesine sahip gruba kıyasla düşük CD55 seviyesi olduğu bildirilmiştir. Buna göre, trofoblast üzerindeki yüzey antijenlerine yönelik antikörlerin, kompleman düzenleyici moleküllerin azaltılmış ekspresyonunun yanı sıra RSA'lı hastalarda kompleman aktivasyonu ile de ilişkilendirilebilir (Girardi ve ark., 2006; Micheloud ve ark., 2007).

Decay accelerating faktör (DAF, CD55), MAC inhibitör proteini (MAC-IP, CD59) ve membran ko-faktör proteini (MCP, CD46), aşırı kompleman aktivasyonunu tetiklemek ve aracılık ettiği yaralanmaları engellemek için plasentada yüksek oranlarda eksprese olmaktadır (Zhang ve Jin, 2019).

Ayrıca istenmeyen bir kompleman aktivasyonu da başarılı ve normal bir insan hamileliğinde, trofoblast yüzeyinde eksprese edilen CD46 ve CD55 gibi inhibitörler tarafından önlenmektedir. Bu yüzden, CD46 ve CD55 proteinlerinin eksikliği, aşırı C3 birikimi nedeniyle plasental inflamasyonun bir sonucu olarak embriyonik ölüme yol açabilmektedir. Thielen ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada HAP1 insan hücre hattı kullanılarak CD46, CD55 ve CD59 proteinleri hedeflenmiş ve C3/C4 birikimi üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Bulgular, klasik yolak üzerine hem CD46 hem de CD55'in C3 birikiminin düzenlemesi için önemli olduğu, C4 birikimi için ise sadece CD46'nın önemli olduğunu göstermiştir (Thielen ve ark., 2018).

Kompleman ürünlerinden C4'ün bölünmüş bir ürünü olan C4d'nin HLA antikörleri ve zayıf allogreft ile ilişkili olabileceği bilinmektedir. Mannoza bağlayıcı lektin boyaması gözlenmediği için klasik kompleman aktivasyonu sonucu C4d plasenta birikimi olduğu bildirilen bu çalışmada, ilk üç aylık düşüklerin yaklaşık üçte ikisinde sıg yerleşimin ve spiral arterlerin yeterli tıkanmaması sonucu erken intervillöz dolaşım ve plasental oksidatif strese yol açtığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla

preeklampsi ve düşük gibi durumların, sığ yerleşimin ortak bir patogenezi paylaştığı düşünülerek C4d'nin riskli plasentalar için bir biyobelirteç olabileceği bildirilmiştir (Kim ve ark., 2015; Girardi, 2018). Meuleman ve ark.'nın, 2015 yaptığı bir çalışmada da maternal taraftaki sinsitiyo-trofoblastta C4d birikiminin, sporadik düşük yapan kadınlara kıyasla, açıklanamayan ardışık düşüklere olan kadınlarda önemli ölçüde arttığını gösterilmiş ve fetal-allogreftin antikor aracılı reddinin gebelik komplikasyonlarında mevcut olabileceği doğrulanmıştır (Meuleman ve ark., 2015).

Kompleman bileşenleri, hamile olmama durumuna kıyasla normal olarak gebelikte yüksek olmasına rağmen, aşırı kompleman aktivasyonu ve özellikle artan C5a üretimi, tekrarlayan düşük, erken doğum ve preeklampsi gibi çeşitli gebelik komplikasyonlarına neden olmaktadır. C5a, anjiyogenezi bozarak, gebeliğin erken evrelerinde fetal kayba veya gebeliğin sonraki aşamalarında preeklampsiye yol açan anormal plasentasyona katkıda bulunabilir (Denny ve ark., 2012).

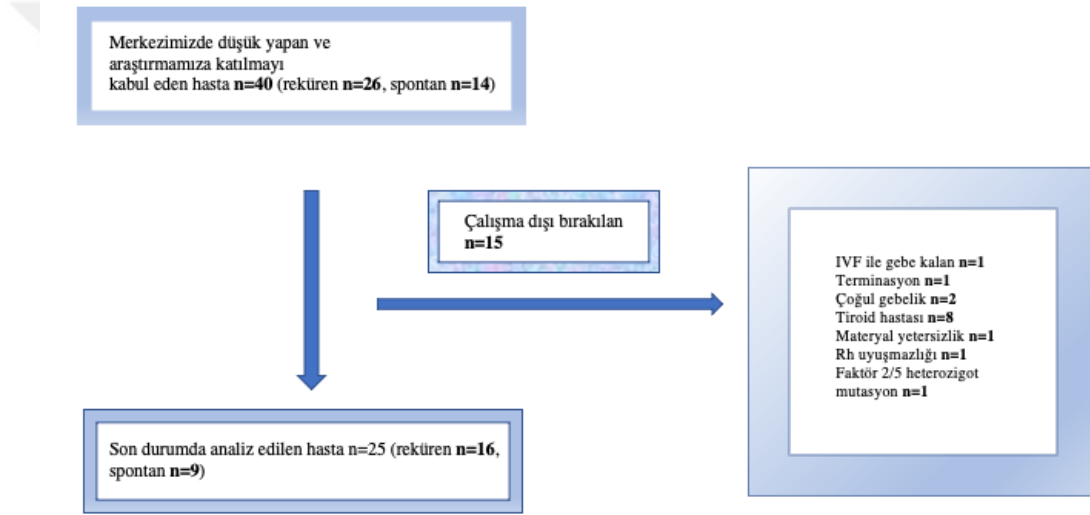
Fetal trofoblast antijenlerine karşı yönlendirilen antitrofoblast antikorları, gebeliğin erken dönemlerinde ortaya çıkar ve tekrarlayan düşüklere yatkınlık yaratarak zararlı bağışıklık tepkilerine aracılık eder. Tekrarlayan açıklanamayan implantasyon başarısızlıkları olan infertil kadınlarda plasentaya özgü antijene karşı birçok ATA bildirilmiştir (Yang ve ark., 2018).

Kompleman aktivasyonu, gebelik kaybı ve fetal büyüme kısıtlamasında nedensel bir rol oynamaktadır. Bu nedenle kompleman kaskadının basamakları aktivasyonu düzenleyici rol oynayarak gebeliği kurtarıcı görev üstlenmektedir. Trofoblastların kompleman düzenleyici proteinleri, allojenik fetüsü maternal bağışık yanıtlardan koruma mekanizması yaratmaktadır. Kompleman sisteminde yer alan düzenleyici proteinlerin azalan/artan ekspresyonları, gebelik komplikasyonlarına neden olabileceği için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde hedef bir sistemdir.

11. GEREÇ ve YÖNTEM

11.1 Çalışma Planı

Bu çalışma vaka-kontrol çalışması olarak planlandı ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurul onayı alındı (Ek 3.). Çalışmamıza, Eylül 2018 – Mayıs 2020 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Doğum Poliklinikleri'ne başvurmuş, spontan ve tekrarlayan gebelik kaybı bulunan olgular dahil edilmiştir. Spontan gebelik kaybı (yaşayanı olan/olmayan, 1 kere düşük yapmış) yaşamış olanlar kontrol, iki veya daha fazla gebelik kaybı olanları ise hasta grubumuza dahil edilmiştir.



Şekil 19. Hasta analiz planlamasını gösteren şema.

11.1.1. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Hasta grubu için:

- 18-42 yaş arası olmak
- Daha önce 2 ve daha fazla gebelik kaybı öyküsü olmak.
- Daha önce doğum yapmış, tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olmayan, bilinen bir gebelik kaybı nedeni olmadan spontan aborte etmiş olmak.

11.1.2. Çalışma Dışında Tutulma Kriterleri

Hasta ve Kontrol Grubu için:

- 18 yaş altı, 42 yaş üstü hastalar,
- Çalışmaya katılmayı kabul etmeyen hastalar,
- Bilinen bir abortus nedeni olan hastalar,
- * Genetik nedenler (parental sayısal veya yapısal kromozom bozukluğu olanlar)
- * Endokrin nedenler (hipo-hipertiroidi, diabetes mellitus, hiperprolaktinemi vb.)
- * Anatomik nedenler (Konjenital uterin anomaliler, Ascherman sendromu, Servikal yetmezlik, in utero DES maruziyeti vb.)
- * İmmunolojik nedenler (antifosfolipid sendromu, SLE vb.)
- Sigara, alkol, uyuşturucu, ilaç bağımlılığı olanlar,
- Gebeliğin erken döneminde teratojen ajan maruziyeti (X ışını, teratojen ilaç) olanlar,
- Maternal ya da fetal hastalık nedeniyle tıbbi tahliye yapılan hastalardır.

11.1.3. Çalışmadan Çıkarılma Kriterleri

- Yeterli abort materyali alınamayan hastalar
- Abort materyalinde kromozom anomalisi saptanan hastalar
- Rh uyuşmazlığı olan hastalar.

Klinik veriler eşliğinde tekrarlayan ve spontan düşük yapan hastaların, eşleri arasında bir akrabalık olup olmadığı, son adet tarihleri, ultrason bilgileri, medikal ve cerrahi özgeçmişleri, kullandıkları ilaçlar, düşük haftaları ve kan uyuşmazlıkları olup olmadığı ve biyokimyasal sonuçları (serum C3, C4, TSH, Serbest T3, Serbest T4 ve Progesteron düzeyleri) kaydedilmiştir.

11.2. Maternal Periferik Kandan DNA izolasyonu ve Serum eldesi

Spontan ya da inkomplet düşük yapan hastalarda ameliyathaneye müdahale için alındığında hastadan 2 adet jelli sarı tüpte serum örneği ve 5 adet mor kapaklı EDTA'lı tüpte 3 mL periferik kan örnekleri alındı. Jelli sarı kapaklı 10 mL' lik tüpteki serumlar 1000 rölatif santrifugal güç (RCF) devirde 10 dk boyunca çevrilerek ayrıştırıldıktan

sonra bir dahaki işleme kadar -20 °C’de saklandı. EDTA’lı periferik kan ise 3 gün geçmeden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra -80 °C’de saklandı.

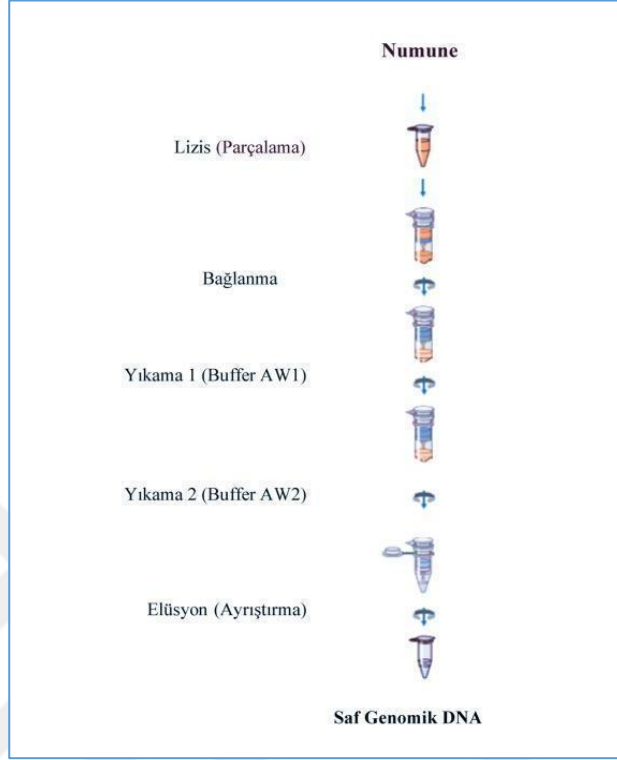
Periferik kandan 0.21 cc içeriği Tablo 1’de verilen ticari bir kit (“QIAamp DNA Blood Mini kit”, QIAGEN) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre saf genomik DNA elde edildi. Daha sonra DNA’nın saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrik olarak NanoDrop® cihazı ile ölçüldü.

Tablo 1. QIAamp DNA Kan Mini Kit’in içeriği (250 reaksiyonluk).

QIAamp DNA Kan Mini kiti (QIAGEN)	
QIAamp Mini Spin Kolonları	250
Toplama Tüpleri (2 ml)	750
Buffer AL	2 x 33 ml
Buffer AW1* (konsantre)	98 ml
Buffer AW2* (konsantre)	66 ml
Buffer AE (Elüsyon)	60 ml
QIAGEN® Proteaz	1 tüp
Proteaz Çözücü	5,5 ml

İlk olarak, 20 µl Proteinase K ve 0.21 cc hasta kanı kullanıldı. Daha sonra 200 µl AL Buffer eklenerek vortex edildi ve kısa bir santrifüjden geçirilen örnek lizis işlemi için önceden ısıtılmış ısı bloğunda 56.0 °C’de 10 dk bekletildi. Bu aşamadan sonra olası buharlaşmadan dolayı kapakta kalan kanların çöktürülmesi için kısa bir santrifüjden geçirildi. Sonrasında örnek 200 µl soğuk 96-100% lik ethanol ile muamele edildi ve tekrar vortekslenerek kısa santrifüj ile çöktürüldü. Bu işlemlerden geçen örneğin tamamı, bağlanma için kolona aktarıldı. Aktarıldıktan sonra 8000 devirde 1 dk çevirilen örneğin atığı döküldü ve yıkama işlemlerine başlandı. Saf bir şekilde elde edilmesi için önce 500 µl AW1 buffer eklendi ve 8000 devirde 1 dk santrifüj edildi. Tekrardan atık materyali döküldü ve 500 µl AW2 Buffer eklendi. Aktarıldıktan sonra 8000 devirde 1 dk çevirilen örneğin atığı döküldü ve yıkama işlemlerine başlandı. Saf

bir şekilde elde edilmesi için önce 500 µl AW1 buffer eklendi ve 8000 devirde 1 dk santrifüj edildi.



Şekil 20. DNA izolasyon aşamaları.

Tekrardan atık materyali döküldü ve bu sefer 500 µl AW2 Buffer eklendi. Eklenen bufferdan sonra 12000 devirde 3 dk çevrilen örneğin yıkama işlemleri tamamlandı. 1,5 ml lik ependorfa oturtulan kolondan elüsyon aşaması için 50 µl AE Buffer eklendi ve 8000 devirde 1 boyunca dk çevrildi. Bu işlem tekrarlanarak 50 µl daha AE buffer eklendi ve istenen 100 µl genomik DNA elde edildi (Şekil 20).

11.3. Parafin Bloktan Fetal Kaynaklı DNA İzolasyonu

Bu aşamada Patoloji Biriminden destek alındı ve hastaların parafine gömülü dokularına ulaşıldı. Parafinize edilmiş düşük materyallerinden patolojik inceleme ile fetal kaynaklı koryon villus yapıları işaretlenerek yalnızca fetüse ait dokulardan qf fragman analizi çalışmasına örnek ayrıştırıldı. Parafine gömülü düşük dokusundan fetüse ait koryon villus işaretlenmiş bölgelerden kesitler alınarak ksilende eritildi. Ksilende eritilen kesitler dereceli alkolle muamele edilerek parafinin tamamen erimesi

sağlandı. Parafinden arındığına emin olduktan sonra Roche Hücre ve Doku DNA İzolasyon kiti (Tablo 2.) kullanılarak hedef bölgelerden DNA elde edilmiştir.

Tablo 2. ROCHE Hücre ve Doku DNA İzolasyon kitinin içeriği.

Şişe	İçerik	Miktar
1	Hücresel Lizis Buffer	150 ml
2	Proteinaz K Solüsyonu	100 ml
3	Rnaz Solüsyonu	5 ml
4	Protein Presipitasyon Solüsyonu	60 ml

İşlenecek her 400 mg doku örneği için, steril bir santrifüj tüpüne 10 ml Hücresel Lizis Tamponu eklendi ve yaklaşık 10 ila 15 saniye homojenize edildi. Sonra, 6.1 µl Proteinaz K Solüsyonu eklendi ve 2-3 saniye vortekslendi. Örnekler 1 saat boyunca 65°C'de bekletildi. Daha sonra her örneğe 400 µl RNaz Solüsyonu eklendi. RNaz Solüsyonunun stok konsantrasyonu 10 mg / ml idi. Çözelti süspansiyona karıştırmak için numune 2-3 saniye vortekslendi. Numune 37 ° C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra (max. 1 saat) her numuneye 4.2 ml protein presipitasyon solüsyonu eklendi ve 5-10 saniye iyice vortekslendi. Protein çökmesine yardımcı olmak için 5 dakika boyunca örnek buz üzerine yerleştirildi. Daha sonra 26.900 × g'de 15 ila 25°C'de 20 dakika santrifüjlendi.*³ Santrifüj aşamasından sonra, numuneye bağlı olarak kahverengi veya beyaz bir pelet bulunduktan sonra, DNA içeren süpernatant yeni, steril 50 ml'lik bir santrifüj tüpüne dikkatlice pipetlendi.

Numuneye 0.7 hacim izopropanol eklendi ve üst/alt fazlar karışana kadar yavaşça ters çevrildi. DNA “dizeleri” görüldükten sonra 10 dakika boyunca 1,370 x g'de santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. DNA peletine 10 ml soğuk % 70 etanol eklendi. Tüpü hafifçe vurarak pelet tüpün altından ayrıldı. Örnek 5 dakika boyunca

^{3*} Daha düşük santrifüj sıcaklıkları veya hızları, çok gevşek protein peletleri, düşük verim ve DNA örneğinin protein ile kontaminasyonu ile sonuçlanacaktır.

1,370 × G'de santrifüjlendikten sonra supernatant atıldı. DNA pelleti 5 dakika ısı olmadan vakum altında etanol artık görünmeyene kadar kurutuldu.

DNA pelletini yeniden süspanse etmek için 1 ml TE Tamponu eklendikten sonra 2 saat boyunca 50°C'de inkübe edildi. NanoDrop cihazı ile ölçümü yapılan fetüse ait DNA örnekleri, fetüs kromozom tayini için bir sonraki aşamada kullanılmak üzere +4°C'de bekletildi.

11.4. Kantitatif Floresan PZR (QF) Fragman Analizi

Elde edilen fetüse ait DNA ile her bir fetüse ait anne kanı maternal kontaminasyonu en aza indirebilmek için eş zamanlı fragman analizi ile değerlendirildi. Fragman analizinde Devyser Compact v3 (13, 18, 21, X ve Y markörleri için) ve ChromoQuant® Optima Plus (15, 16 ve 22 markörleri için) QF PCR kiti kullanıldı (Tablo 3).

Tablo 3. Devyser Compact v3 kitinin içeriği (50 testlik).

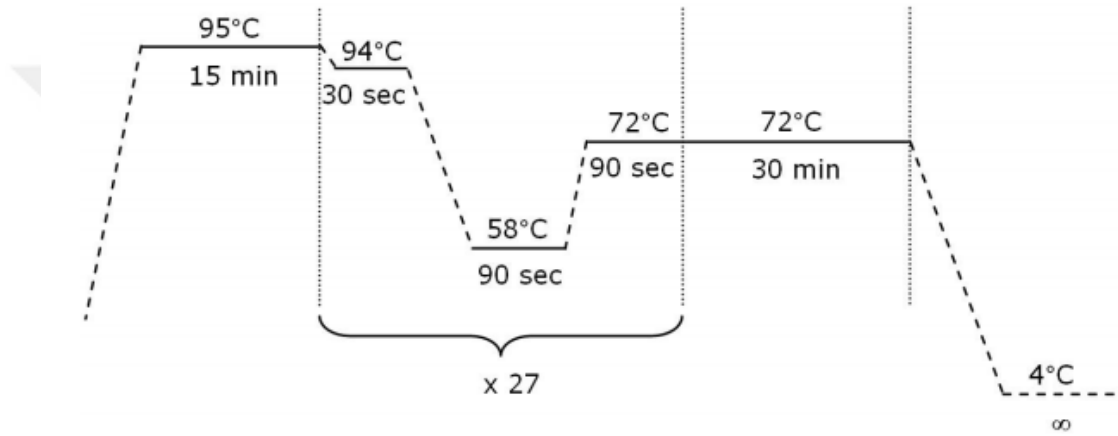
Cap Rengi	Tüp Rengi	Label	Art.No.	Kit içeriği (50 testlik)
Turuncu	Clear	PZR Aktivatör RUO	4-A035	2
Yeşil	Amber	Kompact v3 Mix RUO	4-A189	2

Tablo 4. ChromoQuant® Optima Plus kitinin içeriği.

Cap Rengi	Solüsyon No	Kit No	Tüp No	İçerik
Beyaz	203.700-10	531.001-26	1	Kromozom 15,16,22 için reaksiyon mixi
Şeffaf	204.100-10	531.001-26	1	Taq Polimeraz içeren aktivatör miks

Parafin bloğun fetüse ait kısımlarından izole edilen DNA örneklerinde; PZR yöntemiyle 13, 15, 16, 18, 21, 22, X ve Y bölgelerine özgü markörler aracılığıyla çoğaltılıp fragman analizi yöntemi ile STR (kısa tandem tekrarı) analizi yapıldı. Bu metot fetal anomali tayini için trisomi 13, 15, 16, 18, 21, 22 ve cinsiyet (X,Y) kromozomlarının anormal olup olmadığını ortaya koymuştur.

Öncelikle, elde edilen DNA izolasyonu ve sonrasında yapılan PZR aşamasından (Şekil 21) sonra, 2 µL size standardını (örn. 60 SIZER TURUNCU) 100 µL Hi-Di TM Formamide (6 kuyu veya tüp için yeterli karışım) ile birleştirip karıştırarak bir yükleme kokteyli hazırlandı. On beş saniye vortekslenip, 15 µL yükleme kokteyli bir mikro kuyu plakasının gerekli sayıda kuyucuğuna veya Genetik Analizör üzerine yerleştirilerek ayrı tüplere (ABI3500) dağıtıldı. Karşılık gelen kuyucuğa veya yükleme kokteyli içeren tüpe 1,5 µL örnek PZR ürünü ekleyip plaka ve tüpler kapatıldı. Daha sonra cihaz aşağıdaki gibi kurulduktan sonra run verildi (**Tablo 4**).



Şekil 21. PZR çalışma protokolü.

Tablo 5. Devyser Compact v3 ve ChromoQuant Optima, ABI3500.

Run Parametreleri	POP-7	Run Parametreleri	POP-7
Kapiller uzunluğu	50 cm	Kapiller uzunluğu	50 cm
Çalışma sıcaklığı	60 °C	Çalışma sıcaklığı	60 °C
Enjeksiyon voltajı	1,6 kV	Enjeksiyon voltajı	1,6 kV
Enjeksiyon süresi	15 s	Enjeksiyon süresi	15 s
Çalışma voltajı	19,5 kV	Çalışma voltajı	19,5 kV
Çalışma süresi	1500 s	Çalışma süresi	60 dk

ChromoQuant kiti içeriğindeki iki ayrı mix; 6 µL (4,8 Reaksiyon mix + 1,2 Aktivatör mix), 4 µL (1-2 ng/L) DNA ile iyice karıştırılarak kısa süre santrifüj ile tüm PZR karışımının birbirine karışması sağlandı. Daha sonra Tablo 5.'deki protokol uygulandı.

Tablo 6. ChromoQuant PZR protokolü.

Tekrar Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	95 °C	15 dk
26 tekrar	94 °C	30 sn
26 tekrar	57 °C	1 dk
26 tekrar	71 °C	2 dk
1	71 °C	5 dk
1	60 °C	60 dk
Sonsuz	4 °C	∞

PZR aşamasından sonra Devyser protokolünde olduğu gibi; 12 µL Hi-Di FA + 0,15 µL LIZ500 (size standart) + 0,5 - 1.0 µL PZR ürünü içeren yükleme mixleri hazırlandı ve ABI3500) analizöre yüklendi.

Çıkan sonuçlara göre her marköre karşılık gelen pikler değerlendirilerek ilgili bölgede anomali olup olmadığı değerlendirildi.

Analizi:

Kromozoma özgü tekrarlayan DNA sekansları, kısa tandem tekrarlar (STR) olarak PZR ile çoğaltılmaktadır. Floresan ışıma yapan primerler kullanılarak PZR ürünleri işaretlenerek yürütülmektedir. STR bölgeleri boyut olarak örnekler arasında değişiklik gösterirken; her bir allelede bulunan dört yapıli tekrar sayılarına bağılıdır. Heterozigot olan bir örnekte, farklı uzunlukta alleller mevcut olduğundan dolayı, spesifik bir STR markörüne özgü pik bölgesinde farklı uzunlukta iki pik görülmektedir. Öte yandan trisomik olan bir olguda, benzer bölgede üç pik veya biri diğerinin iki katı büyüklüğünde olan yalnızca iki pik görülmektedir.

Tek bir allel bulunduran spesifik markörler homozigotluğu temsil edebilirken öte yandan bilgilendirici olmayabilir. Ancak bir STR (kısa tandem tekrarları) homozigotluk veya monozomik durumu olan örnekler, tek bir pik gösterecektir.

ID	Lokasyon	Kromozom	STR	Bp büyüklüğü	Renk
D15S195	15q21	15	Tetra	100-160	Yeşil
D15S652	15q26	15	Tri	277-321	Mavi
D15S659	15q15	15	Tetra	167-215	Mavi
D15S822	15q12	15	Tetra	301-369	Yeşil
D15S657	15q26	15	Tetra	332-372	Kırmızı
D16S539	16q24.1	16	Tetra	266-314	Sarı
D16S2624	16q22	16	Tetra	120-160	Kırmızı
D16S2616	16p13.2	16	Tri	109-142	Mavi
D16S2621	16q23	16	Tetra	227-271	Yeşil
D16S753	16p11	16	Tetra	244-288	Kırmızı
D22S532	22q13.31	22	Tetra	385-417	Sarı
D22S686	22q11.2	22	Tetra	344-390	Mavi
D22S683	22q12	22	Tetra	170-226	Sarı
D22S1045	22q13.1	22	Tri	137-164	Sarı
D22S691	22q12	22	Tetra	220-270	Mavi

Şekil 22. ChromoQuant Optima Plus kiti markör boyutlarını ve renklerini gösteren tablo.

T1 ve T3 markörleri ise polimorfik olmayıp X kromozom sayısını tayin eder. Normal kadın bir bireyde X kromozom sayısını 1:1 oranda olmalı iken; monozomi X bulunan bir erkek veya dişide oran 2:1 şeklindedir.

AMELXY ve SRY markörleri sayesinde, X ve Y kromozomları üzerinde polimorfik olmayan sekanslar çoğaltılır ve Y kromozom varlığı kontrol edilir. Ayrıca, X ile Y kromozom sayısının birbirine göre bağıntısı değerlendirilebilmektedir.

XY2 ve XY3 markörleri, polimorfik STR markörleri olup hem X hem de Y kromozomları üzerinde bulunurlar. ZFYX markörü ise hem X hem de Y kromozomu üzerinde bulunan ve polimorfik olmayan belirteçlerdir. Bu markörler sex kromozomlarının toplam sayısını değerlendirmede bilgilendiricidir. Ancak, hangi allelin X hangi allelin Y olduğu bilinmemektedir (@Devyser AB, 2012-2014).

ID	Lokasyon	Markör	Markör büyüklüğü	Boya Rengi
13A	13q12.12	D13S742	222 - 334	Yeşil
13B	13q21.32-q21.33	D13S634	365 - 435	Mavi
13C	13q31.1	D13S628	420 - 475	Sarı
13D	13q13.3	D13S305	435 - 505	Yeşil
13K	13q21.1	D13S1492	100 - 175	Kırmızı
18B	18q12.3	D18S978	195 - 230	Sarı
18C	18q12.3	D18S535	300 - 350	Mavi
18D	18q22.1	D18S386	338 - 430	Yeşil
18J	18p11.31	D18S976	440 - 495	Kırmızı
18M	18p11.32	GATA178F11	350 - 410	Sarı
21A	21q21.3	D21S1435	150 - 208	Mavi
21B	21q21.1	D21S11	215 - 290	Mavi
21C	21q22.3	D21S1411	245 - 345	Sarı
21D	21q22.13	D21S1444	440 - 495	Mavi
21H	21q21.3	D21S1442	362 - 420	Kırmızı
21I	21q21.1	D21S1437	105 - 152	Sarı
X1	Xq26.2	DXS1187	120 - 170	Yeşil
X3	Xq26.2-q26.3	XHPRT	265 - 308	Kırmızı
X9	Xq27.1-q27.2	DXS2390	312 - 357	Kırmızı
SRY	Yp11.31	SRY	236	Sarı
XY2	Xq21.31, Yp11.31	DXYS267	175 - 217	Yeşil
XY3	Xp22.33, Yp11.32	DXYS218	215 - 260	Kırmızı
AMELXY	Xp22.2, Yp11.2	AMELX, AMELY	X = 104, Y = 110	Mavi
ZFYX	Yp11.31, Xp22.11	ZFY, ZFX	157 - 166	Sarı
T1	7q34, Xq13	-	7 = 181, X = 201	Kırmızı
T3	3p24.2, Xq21.1	-	3 = 133, X = 137	Mavi

Şekil 23. Devyser Compact v3 kiti markör boyutlarını ve renklerini içeren tablo.

11.5. Atık Düşük Materyali Hazırlanması ve Desidual RNA izolasyonu

Elli mL’lik falkon tüpler içinde 3 cc RNAlater® ve 30 µl β-merkaptol karışımı içinde bulunan, atık doku materyali RNA izolasyonu basamağına kadar +4 °C de bekletildi. Atık düşük materyali, hedef desidua hücre tayini için buz aküsü üzerinde bistüri ile parçalandıktan sonra ışık mikroskobu yardımıyla 40 X odağında incelendi.

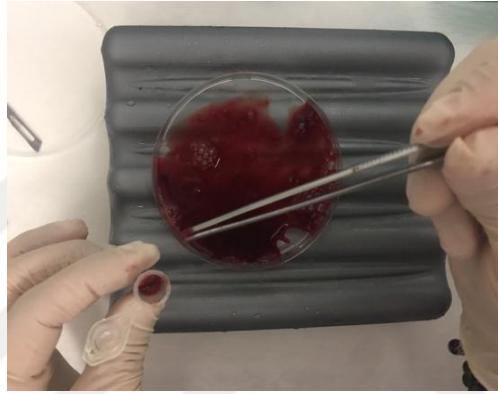


Resim 1. Desidua hedef hücrelerinin 40X mikroskobik görüntüsü.

Hedef desidua hücrelerini içeren trofoblastik dokudan Tablo 5’te açıklanan ticari kit (“RNAzol®RT”, Jena Bioscience) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre RNA izolasyonu yapıldı.

Tablo 7. RNAzol®RT Kit’in içeriği (100 ml).

RNAzol®RT(Jena Bioscience)	
RNAzol RNA izolasyon solüsyonu	100 ml
BAN solüsyonu (opsiyonel)	1 ml



Resim 2. Buz aküsü üzerinde parçalanarak santrifüj tüpüne alınan desidua dokusu.

Kazıma işlemi yapılarak toplanan ve MagnaLyser® (Roche, USA) seramik boncuk içeren tüpler içerisine alınan nohut büyüklüğündeki doku üzerine 800 µl RNAzol® solüsyonu eklenerek MagnaLyser® cihazında 7000 devirde 30 sn olacak şekilde ileri bir parçalama işlemi gerçekleştirildi.

Tam parçalama işlemi gerçekleştirilemeyen örneklerde bir kez daha MagnaLyser® cihazında 7000 devirde 30 sn çevrildi. RNAzol®RT (100 ml) manuel solüsyon kiti ile RNA elde işlemi gerçekleştirildi.

Bu ticari kite göre, MagnaLyser® cihazında parçalanmış doku üzerinde kalan sıvı yeni steril bir 1,5 ml lik eppendorf tüpe alındı ve üzerine 400 µl steril su eklenerek 15 dakika beklendi. Daha sonra örnekler 15 dakika 12,000 rpm devirde santrifüj edilerek üst fazları yeni bir eppendorfa alındı. Supernatantı alınan örnekler üzerine 5 µl, kitin içerisinde olan ve daha saf RNA eldesi için kullanılan opsiyonel BAN solüsyonu eklenerek 4 dk beklendi. Sonrasında, 12,000 rpm devirde 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj edilen örneklerin üst fazı tekrardan yeni bir tüpe alındıktan sonra alınan

miktar kadar üstüne soğuk izopropanol eklendi ve 15 dk kadar beklendi. Daha sonrasında 12,000 G devirde 10 dk santrifüj edildi.

Bundan sonraki aşamalarda RNA'yı daha saf elde etmek amacıyla yıkama işlemi amacıyla üzerine 800 µl kadar %75'lik soğuk etanol koyularak 4,000 rpm devirde 3 dk santrifüj edildi.

Supernatantı atılan örnekler ikinci kez aynı şekilde yıkama işlemi uygulandı ve santrifüjün sonunda ise alkol tamamen uzaklaştırılarak 5 dk kadar beklendi.

Alkolün tamamen uçtuğundan emin olduğumuz zaman ihtiyacımız kadar (yaklaşık 30 µl – 60 µl) RNase-DNase free su kullanılarak dipte kalan RNA çözdürüldü. NanoDrop cihazında, çözünen RNA'ların konsantrasyonu 260/280 ve 260/230 dalga boyları dikkate alınarak ölçüldü. Ölçülen RNA'lar bir sonraki aşama olan cDNA eldesine kadar -20 °C'de saklandı.

11.6. cDNA Sentezi

Elde edilen Total RNA'dan, içeriği Tablo 6'da verilen ticari bir kit ("SCRIPT cDNA Sentez Kiti", JENA Bioscience, Almanya) kullanılarak; üreticinin talimatlarına göre Reverz Transkripsiyon ile cDNA sentezlendi. Öncelikle, reaksiyon öncesi kullanılacak RNA örnekleri NanoDrop® cihazı ile ölçüldü. Kitin önerisi doğrultusunda 200-300 ng RNA ile reaksiyona başlandı. RNA'lar buzun üzerinde çözüldü. Kitin diğer içeriği ise oda sıcaklığında çözüldü.

Reverz transkripsiyon için kitin önerisi doğrultusunda karışım hazırlandı. Her örnek için 5 x Script RT tamponundan 4 µl, DTT stok solüsyonundan 1 µl, dNTP Nükleik asit karışımından 1 µl, OligodT primerinden 0,5 µl, RNaz inhibitöründen 0,5 µl, Enzim Script Reverz Transkriptaz karışımından 0,5 µl alındı. Her bir örnek için alınacak değişen RNA hacmine göre toplam hacim 20 µl olacak şekilde RNAaz içermeyen su tüplere eklendi. 42°C'de 10 dk inkübe edildi. Daha sonra 50°C'de 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 10 dk 70°C'de Reverz Transkriptaz enzimi inaktive edildi. Elde edilen cDNA konsantrasyonları NanoDrop® cihazı ile ölçüldü.

Tablo 8. SCRIPT cDNA Sentez Kitinin içeriği (100 Rxn)

SCRIPT Reverz Transkriptaz 200 units/ μ l	100 μ l
SCRIPT RT Tampon 5x conc.	100 μ l
dNTP Mix 10 mM	400 μ l
DTT stok solüsyonu 100 mM	100 μ l
Oligo-(dT)20 primer 100 μ M	50 μ l
Random Hekzamerler 100 μ M	50 μ l
RNaz İnhibitörü 40 units/ μ l	50 μ l
Positif Kontrol RNA 10 ng/ μ l	10 μ l
RNaz içermeyen su	1,2 ml

11.7. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Total RNA tek basamaklı RT-qPZR ile cDNA elde edilmesini takiben, DAF/CD55 , MCP/CD46 ve protektin/CD59 moleküllerinin mRNA ekspresyonu optimizasyonu yapıldı. Bu reaksiyon için hazırlanan karışımda; her bir örnek için Syber karışımından 10 μ l, önce hedef genlerin ileri primerinden 0.6 μ l ve geri primerinden 0.6 μ l alındı. Her bir örnek için 500 ng konsantrasyonu geçmeyecek şekilde alınan cDNA hacmine göre, toplam hacim 20 μ l olacak şekilde nükleaz içermeyen su tüplere eklendi. Aynı karışım iç kontrol geni için yapılacak reaksiyon için de hazırlandı.

Tablo 9. Kantitatif Eş Zamanlı PZR (qPCR) SybrMaster kitinin içeriği.

qPCR SybrMaster kit (JENABIOSCIENCE) SybrMaster qPCR Karışımı	BIORAD CFX96™ Örnek başına hacim 10 μ l
10x ileri primer	0,60 μ l
10x geri primer	0,60 μ l
Kalıp cDNA	0,25 μ l (150 ng/ μ l)
Nükleaz içermeyen su	8,55 μ l
Toplam	20 μ l

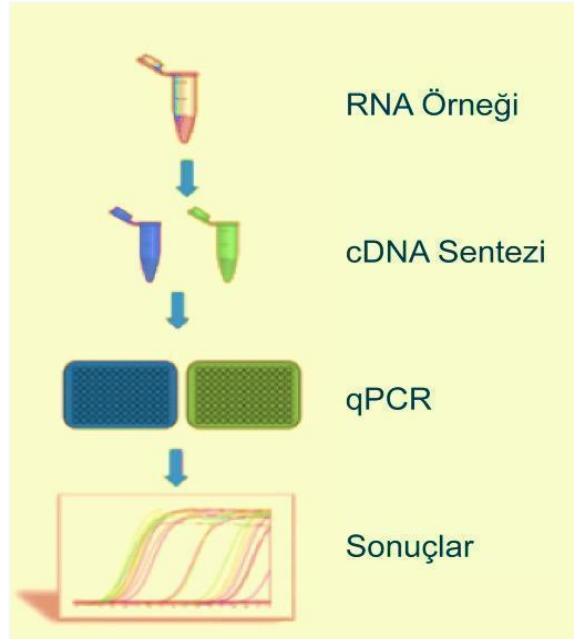
Bu aşamada kısaca, DAF/CD55 , MCP/CD46 ve protektin/CD59 moleküllerinin mRNA ekspresyonu için izole edilen total RNA tek basamaklı RT-qPZR ile cDNA

elde edilmesini takiben bu moleküllere özgü primerler ve iç kontrol geni olarak da GAPDH primeri (**Tablo 8.**) kullanılarak kantitatif eş zamanlı PZR yapıldı.

Tablo 10. Dizayn edilen hedef primerlerin ileri ve geri sekansları.

Primerler	İleri Primer Sekansı 5'→3'	Geri Primer Sekansı 5'→3'
CD46	GTCTCAGATGACGCCTGTTATAG	ACCAAACCTCGTAAGTCCCATT
CD55	TCCAGGACAACCAAGCATT	ACGTGTGCCAGATAGAAGA
CD59	GCTCCTTGGATGTAGTCAGTTAG	CACGGGATCCCTGAAGTTTAT
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	TGACAAGCTTCCCGTTCTCAG

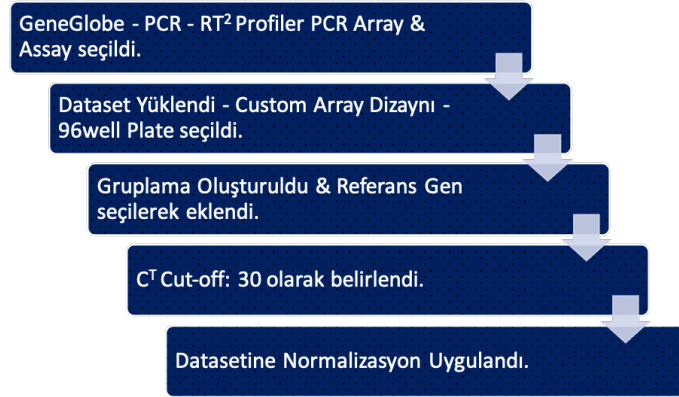
- 95°C'de 2 dk başlangıç denatürasyonu yapıldı ve polimeraz aktive edildi.
- Daha sonra 95 °C'de 15 sn denatürasyon için; 60-65 °C'de 1 dk annealing ve uzama reaksiyonları için 40'ar döngü tekrarlandı. Reaksiyonda ayarlanacak annealing derecesi, kullanılan primerlerin erime sıcaklıklarına bağlı olarak uygulandı. CD46 primerinin optimum çalışma sıcaklığı, yapılan Pzr optimizasyonu sonrasında 62,6°C olarak belirlendi. CD55 ve CD59 primerlerinin optimum sıcaklık değeri ise 61,2°C olarak belirlendi.



Şekil 24. RNA'dan RT-qPZR'a kadar olan aşamaların gösterimi.

Eş zamanlı PZR reaksiyonu sonucunda her iki grubun; iç kontrol gen ve hedef gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Cut-off değeri her döngü için en fazla 35 olarak belirlendi ve sonucu bu değeri geçen analizlerin tekrarı yapılarak çalışma optimize edildi.

Öncelikle, her bir hasta için ΔC_t değerleri, hedef gen C_t değerinden, kontrol gen C_t değeri çıkarılarak hedef genlerin her biri için ayrı $\Delta C_{tCD46,CD55,CD59}$ değerleri hesaplandı. Daha sonra kontrol grubundaki değerlerin ortalaması alınarak, her bir gen için $\Delta C_{tortalama}$ kalibratör hesaplandı. Sonrasında, hasta grubundaki ΔC_t değerlerinden, hesaplanan $\Delta C_{tortalama}$ kalibratör değerleri çıkartılarak ayrı ayrı $\Delta \Delta C_t$ değerleri bulundu. İstatistiksel analiz için hesaplanan veriler excel tablosuna kaydedildi. Ekspresyon sonuçlarına göre C_t değerleri 20,7 ila 35,87 aralığında değerlendirilerek cut-off değeri her bir döngü için 35 olarak belirlenmiştir. Elde edilen cut-off değerleri ile her bir gen için $\Delta \Delta C_t$ değeri hesaplanmıştır. Normalize edilen değerler eşliğinde $2^{-\Delta \Delta C_t}$ işlemi uygulanarak hedef gen ekspresyonunun kat değişimi öncelikle GeneGlobe software ile analiz edilmiştir. Ayrıca, Şekil 25'te açıklandığı gibi GeneGlobe Software kullanılarak dataset analizi gruplara göre gen ekspresyon plotu oluşturularak yapıldı (Şekil 32. & Şekil 33).



Şekil 25. GeneGlobe Programı Uygulama Şeması.

11.8. ELISA (Enzim bağlı immünosorbent deneyi) Yöntemi ile Maternal Serum ATA (Anti-Trophoblastik Antikor) Düzeylerinin Belirlenmesi

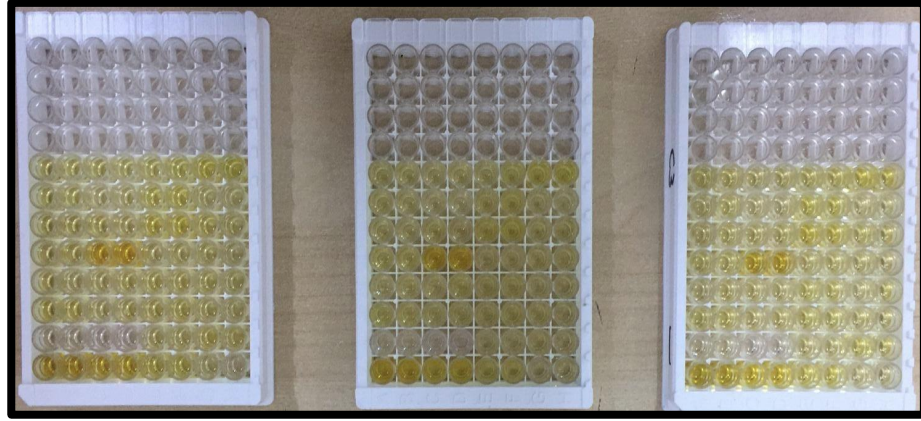
Kullanılan ticari kit ("ELISA", SunRed, Şanghay) Sandviç-ELISA prensibini kullanmaktadır. Üç ayrı kit (Tablo 9) içinde sağlanan 96'lık mikro ELISA plakası, insan C3a, C5a ve ATA'ya özgü antikor ile önceden kaplanmıştır. Kit içeriğindeki

standart diluent solüsyonu 6 ayrı tüpe 150'şer µl dağıtıldı ve sonrasında standart solüsyonundan 150 µl çekilerek ilk tüpte pipetaj yapıldı. Pipetaj yapılan ilk tüpten alınan 150 µl solüsyon bir sonraki tüpe aktararak her bir tüp sırasıyla yarı yarıya seyreltilti. Sonuncu tüp blank olduğu için seyreltme yapılmadı. Seyreltilen standartlardan 50 µl ikişerli ELISA plaka oyuklarına dağıtıldı. Hasta numuneleri de sırasıyla ve ikişerli 40 µl mikro ELISA plaka oyuklarına konularak spesifik antikorlar ile sırasıyla birleştirildi.



Resim 3. İnkübasyona hazır ELISA plakası.

Hasta serumları içeren kuyucuklara her kite özgü olan 10 µl biyotin antikorlu standartlar hariç her mikro plaka kuyusuna art arda ilave edildi. Daha sonra 50 µl Str-Horseradish Peroksidaz konjugatı (mavi renk) standartlar da dahil ancak blank hariç her kuyucuğa eklendi (Resim 3) ve plaka 1 saat inkübatörde bekletildi. ELISA plakası 4 kez yıkama işlemlerinden geçirildikten sonra mikro plaka ters çevrilerek peçete üzerinde kurulandı. Kurulanan plaka kuyularına sırasıyla 50 µl kromojen A ve B substrat çözeltileri ilave edilerek renk değişimi gözlemlenmesi için yaklaşık 7 dk inkübatörde bekletildi. Enzim-substrat reaksiyonu, kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltilisi ilave edilerek sona erdirildi ve rengin sararması beklendi (Resim 4).



Resim 4. Sırasıyla C3a, C5a ve ATA ELISA plakalarının stop solüsyonundan sonraki görüntüsü.

Elisa plakası, BioTek ELx800 okuyucusuna verilerek KC junior programı ile optik yoğunluk(OD) 450 nm $\pm$ 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak analiz edildi. Numunelerin OD'si standart eğri ile karşılaştırılarak numunelerdeki insan C3a (ug/ml), C5a (ng/ml) ve ATA (ng/ml) konsantrasyonları hesaplandı.

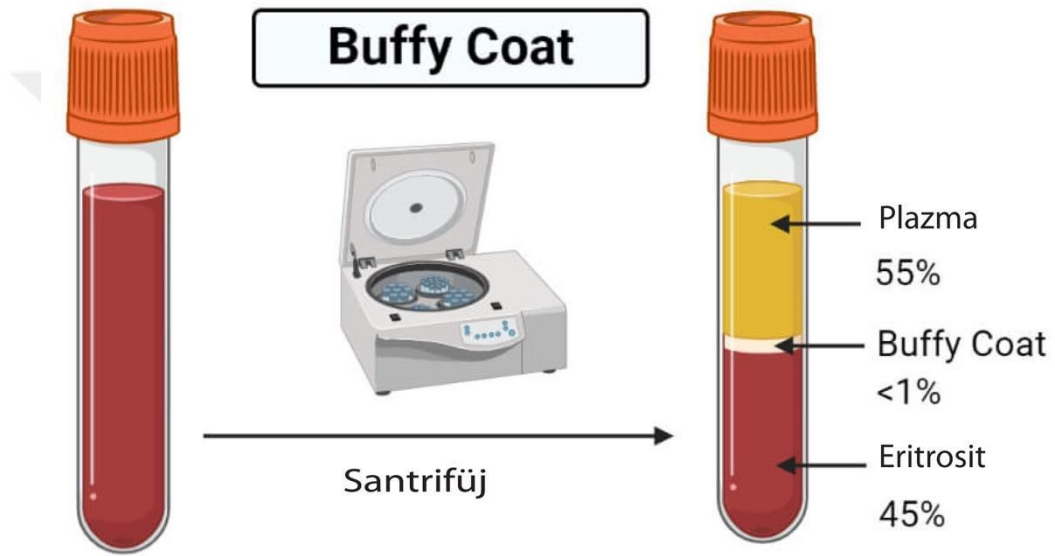
Tablo 11. ELISA SunRed İnsan C3a, C5a ve ATA kitinin içeriği.

Mikroelisa strip plate	12well x 8strips
Standart (160 μ g/mL)	0,5 ml
Standart seyreltici	3 ml
Biotin C3a, C5a ve ATA Ab	1 ml
Str – HRP Konjugatı	6 ml
30X Yıkama Solüsyonu	20 ml
Kromojen A Solüsyonu	6 ml
Kromojen B Solüsyonu	6 ml
Durdurma Solüsyonu	6 ml
Plate kapatma membranı	2
Kullanıcı kılavuzu	1

Hesaplanan her bir serum kompleman biyomarkerının istatistiksel anlamlılığı için bir cut-off değeri seçildi. C3a'nın cut-off değeri 119 ng/ml (Gao ve ark., 2020); C5a için 4 ng/ml (Unnewehr ve ark., 2013); ATA için 10.4 ng/ml (Davies ve Browne, 1985) cut-off değeri olarak belirlenerek analizi yapılmıştır.

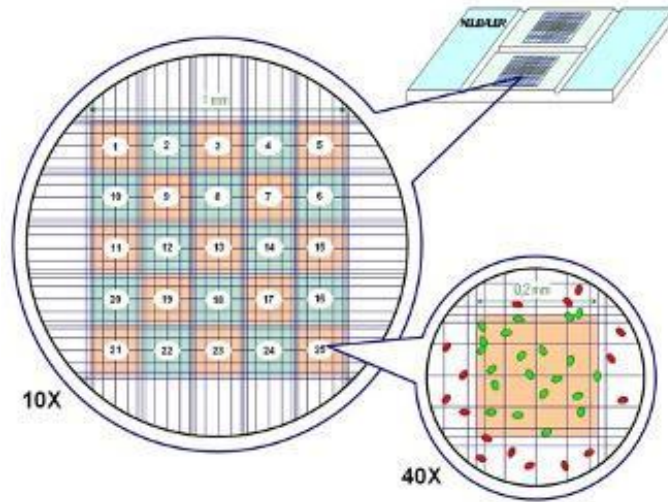
11.9. Eşler Arası Flow Sitometrik Cross-match

Diğer bir adıyla Akan Hücre Ölçer Akım Sitometrisi olan yöntem eşler arası cross-match analizi için kullanıldı. Periferik heparinize kan 1:1 oranında PBS solüsyonu ile sulandırıldı. Elde edilen süspansiyon ½ oranında PBS ile sulandırıldıktan sonra 3 ml Ficoll solüsyonu üzerine 6 ml kadar pasteur pipet ile yavaşca ilave edildi. Eşit miktarda sıvı içeren aynı denge tüpü ile karşılıklı konulan örnek, 1800 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi.



Şekil 26. Süspansiyonun ilk hali ve santrifüj edildikten sonraki hali. Buffy Coat: Ayırıştırılmış kanın eritrosit tabakası ile plazması arasında kalan ve beyaz kan hücrelerini içeren katmandır (<https://microbenotes.com/buffy-coat/>'dan değiştirilerek kullanılmıştır. Erişim tarihi: 30.10.2020).

Oluşan lökosit alanı (buffy coat) (Şekil 26) pasteur pipeti ile süpürülerek alınıp üzerine PBS ilave edilerek 1500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı döküldü. Geride kalan hücre süspansiyonu Neubauer lamında her küçük kare alanında 20-25 lökosit olacak şekilde sulandırıldı ve sayıldı.

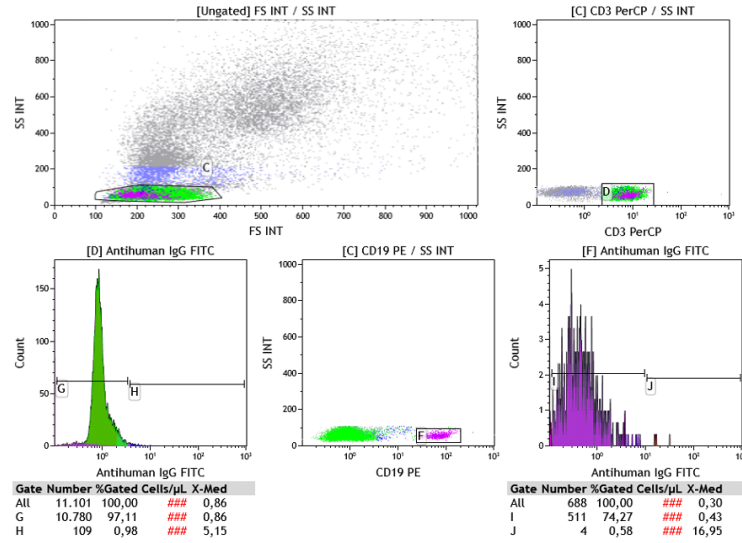


Şekil 27. Neubauer lamında hücre sayımı (<http://insilico.ehu.eus>. Erişim tarihi: 30.07.2015)

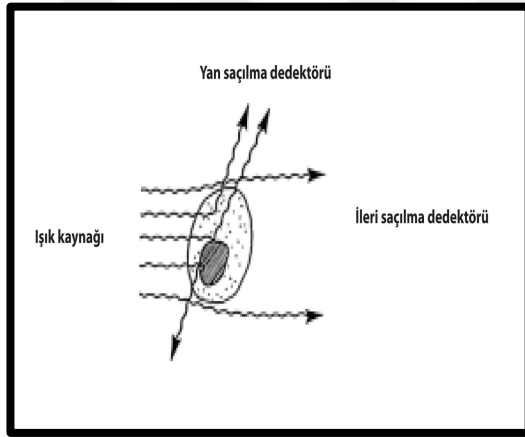
Her hasta için 1 pozitif kontrol serumu, 1 negatif kontrol serumu, 1 hasta serumu ve 1 hasta serumunun 1/4 sulandırılmış örneği için toplam 4 adet tüp hazırlanıp her hasta için kendi donör hücreleri ile çalışılacak ayrı pozitif ve negatif kontrol tüpleri kullanıldı. Flowsitometreye özgü olan tüplere belirtilen serumlardan 10 µL konuldu. Hazırlanmış olan lenfosit süspansiyonundan her tüpe 100 µL ilave edilerek düşük devirde 1-2 saniye vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Tüplere eşit miktarda PBS solüsyonundan ilave edilerek 1700 rpm’de 5 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonunda tüpler ters çevrilerek bir hareketle supernatant döküldü. Bu işlem ikinci kez tekrarlandı.

Hücre Boyama İşlemi:

CD3-PerCP, CD19-PE ve Antihuman IgG (Fab2)-FITC antikor solüsyonları soğuk platformda tutularak; CD3 ve CD19 antikor solüsyonlarından 10’ar µL, Antihuman IgG (Fab2) antikorundan 5 µL olmak üzere her bir tüpe konuldu. Düşük devirde 1-2 saniye vortekslenerek karanlık bir ortamda 25 dakika inkübe edildi. Tekrardan tüplere eşit miktarda PBS solüsyonundan ilave edilerek 1700 rpm’de 5 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonunda tüpler ters çevrilerek supernatant döküldü. Bu işlem ikinci kez tekrarlandı. Her bir hasta için tüpler, Beckman Coulter Navios EX flowsitometri cihazında okutularak Kaluza Versiyon 2.1 programında analiz edildi.



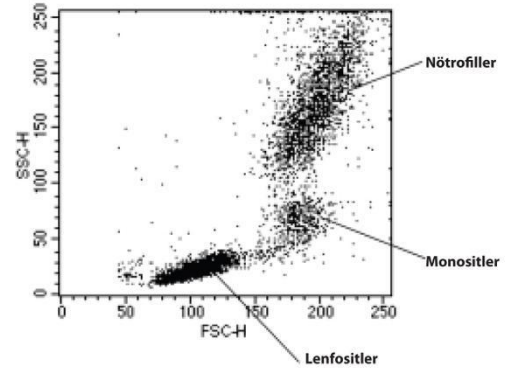
Resim 5. Kaluza versiyon 2.1 programı kullanılarak yapılan hasta flow analiz örneği.



Şekil 28. Flowsitometri çalışma mekanizması (<http://www.pages.drexel.edu/~bio/cores/cic/facs.html>'den değiştirilerek kullanılmıştır. Erişim tarihi: 2014).

Analizi değerlendirmek için; lenfosit gate ayarı ve kapılamanın uygun alındığı okutmada, her analizde elde edilen T hücre ve B hücre için kapılama yapıldı. Antihuman IgG-PE median

floresan yoğunluğu analiz edildi. Her analizde 20.000 hücre kaplandıktan sonra değerlendirme yapıldı. Elde edilen median floresan değerleri negatif kontrol tüpü median değeri ile oranlanarak hesaplandı.



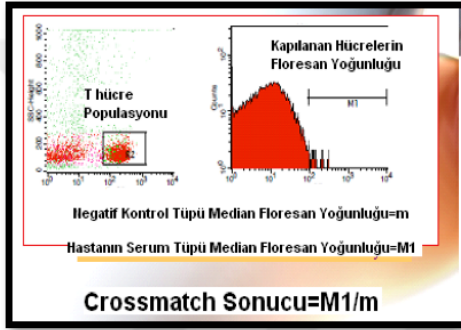
Şekil 29. Lenfosit kapılama analizi. SSC(Side scatter):Yan saçılma, FSC(Forward scatter):İleri saçılma. (<http://www.pages.drexel.edu/~bio/cores/cic/facs.html>'den değiştirilerek kullanılmıştır. Erişim tarihi: 2014).

T hücre (CD3) pozitifliği > 1,5 olarak; B hücre (CD19) pozitifliği > 2 olarak kabul

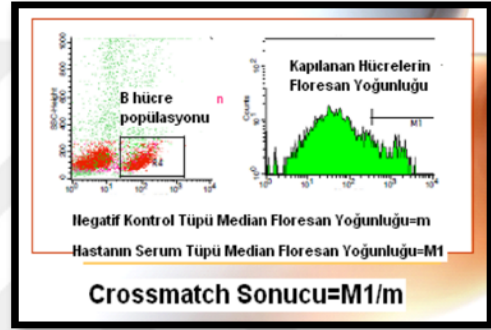
edilmiştir. Belirtilen hücrelerin ayrı ayrı X-Median değerleri analiz sonucu bulunarak her hasta için kabul edilen negatif tüpün X-median değerlerine oranlanmıştır.

$$\text{CD3 / CD19} = \text{X median (I) 1:1 hasta tüp} / \text{X median (I) negatif tüp}$$

Oran değerinin negatif kontrol değerinin 1,5 kat ve üzerinde olduğu ve negatif tüpteki değer 2 standart sapma fazlası olan analizler **pozitif** olarak değerlendirildi (Şekil 30 ve Şekil 31). Pozitif kontrol değeri negatif kontrolün 1,5 katı üzerinde reaksiyon göstermesi testin validasyonu açısından önemlidir.



Şekil 30. T Hücre Crossmatch Analizi.



Şekil 31. B Hücre Crossmatch Analizi.

11.10. İstatistiksel Analiz

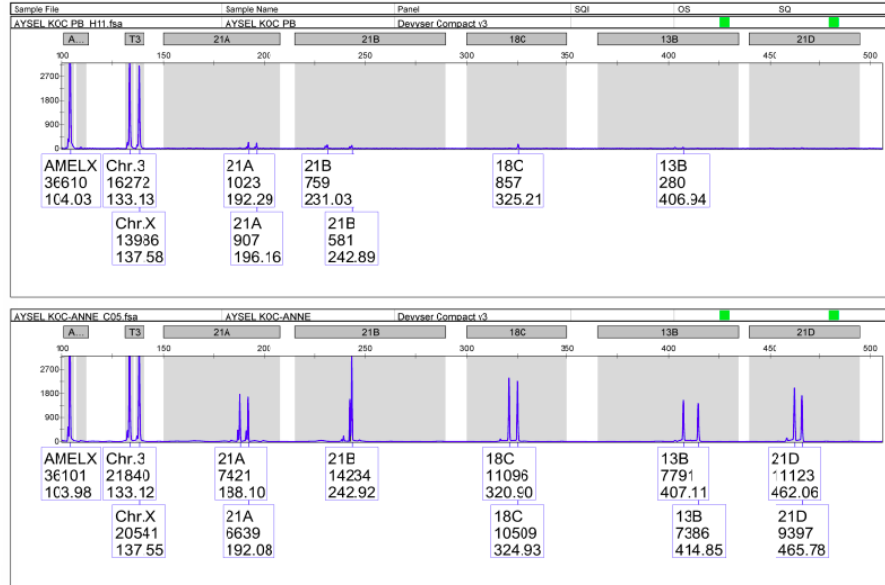
Çalışmamızda kullanılan yöntemlerden, istatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) programı (Kaysville, Utah, USA) kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, yüzde, minimum, maksimum) yanında, nicel verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ve grafiksel incelemeler ile sınanmıştır. Normal dağılım göstermeyen nicel değişkenlerin iki grup arası karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi; normal dağılım göstermeyen nicel değişkenlerin ikiden fazla grup arası karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis test ve Dunn-Bonferroni test kullanıldı. Nitel verilerin karşılaştırılmasında Fisher's exact test ve Fisher-Freeman-Halton exact test ile; nicel değişkenler arası ilişkilerin değerlendirilmesinde ise Spearman korelasyon analizi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

12. BULGULAR

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Poliklinikleri'ne, Eylül 2018 - Mayıs 2020 tarihleri arasında başvurmuş, %64,0'ü (n=16) tekrarlayan düşükleri olan, %36,0'sı (n=9) spontan düşükleri olan 16 hasta ve 9 gönüllü kontrol ile yapıldı. Olguların yaşları 21 ile 42 arasında değişmekte olup, ortalama $30,96 \pm 5,33$ yıldır.

Çalışmamızda biyokimyasal yöntemle, düşük sırasında alınan serum örneklerinden C3, C4, serbest T3, T4 ve TSH, Progesteron hormon değerleri öncelikli olarak çalışıldı. TSH ve Progesteron, Serbest T3, T4 parametreleri ECLIA (Enzim Kemilüminesans Immüno-Assay) metodu esaslı Beckman Coulter DXL 800 immün analizörlerde; C3, C4 ise Beckman Coulter AU5800 cihazı ile çalışılmıştır. Otoimmün bozukluk ve Rh uyumsuzluğu olmayan TGK hastalarımızda kontrollere göre artan C3 (n=1), C4 (n=), azalan C3 (n=1) seviyelerine rastlandı.

Çalışmanın özgünlüğü ve doğruluğu açısından, maternal kontaminasyon dikkate alınarak parafin bloklarından fetüse ait koryon villüs (CVS) işaretli bölgeler kazınarak DNA izole edilmiştir. Ardından PZR yöntemi ile kromozom anomalisini dışlayabilmemiz için ilgili bölgelere ait primerler ile yapılan QF fragman analizleri değerlendirilmiştir (Resim 6.). QF fragman analizi ile Down sendromlu gebelikler için kromozom 21'in kopya sayısı belirlenmiş ve ayrıca kromozom 13, 18 ve cinsiyet kromozomları için ek problemler kullanılarak sırasıyla Patau sendromu (trizomi 13), Edwards sendromu (trizomi 18) ve cinsiyet kromozomu anöploidi riski değerlendirilmiştir. Analizleri tamamlanan olgu grubumuzda, kontaminasyonun dışlanamadığı hastalar değerlendirme dışı bırakılmıştır. Ancak maternal kontaminasyon olmayan hastalarda herhangi bir kromozom anomalisi gözlemlenmemiştir.



Resim 6. Aynı markörler için anne ve fetus QF-PZR analizi karşılaştırılması. Üst diagram fetus, alttaki diagram anne STR bulgularını göstermektedir.

Vakalardan düşük yaptıkları sırada alınan serumları ve kan vermeyi kabul eden eşlerinden yeşil tüpe alınan kanları ile flowsitometrik cross-match (FCXM) analizi, tekrarlayan düşükleri olan 8 hastada tamamlandı. Bu analiz, hasta sayısının yetersizliğinden dolayı tanımlayıcı bir bulgu olarak değerlendirildi (Resim 5). Fetus reddinde katkısı olabileceği düşünülen reaksiyonların öngörülmesi için yapılan cross-match analizleri sonucunda tekrarlayan düşüğü olan hastaların eşlerine karşı duyarlılaşma reaksiyonları olduğuna dair bulgu saptanmamıştır.

Tablo 12. Gruplara Göre Demografik Özelliklerin Dağılımı

		Gruplar			p
		Toplam	Kontrol (n=9)	Hasta (n=16)	
Yaş	Min-Maks	21-42 (30)	21-39 (30)	27-42 (29,5)	^a 0,887
	(Medyan)				
	Ort±Ss	30,96±5,33	30,11±6,83	31,44±4,47	
Gebelik Sayısı	Min-Maks	1-12 (4)	1-5 (3)	2-12 (4,5)	^a 0,006**
	(Medyan)				
	Ort±Ss	4,6±2,61	2,89±1,36	5,56±2,68	
Gebelik Gün Sayısı	Min-Maks	55-157 (89)	59-157 (108)	55-136 (73)	^a 0,066
	(Medyan)				
	Ort±Ss	91,17±30,77	109±35,09	81,67±24,36	
Düşük Zamanı	Min-Maks	7,9-22,4 (12,7)	8,4-22,4 (15,4)	7,9-19,4 (10,4)	^a 0,066
	(Medyan)				
	Ort±Ss	13,02±4,39	15,56±5,02	11,67±3,46	

^aMann Whitney U Test

**p<0,01

Hasta grubu olguların gebelik sayısı, kontrol grubu olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ($p=0,006$; $p<0,01$). Ancak gruplara göre olguların yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0,887$; $p>0,05$). Gruplara göre olguların gebelik gün sayıları ve düşük zamanları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Ancak $p=0.06$ düzeyinde gebelik süresinin hasta grubunda daha kısa olduğu saptanmıştır.

Tablo 13. Gruplara Göre Tanımlayıcı Özelliklerin Dağılımı

		Gruplar			<i>p</i>
		Toplam	Kontrol	Hasta	
		n (%)	n (%)	n (%)	
İlaç Kullanımı	Yok	16 (64,0)	8 (88,9)	8 (50,0)	<i>^b0,088</i>
	Var	9 (36,0)	1 (11,1)	8 (50,0)	
	Folat	3 (12,0)	1 (11,1)	2 (12,5)	
	Aspirin	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (6,3)	
	Clexane, Aspirin	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (6,3)	
	Clexane, Aspirin ve Prednol	2 (8,0)	0 (0,0)	2 (12,5)	
	Progestan	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (6,3)	
	Clexane, Coumadin	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (6,3)	
Cerrahi Özgeçmiş	Yok	13 (52,0)	7 (77,8)	6 (37,5)	<i>^b0,097</i>
	Var	12 (48,0)	2 (22,2)	10 (62,5)	
	Kolesistektomi	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (6,3)	
	Salpenjektomi	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (6,3)	
	Tonsilektomi	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (6,3)	
	Mitral kapak replasmanı	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (6,3)	
	Sezaryen	6 (24,0)	1 (11,1)	5 (31,3)	
	Kist operasyonu	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (6,3)	
	Rinoplasti	1 (4,0)	1 (1,0)	0 (0,0)	
Medikal Özgeçmiş	Yok	19 (76,0)	9 (100,0)	10 (62,5)	<i>^b0,057</i>
	Var	6 (24,0)	0 (0,0)	6 (37,5)	
	Oligomenore	2 (8,0)	0 (0,0)	2 (12,5)	

	Lumbal herni	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (6,3)	
	Mthfr gen mutasyonu	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (6,3)	
	Penisilin avigen				
	Buscopan-avil-parol				
	alerjileri	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (6,3)	
	Romatizmal kalp				
	hastalığı	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (6,3)	
Kan Grubu	0 Rh (-)	1 (4,0)	1 (11,1)	0 (0,0)	^c0,610
	0 Rh (+)	7 (28,0)	2 (22,2)	5 (31,3)	
	A Rh (-)	1 (4,0)	1 (11,1)	0 (0,0)	
	A Rh (+)	11 (44,0)	4 (44,4)	7 (43,8)	
	B Rh (+)	3 (12,0)	1 (11,1)	2 (12,5)	
	AB Rh (+)	2 (8,0)	0 (0,0)	2 (12,5)	
Akraba	Yok	14 (60,9)	4 (50,0)	10 (66,7)	^b0,657
	Var	9 (39,1)	4 (50,0)	5 (33,3)	

^bFisher's Exact Test

^cFisher Freeman Halton Test

Gruplar arasında ilaç kullanma oranları, cerrahi ve medikal özgeçmiş görülme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

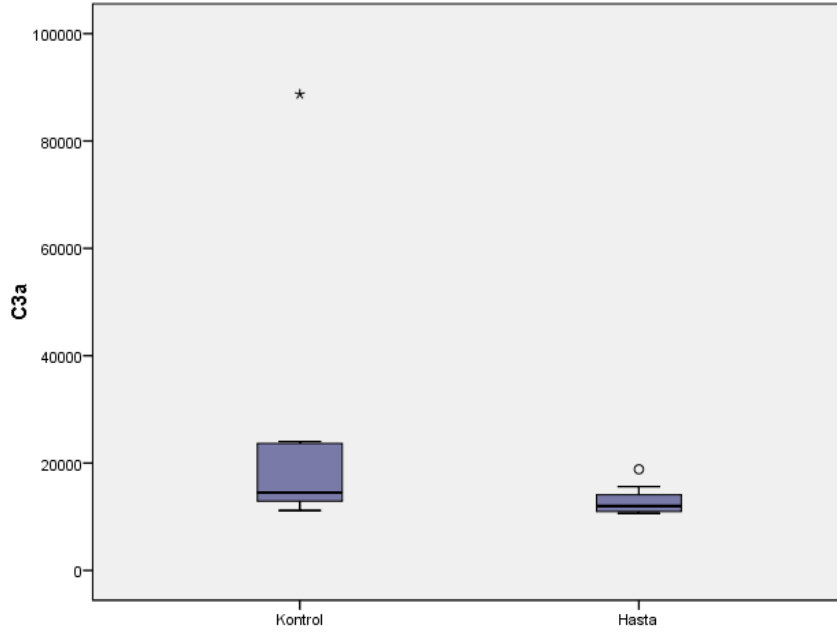
Buna ek olarak, gruplara göre olguların kan gruplarının dağılımları ve akraba evliliği oranları arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 14. Gruplara Göre Laboratuvar Bulgularının, ELISA ile Çalışılan Parametrelerin ve Kompleman Düzenleyici Genlerin Değerlendirilmesi.

		Gruplar			p
		Toplam	Kontrol (n=9)	Hasta (n=16)	
Progesteron	<i>Min-Maks (Medyan)</i>	1,84-13,1 (4,64)	2,12-10,9 (4,77)	1,84-13,1 (3,6)	^a 0,455
	<i>Ort±Ss</i>	5,86±3,78	6,6±3,46	5,49±4	
TSH	<i>Min-Maks (Medyan)</i>	0,43-3,8 (1,45)	0,43-3,42 (1,93)	0,69-3,8 (1,22)	^a 0,280
	<i>Ort±Ss</i>	1,7±0,94	1,97±1,06	1,52±0,85	
T3	<i>Medyan</i>		3,4 (3,1-3,7)	3,5 (2,9-4)	^a 0,914
	<i>Ort±Ss</i>		3,37±0,39	3,56±0,83	
T4	<i>Min-Maks (Medyan)</i>	0,54-1,09 (0,82)	0,63-1,09 (0,75)	0,54-1,06 (0,82)	^a 0,536
	<i>Ort±Ss</i>	0,81±0,14	0,79±0,15	0,83±0,14	
C3	<i>Min-Maks (Medyan)</i>	0,83-1,88 (1,36)	1,19-1,75 (1,36)	0,83-1,88 (1,31)	^a 0,589
	<i>Ort±Ss</i>	1,39±0,28	1,42±0,18	1,37±0,34	
C4	<i>Min-Maks (Medyan)</i>	0,12-0,56 (0,3)	0,14-0,35 (0,29)	0,12-0,56 (0,31)	^a 0,315
	<i>Ort±Ss</i>	0,31±0,12	0,27±0,07	0,34±0,13	
C3a	<i>Min-Maks (Medyan)</i>		11180-88710 (14510)	10670-18850 (11985)	^a 0,039*
	<i>Ort±Ss</i>	10670-88710 (13080)	24136,67±24668,93	12815,63±2279,22	
C5a	<i>Min-Maks (Medyan)</i>	30,29-278,61 (38,98)	33,89-278,61 (41,14)	30,29-56,12 (37,71)	^a 0,089
	<i>Ort±Ss</i>	51,7±48,43	73,6±78,28	39,39±5,93	
ATA	<i>Min-Maks (Medyan)</i>	4,58-37,25 (5,6)	4,65-37,25 (5,63)	4,58-7,43 (5,19)	^a 0,157
	<i>Ort±Ss</i>	6,95±6,43	9,74±10,44	5,37±0,81	
ΔΔCt CD46	<i>Min-Maks (Medyan)</i>	-2,86-4,65 (-0,5)	-2,19-4,65 (-0,98)	-2,86-2,36 (-0,45)	^a 0,713
	<i>Ort±Ss</i>	-0,32±1,66	0±2,1	-0,5±1,41	
ΔΔCt CD55	<i>Min-Maks (Medyan)</i>	-11,08-6,11 (-3,83)	-5,36-4,13 (2,04)	-11,08-6,11 (-5,57)	^a 0,036*
	<i>Ort±Ss</i>	-2,86±5,28	0±4,08	-4,46±5,3	
ΔΔCt CD59	<i>Min-Maks (Medyan)</i>	-3,94-5,37 (0,39)	-0,92-0,79 (0,07)	-3,94-5,37 (0,57)	^a 0,336
	<i>Ort±Ss</i>	0,21±1,96	0±0,61	0,33±2,43	
^a Mann Whitney U Test		*p<0,05			

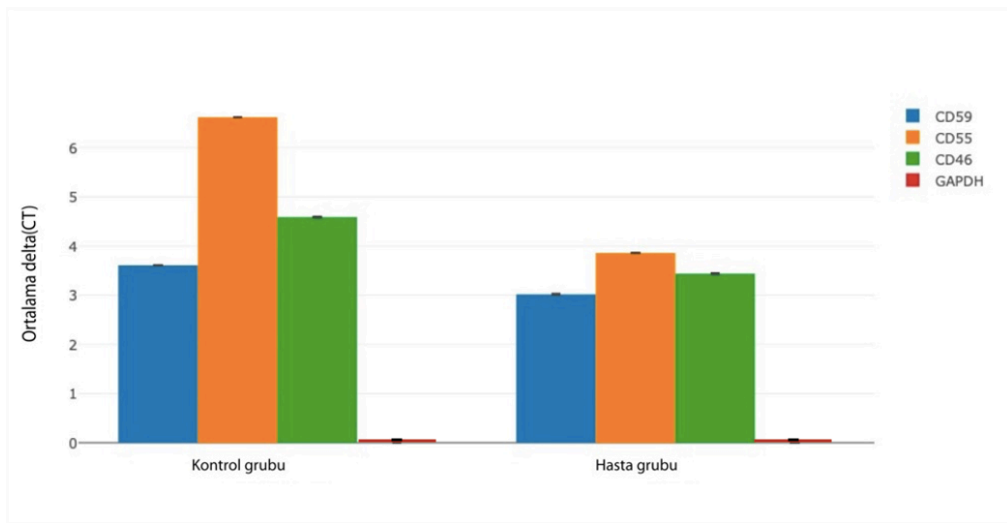
ELISA yöntemiyle analiz edilen serum kompleman faktörleri olan C3a, C5a ve ATA analizleri sonucunda; hasta grubu olguların C3a değeri, kontrol grubu olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde **düşük** saptanmıştır (p=0,039; p<0,05). Buna ek

olarak, C5a düzeyinin sınırda istatistiksel anlamlılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p=0,089$).

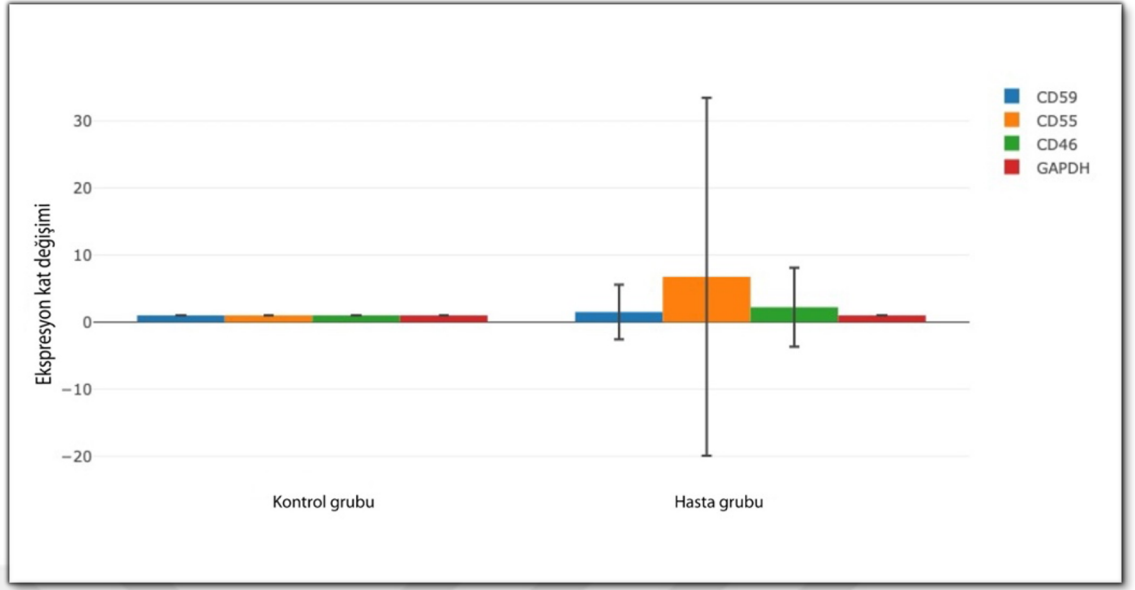


Şekil 35. Gruplara göre C3a dağılımı ($p<0,05$).

Ct seviyeleri, numunedeki hedef nükleik asit miktarı ile ters orantılıdır (Ct seviyesi ne kadar düşükse, numunedeki hedef nükleik asit miktarı o kadar büyüktür). Buna göre Ct değeri bir genin ekspresyonuna özgü iken; delta Ct, hedef gen ile referans gen arasındaki ekspresyon farkını göstermektedir (Şekil 32 & 33).

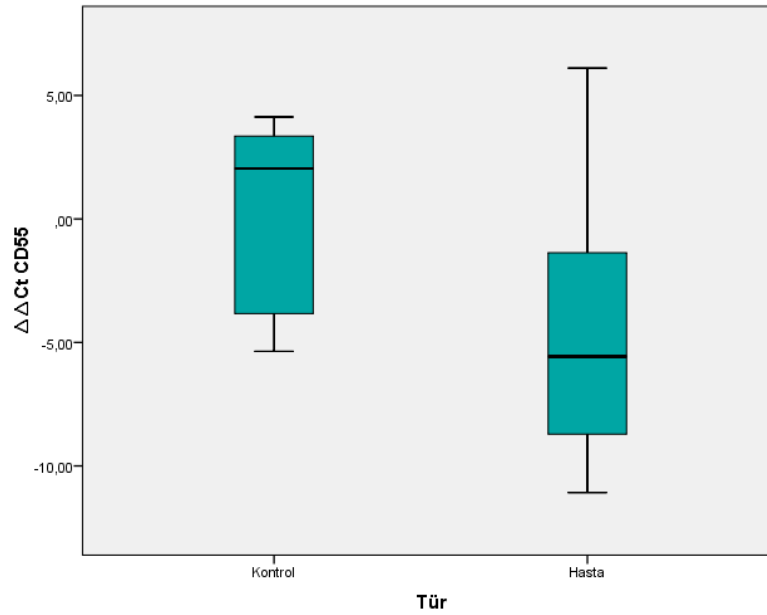


Şekil 32. Ekspresyon analizi yapılan hedef kompleman CD59, CD55, CD46 düzenleyici genlerin sütun grafiği.



Şekil 33. Hedef genlerin ekspresyon değişimini gösteren sütun grafiği.

İstatistiksel veri analizi sonucunda, hasta grubu olguların $\Delta\Delta Ct$ CD46 ve $\Delta\Delta Ct$ CD59 ölçümleri, istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p>0,05$) göstermemiş olup $\Delta\Delta Ct$ **CD55 değeri**, kontrol grubu olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde **yüksek** saptanmıştır ($p=0,036$; $p<0,05$).



Şekil 34. Gruplara göre $\Delta\Delta Ct$ CD55 dağılımı ($p<0,05$).

Tablo 15. Düşük Sayısına İlişkin Farklı Değişkenlerle İlgili Korelasyon Analizleri.

Düşük Sayısı		
	r	p
Yaş	-0,060	0,774
Gebelik Sayısı	0,733	0,001**
Progesteron	-0,297	0,191
TSH	-0,254	0,281
T4	0,037	0,876
C3	0,114	0,632
C4	0,291	0,214
C3a	-0,371	0,068
C5a	-0,290	0,160
ATA	-0,305	0,138
ΔΔCt CD46	0,153	0,465
ΔΔCt CD55	-0,375	0,064
ΔΔCt CD59	0,133	0,525
<i>r=Spearman's Korelasyon Katsayısı</i>		**p<0,01

Olguların yaşları ile düşük sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamış ($p>0,05$) olup; gebelik sayısı ile düşük sayısı arasında pozitif yönlü (gebelik sayısı arttıkça düşük sayısı artan) 0,733 düzeyindeki güçlü ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($r=0,733$; $p=0,001$; $p<0,01$). C3a ve $\Delta\Delta\text{Ct}$ CD55 düzeyleri ile düşük sayısı arasında istatistiksel anlamlılık göstermeyen ancak anlamlılık düzeyine yaklaşan negatif yönlü bir ilişki saptanmıştır ($p=0,06$).

Buna ek olarak çalışmaya katılan olguların progesteron, TSH, serbest T3, T4, C3, C4, C5a, ATA, $\Delta\Delta\text{Ct}$ CD46 ve $\Delta\Delta\text{Ct}$ CD59 ölçümleri ile düşük sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 16. Medikal Özgeçmiş, Cerrahi Özgeçmiş, Kan Grubu ve Akraba Evliliği Varlığına Göre Düşük Sayılarının Değerlendirilmesi

		Düşük Sayısı		
		Min-Maks (Medyan)	Ort±Ss	p
Medikal Özgeçmiş	Yok (n=19)	1-9 (2)	2,21±1,96	^a 0,019*
	Var (n=6)	2-9 (4)	4,83±3,06	
Cerrahi Özgeçmiş	Yok (n=13)	1-9 (1)	3,15±3,24	^a 0,498
	Var (n=12)	1-5 (2)	2,50±1,31	
Kan Grubu	0 (n=8)	1-9 (2)	3,00±2,78	^d 0,343
	A (n=12)	1-5 (2)	2,00±1,21	
	Diğer (n=5)	1-9 (3)	4,60±3,65	
Akraba Evliliği	Yok (n=14)	1-9 (2)	3,36±2,98	^a 0,280
	Var (n=9)	1-5 (2)	2,00±1,32	

^aMann Whitney U Test

^dKruskal Wallis Test

*p<0,05

Medikal özgeçmiş olan (oligomenore, lumbal herni, mthfr gen mutasyonu, penisilin avigen, buscopan-avil-parol alerjileri, romatizmal kalp hastalığı) olguların düşük sayısı, medikal özgeçmiş olmayan olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p=0,019; p<0,05).

Cerrahi özgeçmiş varlığına ve kan grubuna göre, olguların düşük sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05).

13. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yirminci gebelik haftası öncesindeki 2 ya da daha fazla kayıp olarak tanımlanan idiyoPATİK tekrarlayan gebelik kayıpları üreme çağındaki kadınların yaklaşık %2'sini etkileyen bir problemdir. Açıklanamayan tekrarlayan düşüklerin insidansını; düşük sayısı, düşük türleri ve anne yaşı başta olmak üzere birçok faktör insidansını etkilediği bilinmektedir. Ancak, bu etiyolojik faktörler öne sürülmüş olsa da altta yatan patofizyolojik mekanizmalar karşılaşılan vakaların yarısında henüz aydınlatılamamaktadır. (Kar ve B., 2017; Saravelos ve Regan, 2013; Vettriselvi ve ark., 2008).

Tekrarlayan düşüklerin maternal yaşa göre insidansları Saravelos ve Regan'ın araştırmalarında Şekil 36.'daki gibi verilmiştir. Bizim olgularımızın yaşları bu aralıkta bulunmakta olduğundan çalışma grubumuzda heterojen bir popülasyon kullanılmıştır.

Anne yaşına göre teorik RPL insidansı (2 gebelik kaybı)	
Anne Yaşı	RPL insidansı
20	1/85
25	1/70
30	1/45
35	1/16
40	1/4
45	1/2

Şekil 36. Tekrarlayan gebelik kayıpları ve maternal yaş ilişkisi (Saravelos ve Regan, 2013'ten değiştirilerek kullanılmıştır.).

Çalışmamızda, merkezimizde düşük yapan hasta sayısı başlangıçta kırk kişi iken, bazı hastalar çalışma dışı bırakılmıştır. Olgularımızda düşüğün gerçekleşme zamanı 5. ve 20. haftalar arasındadır.

On haftalık gebelik sonrası, gebelik kayıplarının yaklaşık% 2 ila% 3'ü tahmin edilebilmektedir ve bunların yalnızca % 5 - 6'sı sayısal sitogenetik hatalardan kaynaklanmaktadır (Sierra ve Stephenson, 2006). Bu sitogenetik düzensizlikler her zaman düşük materyalinden kromozom elde edilemediğinden geleneksel karyotip analizi ile gerçekleştirilememektedir. Bu amaçla düşük materyali yetersiz olan ya da kromozom eldesi için kültüre uygun olmayan hastalarda QF-PZR alternatif olarak

kullanılmaktadır. Ancak QF-PZR, markörlerin hedef sekansının dışında kalan kromozomal değişiklikleri ve dengeli yeniden düzenlenmeleri tespit edememektedir. Anöploidi vakalarında, anormalliği karakterize etmek ve risk belirlemek için karyotip analizi gereklidir. Kısmi monozomi ve düşük seviyeli mozaik durumlar tespit edilemeyebilir. CVS örneklerinde plasental mozaizm nedeniyle nadiren tamamen tutarsız QF-PZR ve karyotip sonuçları bildirilmiştir (Allen, 2006; Waters, 2006; Waters, 2007; Holgado, 2011). Bu vakaların çoğunda CVS numunesinin küçük veya sınırlı bölgelerinin QF-PZR testi gerçekleştirilmiştir ve sonuç ağırlıklı olarak sitotrofoblast malzemesini temsil edebilir (Mann ve ark., 2018). Bu şekilde çalışmamızda hedefe yönelik kromozomal düzensizliklerin doğru olarak saptanabilmesi için düşük materyallerimizin parafin bloklarından **yalnızca fetüse ait** olan bölgeleri kullanılarak analiz yapılmıştır.

İmmünolojik anormalliklerden dolayı bozulan tolerans mekanizmaları, embriyonun reddedilmesine yol açabilmektedir. Tekrarlayan gebelik kayıpları, bağışıklık sistemi yanıtlarında oluşan bozukluklar nedeni ile gelişebilir. Çeşitli çalışmalarda tekrarlayan düşükler için bahsedilen farklı etiyolojiler ışığında, immünolojik anormallikler yadsınamaz bir rol oynamaktadır. Erken embriyo tarafından eksprese edilen paternal antijenler, maternal bağışıklık sisteminin yanıt vermesine neden olduğundan, bağışıklık yanıtının yabancı antijenleri tolere etmesi açısından düzenleyici mekanizmalar gereklidir (Vahid ve ark., 2018)

Anti-paternal non-HLA-spesifik antikorların, trofoblasta karşı patolojik bir humoral bağışıklık yanıtı yansıttığı ve tekrarlayan gebelik kaybına neden olabileceği ileri sürülmüştür. HLA-negatif sinsitiyotrofoblast membranlar ile yüksek oranda çapraz reaksiyona giren anti-paternal antikorların (APA), tekrarlayan gebelik kaybı (RPL) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Rogenhofer ve ark., 2008). Bu yüzden çalışmamızda, anti-paternal çapraz reaksiyon girme analizine de yer verilmiştir. Olgularımızın bir kısmı için farklı nedenlerden dolayı Flow-sitometri analizi gerçekleştiremememize rağmen, çalışmaya aldığımız hasta grubumuzda anti-HLA açısından fetal redde neden olabilecek pozitiflik gözlemlemedik. Reaktiviteye neden olabilecek başka antijenlerin değerlendirilememiş olması ve örnek sayısı kısıtlılığı da olsa incelediğimiz kadarıyla antikorların, olgularımızın düşük sebeplerinden olmadığı fikrindeyiz. Lashley ve ark.'nın meta-analiz çalışmasında, gebelik komplikasyonları üzerinde HLA sınıf I

ve/veya II antikorlarının anlamlı bir etkisini bulamamışlardır. Dahil edilen çalışma gruplarının hem klinik hem de istatistiksel yönden yüksek heterojenite gösterdiği ve bulguların daha büyük çalışma gruplarında bakılması gerektiği belirtilmiştir (Lashley ve ark., 2013).

Rogenhofer ve ark.'nın yaptığı çalışmada, yirminci gebelik haftasından önce ardışık iki veya daha fazla idiyopatik tekrarlayan düşük öyküsü olan doksan iki hasta incelenmiş olup anti-paternal antikorların saptanması için bizim çalışmamızdaki gibi FCXM (Flow-sitometrik cross-match) yöntemi kullanılmıştır (Rogenhofer ve ark., 2008). Ayrıca, anti-paternal allo-antikorlar için ekonomik açıdan daha iyi bir alternatif tarama yöntemi olarak görülen OLATT(ELISA-One Lambda Antijen Tray Testi) yöntemi ile karşılaştırma yapılmıştır. Çalışmada, FCXM'ye göre negatif, OLATT'a göre pozitif görünen RPL hasta popülasyonunun yalnızca anti-HLA reaktif olarak tanımlanacaklarından, önemli bir klinik sorun olmadığını öne sürmüşlerdir. Aksine, OLATT negatif, FCXM'ye göre pozitif olan grup için % 20'sinin spesifik bir klinik alt grubu temsil edebileceği belirtilmiş; bu hastaların HLA için spesifik olmayan paternal lenfositlere karşı antikorlara sahip olması neden gösterilmiştir (Rogenhofer ve ark., 2008). Matsubayashi ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, pozitif FCXM; canlı doğum olmaksızın üç veya daha fazla açıklanamayan ilk üç aylık düşük öyküsü olan yüz elli sekiz hastada immünoterapiyi takiben başarılı gebelik sonucu ile yakından ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, FCXM negatif hastaların yaklaşık % 75,6'sının hesaplanan prediktif değere göre daha sonra düşük yapacağını vurgulamışlardır. Bu durum, immünoterapiden sonra FCXM negatif hastaların daha dikkatli bir şekilde yönetilmesi ve kapsamlı bir şekilde incelenmesi gerektiğini göstermektedir. İmmünolojik anormalliğin neden olabileceği tekrarlayan düşük ile organ greftlerinin reddedilmesi arasındaki ilişki göz önüne alındığında, maternal immün yanıtlarının izlenmesinin son derece önemli olduğu ve çalışmada FCXM'nin tekrarlayan düşüklerin önlenmesi için rutin laboratuvar testlerine dahil edilebileceği vurgulanmıştır (Matsubayashi ve ark., 2000). Gilman-Sachs ve arkadaşları da çapraz karşılaştırması pozitif çiftlerin, bir mikrositoksisite deneyine kıyasla FCXM ile iki kat daha fazla tanımlanabileceğini göstermişlerdir (Gilman-Sachs ve ark., 1989).

Olguların eşlerine karşı geliştirdikleri reaksiyonların öngörülebilmesi için yaptığımız bu çalışmada paternal T ve B lenfositleri yüzeyindeki HLA sınıf I ve II antijenleri

hedeflenerek analiz yapılmıştır. Sonuçlar sensitizasyon nedenli çapraz reaksiyon göstermese bile, lenfosit yüzeyinde eksprese olmayan paternal antijenlerin sebep olduğu bir reaksiyon gerçekleşmiş olabilir. İleriki çalışmalarda HLA dışı paternal antijenlere karşı yapılacak çalışmaların göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Normal gebelik sırasında plasentaya yönelik reaktif bir antikor, ATA, üretimi istenmeyen bir bağışıklık yanıtı oluşturabilir (Davies ve Browne, 1985). Tedesco ve arkadaşları (1997), tekrarlayan düşüğü olan kadınların % 50'den fazlasının ATA ürettiği, kontrollere kıyasla ağırlıklı olarak IgG ürettiğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda ATA seviyelerinde, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

İlk olarak 19. yüzyılın sonlarında Paul Ehrlich, Jules Bordet ve George Nuttall gibi önde gelen mikrobiyologlar tarafından tanımlanan (Ehrnthaller ve ark., 2011) kompleman (tarihsel terim alexinin yerini almıştır) sistemi adını, ısıya dayanıklı bir antikorun konağın korunmasındaki ve bakterilerin parçalanmasındaki rolü üzerine “tamamlama“ yeteneği nedeniyle almıştır. Homestaz ve normal gelişimde önemli rol oynayarak güçlü enzimatik aktivitesi ile savunma görevi görür. İlk başlarda sadece hümmoral bir komponent olduğu varsayılan kompleman sistemi daha sonradan hücre dışı bir sistemin ötesinde görülmeye başlamıştır. Normal bir gebeliğin düzenlenmesine yardımcı olan bu sistemin kontrolü, yarı-allojenik fetüsün reddini önlemek için ve normal plasental ve fetal gelişim için gereklidir. Tekrarlayan gebelik kayıpları, erken doğum, preeklampsi gibi gebelik bozukluklarında kompleman sisteminin düzensizliğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Girardi ve ark., 2020).

Zhao ve arkadaşları 2018’de, kompleman faktörleri ve tekrarlayan düşük arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Vaka grubu olarak açıklanamayan düşükleri bulunan otuz beş kadının atık plasenta dokusu ile; kontrol grubu olarak kendi istekleri ile gebelikleri sonlandırılmış, spontan düşük öyküsü olmayan kırk kadının plasenta dokuları karşılaştırılmıştır. Bulgulara göre, fetö-maternal arayüzde C4d kompleman faktörünün önemli ölçüde biriktiği ve bunun fetüse olan anormal bağışıklığı yansıttığı gösterilmiştir. Çalışmamızda C4d yerine maternal serum C3, C4, C3a ve C5a ve ATA faktörlerine bakılarak maternal kaynaklı kompleman aracılı hasar mekanizmasının aydınlatılması hedeflenmiştir.

Preeklampsili hastalarda bakılan kompleman aktivasyon ürünleri, C3a, C5a ve SC5b-9 serum seviyelerinde artmış olarak bulunmuş olup kompleman aktivasyon ürünleri de şiddetli preeklampsia kliniği olan hastaların idrarında tespit edilmiştir (Chighizola ve ark., 2020). C3 ve C5 konvertaz oluşumlarında rol oynayan C3a ve C5a plazma anafilatoksinleri, normal gebeliklerde, hamile olmayan kadınlara kıyasla daha yüksek düzeydedir. Kompleman aktivasyonu, gebelik komplikasyonlarının patogeneğinde rol oynadığında, kompleman yıkım ürünlerinin normal gebelikte olduğundan daha yüksek olması beklenmektedir (Girardi, 2017). Lynch ve arkadaşları, gebeliğin erken evresindeki alternatif yol aktivasyonunun bir göstergesi olarak Bb'nin ve bir diğer kompleman ürünü olan C3a'nın artmış seviyelerini olumsuz gebelik sonuçları ile ilişkilendirirken C5a'yı anlamlı bulamamışlardır (Lynch ve ark., 2011). Bizim olgularımızda ise, hasta grubumuzun C3a ($p=0,039$) düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmış olmakla birlikte, C5a düzeylerinde istatistiksel anlamlılık göstermeyen sınırdaki bir farklılık saptanmıştır ($p=0,089$). Bir başka çalışmada, kandaki kompleman bölünmüş proteinlerin ifadesi ve feto-maternal arayüzdeki kompleman inhibitör proteinleri analiz edildiğinde spontan düşük vakalarında, C5a düzeyinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (Kar ve B, 2017). Aşırı kompleman aktivasyonunu ve özellikle C5a üretimi, bozulmuş anjiyogenez ve olumsuz gebelik sonuçları ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Girardi, 2018).

Banadakoppa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, spontan düşük vakalarını, yirminci olan istemli düşüklerle karşılaştırdığında C3a seviyelerinde artış görülmezken; C5a düzeylerinin plazmada artmış, C5a proteininin ise azalmış olduğunu saptamışlardır (Banadakoppa ve ark., 2014). Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise TGK olgularında C3a, C4a ve C5a'nın normal C3 seviyelerine sahip kontrollerden ayıracak kadar hassas olup olmadığını belirlemek için 120 kontrol ve normal C3 seviyelerine sahip 89 TGK hastası arasında C3a, C4a ve C5a plazma seviyeleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda C3a seviyeleri, normal C3 düzeyine sahip TGK olan hastalarda kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuş olup kompleman aktivasyon fragmanı C3a'nın, normal C3 seviyeleri olan TGK olan çalışma grupları için hassas bir biyobelirteç olabileceği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2017 ; Girardi, 2017).

Zhao ve arkadaşları, RSA fare modelinde, C5a komplemanın aktivasyonunun, plasentada patolojik değişikliklere yol açan temel bir ara aktivite olduğunu belirtmişlerdir. Bazı bilim insanları, hamileliğin seçici olarak sonlandırıldığı hastalarla karşılaştırıldığında, RSA hastalarında plazma C5a seviyelerinin önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ve desidua dokusunda büyük miktarda kompleman C5a birikimi olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar C5a'nın aşırı aktivasyonunun plasentadaki tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) düzeyini artırabileceğini ve inflamatuvar hasar oluşturmak için maternal-fetal arayüzdeki nötrofilleri harekete geçirebileceğini bulmuşlardır (Zhao ve ark., 2018). APS'li kadınlarda da yüksek plazma C5b-9 kompleksi ve C5a düzeyleri, olumsuz gebelik sonuçlarının ilk işareti olarak düşünülmektedir (Scambi ve ark., 2019; Denny ve ark., 2012). Ancak çalışmamızda hastaların düşük sırasında alınan serum örneklerinden ELISA ile C3a, C5a ve ATA'ya ek olarak biyokimyasal yöntemle serum kompleman ürünleri olan C3 ve C4 seviyeleri de analiz edilmiştir.

Ahmad ve arkadaşları 2018'de yaptıkları ve hastaları üç gruba; spontan abort, hamile olan ve hamile olmayan şeklinde ayırarak inceledikleri çalışmada; C3 ve C4 seviyelerinin düşük yapanlarda kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha az olduğunu tespit etmişlerdir. Normal hamile ve hamile olmayan gruplara kıyasla, spontan düşüğü olan kadınların ortalama serum IgG immünoglobulin düzeylerinin önemli ölçüde arttığı ortaya koyulmuştur ($p \leq 0.05$). Bunun sonucuna göre, serum kompleman proteinlerinin (C3 ve C4) normal gebelikte iyi bir savunma hattı olduğunu, kompleman elementlerin aktivasyonunun spontan abortu tetikleyebileceğini ve immünoglobulinlerin düşüğün indüklenmesinde küçük de olsa bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır (Ahmad ve ark., 2018).

Normal gebeliklerde aşırı kompleman aktivasyonu, hem trofoblast membranlarında yüksek oranda eksprese edilen kompleman düzenleyici proteinler (CD46, CD55 ve CD59) hem de dolaşımdaki kompleman düzenleyici proteinler (CFH, C4b- bağlayıcı protein ve CFI) tarafından önlenmektedir. Lynch ve Salmon, kompleman düzenleyicilerin anormal fonksiyonunun preeklampsiye yatkınlık oluşturabileceğini öne sürmüştür (Lynch ve Salmon, 2010). Çalışmamızda, olası kompleman hasarını önlemek amacıyla, hasta grubunda kontrol grubuna göre artan CD55 ($p > 0.05$) ekspresyonu saptanmıştır. Buna göre kompleman düzenleyici bu genin mekanizmada

aşırı aktivasyonu ile birlikte anormal eksprese olmasının tekrarlayan düşüklere neden olduğu düşünülmektedir.

Young ve ark., Mirkin ve ark., Talbi ve ark., tarafından, insan endometriyumunda özellikle CD55'in en yüksek düzeyde eksprese olan genler arasında olduğu bildirilmiştir (Young ve ark., 2002; Mirkin ve diğerleri, 2005; Talbi ve diğerleri, 2006). Wirstlein ve arkadaşlarının çalışma bulgularına göre; Western blot analizi kullanarak saptadıkları plasenta CD46 ve CD55 protein seviyelerini APS hastalarının plasentalarında kontrol grubundakilere göre daha yüksek (her ikisi için $p < ,001$) bulmuşlardır. Dolayısıyla plasentalarda CD46 ve CD55 ekspresyonunu arttıran bir mekanizma olduğunu öngörerek; APS trombofilisinde bulunan pro-inflamatuar sitokinlere işaret etmişlerdir (Wirstlein ve ark., 2012). Scambi ve arkadaşları, CD55'in, aksine APS'li kadınların plasentasında azaltıcı yönde düzenlendiğini belirtmişlerdir (Scambi ve ark., 2019). Bu çalışmalar ile çalışmamız karşılaştırıldığında; hedef hasta gruplarının farklı olması nedeniyle sitokin artışının gerçekleşmesi ve kompleman doku hasarının gelişmesi ile desiduada CD55 ekspresyonunun arttığı düşünülebilir. Scambi ve arkadaşlarının çalışmalarındaki ve çalışmamızdaki hastalarda gebelik haftalarının farklılığı ve yine hastaların APS zemininde araştırılmış olması da bu sonuçlara yansımış olabilir.

Cunningham ve Tichenor, hipokomplementemi^{4*} ile ilişkili tekrarlayan spontan düşüklere elde edilen trofoblastları incelemişlerdir. Trofoblastlarda DAF / CD55 ekspresyonunda önemli bir azalma olduğunu ve kompleman aktivasyonunun önlenememesi nedeniyle düşükle sonuçlandığını belirtmişlerdir (Cunningham ve Tichenor, 1995). Bir diğer çalışmada, erken gebelik embriyo kayıplarının % 20'sinin hipokomplementemi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Zhao ve ark., 2018; Chighizola ve ark., 2020). Banadakoppa ve arkadaşları (2014) ise spontan düşük sonrası insan plasentasında, kompleman düzenleyiciler olan hem CD46 hem de CD55'te önemli bir azalma ve ardından kompleman aktivasyonunda bir artış tanımlamışlardır. Başka bir çalışmada, spontan düşük olan vakalarda düzenleyici proteinler olan CD46 ve CD55 seviyelerinin daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda, CD55 ekspresyon düzeyleri iki grup arasında farklı olmakla birlikte, fark anlamlı değildi ($p > 0.05$). Düzenleyici proteinlerin aşırı yüksek ekspresyonunun, TKG hastalarında

^{4*} Kanda kompleman düzeyinin düşük olması durumudur.

CD46 ve C4BP kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlara bağılı olabileceğı belirtilmiştir (Kar ve B, 2017). Bu çalışmada, tekrarlayan gebelik kayıpları bulunan grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek CD55 ekspresyonu, plasental kompleman aktivasyonunu sınırlamanın önemini vurgulamaktadır. Bir proteinin aşırı ekspresyonunun olası bir nedeni de, işlevsel olarak ilişkili başka bir proteinin eksikliğini telafi etmek olduğı düşünölebilir (Li ve ark., 2001).

Hamann ve arkadaşları tarafından 1996'da CD55'in, bir lökosit aktivasyon markörü olan CD97 için ligand olduğı gösterilmiştir. Bu da CD55'in, epitelyal lökosit çapraz etkileşimini ortaya çıkartmaktadır (Li ve ark., 2001). Bu çalışmadan bağımsız olarak, Li ve arkadaşlarının 2001'de yaptığı bir çalışmada, kolorektal ve mide tümörlerinde de CD55'in hücre yüzeyinde aşırı eksprese olduğı gösterilmiştir. Bir diğör çalışmada, Pourazar ve arkadaşları 2005'te, eritrosit CD55 ve CD59'un seviyelerinin Romatizmal Artrit (RA) bir teşhis aracı olarak kullanıldığını göstererek, azalan CD55 ve CD59 seviyelerinin RA riskini arttırdığını belirtmişlerdir (Pourazar ve ark., 2005; Arora ve ark., 1998). Lokki ve arkadaşları da, on iki preeklamps hastasının plasenta örnekleri ile on kontrol plasenta örneğini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada CD55 ve CD59'un yüksek ekspresyonu ile kompleman aktivasyonunu sınırlamak için gerekli olduğunu belirtmişlerdir (Lokki ve ark., 2014). Francis ve arkadaşları, 2006'da yaptıkları çalışmada yirmi dört Antifosfolipid Sendromlu (APS) tekrarlayan düşüğü olan hastanın, elli sekiz APS si olmayan tekrarlayan düşüğü olan grupta; CD46, CD55 ve CD59 kompleman genlerinin ekspresyon seviyelerini analiz etmişlerdir. Sonuçlarına göre CD55 ekspresyon seviyeleri hasta gruplarında anlamlı olarak daha düşük olmasının kompleman aracılı gebelik kaybına yatkınlık oluşturduğunu göstermişlerdir (Francis ve ark., 2006). Hasta popölasyonumuz, Francis ve arkadaşlarının vaka sayılarına göre daha kısıtlı olmakla birlikte, CD55 ekspresyonlarımızın artışı nedeniyle farklılık göstermiştir.

Kompleman düzenleyiciler olan CD46, CD55, CD59; kompleman sisteminin savunma hattında farklı aşamalarda etkili olan proteinlerdir. Birçok hastalığın patogenezinin sebep olan düzenleyici genlerin ekspresyon düzeyleri değışebilmektedir. TKG hastalarında değışen CD46, CD55 ve CD59 desidua ekspresyonları lokal korumayı bozabilir, komplemanın aşırı aktivasyonunu teşvik edebilir ve sonuç olarak iltihaplanma, tromboz ve doku hasarına yol açabilir. Çalışmamızda, kontrol grubuna

kıyasla, gebelik kaybı olan kadınların desidualarında CD46, CD55 ve CD59 düzenleyici seviyelerinde anlamlı bir fark olmasa da, CD55 artmış bulunmuştur. Bu bulgu gebeliklerde fetüs toleransını sağlayabilmek için aşırı lokal kompleman aktivasyonuna sekonder, koruyucu niteliktedir. Bu doğrultuda artan CD55 kompleman düzenleyicisinin, C3 konvertazını baskıladığı ve C3a plazma kompleman ürününün hasta grubumuzda beklenildiği üzere azaldığı ($p<0,005$) görülmüştür. Çalışmamızda, kompleman basamağının erken evrelerinde görev alan CD46 düzenleyici geninin ekspresyon miktarı, iki grup arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. Bu durum, CD46 genindeki mutasyonlardan veya gebelik haftası farklılıklarından kaynaklanmış olabilir. Hastalarımızda artan CD55 ekspresyonunun, kompleman inhibisyonu ve gebelik materyalinin korunabilmesi için komplementer olarak arttığı düşünülebilir. Bu durumda kaskadın geç basamak düzenleyicisi olan CD59 düzeyinde farklılık bulunmaması gebelik materyalinin erken kompleman basamakları aktivasyonu ile hasara uğradığı ve CD59'a ihtiyaç duyulmadan kaybedildiği yorumunda bulunabiliriz.

Kompleman genlerinin patolojik düzeydeki inaktivasyonu/aktivasyonu, inflamatuvar yolları aktive ederek T hücre dengesini bozabilmekte ve düşükle sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle, kompleman düzenlenmesinde etkili olan diğer sinyal yollarının da araştırılması gerekmektedir.

Olumsuz gebelik sonuçlarını azaltmak, fetüsler için konak savunmasını korumak için özellikle CD55 kompleman düzenleyici geninin, tekrarlayan düşüklerin tedavisinde etkili bir biyobelirteç olduğu ve gelecekteki çalışmaların da kilit noktası olacağı söylenebilir. Bu bulguları doğrulamak için daha fazla sayıda hasta içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Mevcut durumda düşük tehditi bulunan gebeliklerde uygulanan tedavi seçeneği yalnızca progesteron preparatları kullanımındır. Düşük tehditinin hormonal yetersizlik dışında immünolojik nedenlerinin de olabileceği düşünüldüğünde, düşüğün önlenmesinde farklı tedavilerin de önemli olabileceği nettir. Çalışmamız kısıtlı hasta sayısına rağmen; kompleman düzenleyici proteinlerin ve aktivasyon ürünlerinin, kompleman aracılı hasarı öngörebilmek için önemli olduğunu vurgulamaktadır. Anormal kompleman aktivasyonunun ve gebelik materyalinin immünolojik hasarının

önüne geçilmesi ve gebeliğin korunabilmesi için, bu hastalarda kompleman aktivasyon baskılayıcı tedavilerin geliştirilmesi bir seçenek olabilir.



14. KAYNAKLAR

Original makale:

Abdolmohammadi Vahid S, Ghaebi M, Ahmadi M, et al. Altered T-cell subpopulations in recurrent pregnancy loss patients with cellular immune abnormalities. *J Cell Physiol.* 2018;1–10. <https://doi.org/10.1002/jcp.27290>.

Ahmad, Hiwa & Mirhaj M.salih, Mehri & Khidir, Kamal. Complement protein and Immunoglobulins Serum levels in Normal Pregnant and Spontaneous Aborted Women. *Kurdistan Journal of Applied Research.* 2018; 129-133. [10.24017/science.2018.2.21](https://doi.org/10.24017/science.2018.2.21).

Albrecht, E. D., & Pepe, G. J. Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. *The International journal of developmental biology.* 2010; 54(2-3), 397–408.

Aldrich, C. L., Stephenson, M. D., Karrison, T., Odem, R. R., Branch, D. W., Scott, J. R., Schreiber, J. R., & Ober, C. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Molecular human reproduction.* 2001; 7(12), 1167–1172. <https://doi.org/10.1093/molehr/7.12.1167>.

American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss. Number 24, February 2001. (Replaces Technical Bulletin Number 212, September 1995). American College of Obstetricians and Gynecologists. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics.* 2002; 78(2), 179–190. [https://doi.org/10.1016/s0020-7292\(02\)00197-2](https://doi.org/10.1016/s0020-7292(02)00197-2).

Arora M, Kumar A, Das SN, Srivastava LM. Complement-regulatory protein expression and activation of complement cascade on erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol.* 1998;111(1):102-106. doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00449.x.

Banadakoppa, M., Chauhan, M. S., Havemann, D., Balakrishnan, M., Dominic, J. S., & Yallampalli, C. Spontaneous abortion is associated with elevated systemic C5a and reduced mRNA of complement inhibitory proteins in placenta. *Clinical and experimental immunology.* 2014; 177(3), 743–749.

Bates, M. D., Quenby, S., Takakuwa, K., Johnson, P. M., & Vince, G. S. Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss?. *Human reproduction (Oxford, England).* 2002; 17(9), 2439–2444. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.9.2439>.

Beer A.E., Quebbeman J.F., Ayers J.W., Haines R.F. Major Histocompatibility Complex Antigens, Maternal and Paternal Immune Responses, and Chronic Habitual Abortions in Humans. *Am. J Obstet Gynecol.* 1981; 141(8):987-99.

Beksaç S, Demir N, Koç A, Yüksel A. Erken gebelik problemleri ve düşükler. *Obstetrik, Maternal - Fetal Tıp ve Perinatoloji*, 1, baskı, Medikal & Nobel, Ankara. 2001; pages 1076–85.

Blom AM. The role of complement inhibitors beyond controlling inflammation. *J Intern Med*. 2017;282(2):116-128. doi:10.1111/joim.12606.

Buster, J. E., & Pisarska, M. D. Medical management of ectopic pregnancy. *Clinical obstetrics and gynecology*. 1999; 42(1), 23–56. <https://doi.org/10.1097/00003081-199903000-00006>.

Chen, M. & Wang, L.-T & Zheng, P.-S. Complement activation fragment C3a is a sensitive biomarker for patients with recurrent miscarriage. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2017; 10. 4566-4572.

Chighizola CB, Lonati PA, Trespidi L, Meroni PL, Tedesco F. The Complement System in the Pathophysiology of Pregnancy and in Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases During Pregnancy. *Front Immunol*. 2020;11:2084. Published 2020 Aug 27. doi:10.3389/fimmu.2020.02084.

Child, T. J., Thomas, J., Rees, M., & MacKenzie, I. Z. A comparative study of surgical and medical procedures: 932 pregnancy terminations up to 63 days gestation. *Human reproduction* (Oxford, England). 2001; 16(1), 67–71. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.1.67>.

Costeas PA, Koumouli A, Giantsiou-Kyriakou A, Papaloizou A, Koumas L. Th2/Th3 cytokine genotypes are associated with pregnancy loss. *Human Immunology*. 2004; Feb;65(2):135-141. Doi: 10.1016/j.humimm.2003.11.007.

Costumbrado J, Mansour T, Ghassemzadeh S. Rh Incompatibility. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2020 Nov 20.

Cunningham, D.S., Tichenor Jr., J.R. Decay-accelerating factor protects human trophoblast from complement-mediated attack. *Clin. Immunol. Immunopathol*. 1995;74, 156–161.

Dankers, M. K., Roelen, D. L., Korfage, N., de Lange, P., Witvliet, M., Sandkuijl, L., Doxiadis, I. I., & Claas, F. H. Differential immunogenicity of paternal HLA Class I antigens in pregnant women. *Human immunology*. 2003;64(6),600–606. [https://doi.org/10.1016/s0198-8859\(03\)00058-2](https://doi.org/10.1016/s0198-8859(03)00058-2).

Davies, M., & Browne, C. M. Anti-trophoblast antibody responses during normal human pregnancy. *Journal of reproductive immunology*. 1985;7(4),285–297. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(85\)90024-5](https://doi.org/10.1016/0165-0378(85)90024-5).

Deniz, R., Baykuş, Y., & Kavak, Çelik, E. Approach to Recurrent Early Pregnancy Loss. *Kafkas Journal of Medical Sciences*. 2016;6(2):130-137. doi: 10.5505/kjms.2016.15010.

Dhawan V, Kumar M, Deka D, et al. Paternal factors and embryonic development: Role in recurrent pregnancy loss. *Andrologia*. 2019;51(1):e13171. doi:10.1111/and.13171.

Dho, S. H., Lim, J. C., & Kim, L. K. Beyond the Role of CD55 as a Complement Component. *Immune network*. 2018;18(1), e11.

Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*. 2010;20(1):34-50. doi:10.1038/cr.2009.139.

El Hachem, H., Crepaux, V., May-Panloup, P., Descamps, P., Legendre, G., & Bouet, P. E. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. *International journal of women's health*. 2017;9,331–345. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S100817>.

Ehrnthaller, C., Ignatius, A., Gebhard, F., & Huber-Lang, M. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. 2011;17(3-4),317–329. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00149>.

Fabi, F., Grenier, K., Parent, S., Adam, P., Tardif, L., Leblanc, V., & Asselin, E. Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells. *PloS one*. 2017;12(5),e0177387.

Figueiredo AS, Schumacher A. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy [published correction appears in *Immunology*. 2019 Feb;156(2):213]. *Immunology*. 2016;148(1):13-21. doi:10.1111/imm.12595.

Francis J, Rai R, Sebire NJ, et al. Impaired expression of endometrial differentiation markers and complement regulatory proteins in patients with recurrent pregnancy loss associated with antiphospholipid syndrome. *Mol Hum Reprod*. 2006;12(7):435-442. doi:10.1093/molehr/gal048

Ford, H. B., & Schust, D. J. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Reviews in obstetrics & gynecology*. 2009;2(2), 76–83.

Gaccioli F, Lager S. Placental Nutrient Transport and Intrauterine Growth Restriction. *Front Physiol*. 2016;7:40. Published 2016 Feb 16. doi:10.3389/fphys.2016.00040.

Gamliel M, Goldman-Wohl D, Isaacson B, Gur C, Stein N, Yamin R, Berger M, Grunewald M, Keshet E, Rais Y, Bornstein C, David E, Jelinski A, Eisenberg I, Greenfield C, Ben-David A, Imbar T, Gilad R, Haimov-Kochman R, Mankuta D, Elami-Suzin M, Amit I, Hanna JH, Yagel S, Mandelboim O. Trained Memory of Human Uterine NK Cells Enhances Their Function in Subsequent Pregnancies. *Immunity*. 2018 May 15;48(5):951-962.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.030. PMID: 29768178.

Gao, S., Cui, Z., & Zhao, M. H. The Complement C3a and C3a Receptor Pathway in Kidney Diseases. *Frontiers in immunology*. 2020;11,1875. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01875>.

Gellersen, B & Brosens, Jan. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: A decidualizing affair. *The Journal of endocrinology*. 2003;178. 357-72. 10.1677/joe.0.1780357.

Gellersen, B., & Brosens, J. J. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocrine reviews*. 2014;35(6),851–905. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1045>.

Gilman-Sachs A., Harris D., Beer A., Beaman K.D. Inhibition of binding of anti-CD3 antibodies to paternal lymphocytes correlates with failure of immunotherapy for treatment of recurrent spontaneous abortions. *Journal of Reproductive Immunology*. 1990; Volume 17, Issue 1, Pages 41-51, ISSN 0165-0378. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(90\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0165-0378(90)90038-8).

Girardi, G., Bulla, R., Salmon, J. E., & Tedesco, F. The complement system in the pathophysiology of pregnancy. *Molecular immunology*. 2006;43(1-2),68–77. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.06.017>.

Girardi G. Complement activation, a threat to pregnancy. *Seminars in immunopathology*. 2018;40(1),103–111. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0645-x>.

Gupta, M. Recurrent Pregnancy Loss. *Immunology and Pregnancy Loss*. 2018; 10.1007/978-981-10-7338-0(Chapter 4), 53–65. doi:10.1007/978-981-10-7338-0_4.

Hiby, S. E., Regan, L., Lo, W., Farrell, L., Carrington, M., & Moffett, A. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2008;23(4),972–976.

HoWangYin, K., Loustau, M., Wu, J., Alegre, E., Daouya, M., Caumartin, J., Sousa, S., Horuzsko, A., Carosella, E.D., & LeMaoult, J. Multimeric structures of HLA-G isoforms function through differential binding to LILRB receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012; 69, 4041-4049.

Hu, X., Wang, Y., Mor, G., & Liao, A. Forkhead box P3 is selectively expressed in human trophoblasts and decreased in recurrent pregnancy loss. *Placenta*. 2019;81,1–8. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.04.003>.

Hunt, J. S., & Orr, H. T. HLA and maternal-fetal recognition. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1992;6(6), 2344–2348. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.6.1544544>.

Imai, T., Takakuwa, K., Ishii, K., Adachi, H., Higashino, M., Kurata, H., & Tanaka, K. HLA-class I antigens in patients with unexplained recurrent abortion, *Journal of Perinatal Medicine*. 2001;29(5),427-432. doi:10.1515/JPM.2001,059.

Imam SN, Shamsi MB, Kumar K, Deka D, Dada R. Idiopathic recurrent pregnancy loss: role of paternal factors; a pilot study. *J Reprod Infertil*. 2011;12(4):267-276.

Ishitani, A., & Geraghty, D. E. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(9),3947–3951. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.9.3947>.

Jensen, T.S., Bjorge, L., Wollen, A.L., Ulstein, M. Identification of the complement regulatory proteins CD46, CD55, and CD59 in human fallopian tube, endometrium, and cervical mucosa and secretion. 1995; *Am. J. Reprod. Immunol*. 34, 1–9.

Kar, Bibhas & B, Linda. Genetic Factors Associated With Recurrent Pregnancy Loss. *Obstetrics & Gynecology International Journal*. 2017;7. 10.15406/ogij.2017.07.00272.

Kaufman, R. M., Schlumpf, K. S., Wright, D. J., Triulzi, D. J., & NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II. Does Rh immune globulin suppress HLA sensitization in pregnancy?. *Transfusion*. 2013;53(9),2069–2077. <https://doi.org/10.1111/trf.12049>.

Kaur, Gurman & Trowsdale, John & Fugger, Lars. Natural killer cells and their receptors in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2012;136. 10.1093/brain/aws159.

Kim, E. N., Yoon, B. H., Lee, J. Y., Hwang, D., Kim, K. C., Lee, J., Shim, J. Y., & Kim, C. J. Placental C4d deposition is a feature of defective placentation: observations in cases of preeclampsia and miscarriage. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2015;466(6),717–725. <https://doi.org/10.1007/s00428-015-1759-y>.

Kim, Y. J., Shin, J. H., Hur, J. Y., Kim, H., Ku, S. Y., & Suh, C. S. Predictive value of serum progesterone level on β -hCG check day in women with previous repeated miscarriages after in vitro fertilization. *PloS one*. 2017;12(7),e0181229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181229>.

Kimberley FC, Sivasankar B, Paul Morgan B. Alternative roles for CD59. *Mol Immunol*. 2007;44(1-3):73-81. doi:10.1016/j.molimm.2006.06.019.

Knöfler, M., Haider, S., Saleh, L., Pollheimer, J., Gamage, T., & James, J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2019;76(18),3479–3496. doi: 10.1007/s00018-019-03104-6.

Kofod, L., Lindhard, A., Bzorek, M., Eriksen, J. O., Larsen, L. G., & Hviid, T. Endometrial immune markers are potential predictors of normal fertility and pregnancy after in vitro fertilization. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989). 2017;78(3),10.1111/aji.12684. <https://doi.org/10.1111/aji.12684>.

Kolte, A. M., Steffensen, R., Christiansen, O. B., & Nielsen, H. S. Maternal HLA class II alleles are associated with poor long-term outcome in recurrent pregnancy loss after a boy. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989). 2016;76(5),400–405. <https://doi.org/10.1111/aji.12561>

Kuroda, Keiji. Impaired endometrial function and unexplained recurrent pregnancy loss. *Hypertension Research in Pregnancy*. 2019. doi:10.14390/jsshp.HRP2018-012.

Lashley EE, Meuleman T, Claas FH. Beneficial or harmful effect of antipaternal human leukocyte antibodies on pregnancy outcome? A systematic review and meta-analysis. *Am J Reprod Immunol*. 2013;70(2):87-103. doi:10.1111/aji.12109.

Lee, S. K., Kim, J. Y., Lee, M., Gilman-Sachs, A., & Kwak-Kim, J. Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989). 2012;67(4),311–318. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2012.01116.x>.

Li L, Spendlove I, Morgan J, Durrant LG. CD55 is over-expressed in the tumour environment. *Br J Cancer*. 2001;84(1):80-86. doi:10.1054/bjoc.2000.1570.

Liszewski, M. K., & Atkinson, J. P. Complement regulator CD46: genetic variants and disease associations. *Human genomics*. 2015;9(1),7. <https://doi.org/10.1186/s40246-015-0029-z>.

Lokki AI, Heikkinen-Eloranta J, Jarva H, et al. Complement activation and regulation in preeclamptic placenta. *Front Immunol*. 2014;5:312. Published 2014 Jul 9. doi:10.3389/fimmu.2014.00312.

Lublin DM and Atkinson JP. Decay-accelerating factor: Biochemistry, molecular biology, and function. *Ann Rev Immunol*. 1989;7:35–58.

Lynch AM, Salmon JE. Dysregulated complement activation as a common pathway of injury in preeclampsia and other pregnancy complications. *Placenta*. 2010;31(7):561-567. doi:10.1016/j.placenta.2010.03.010.

Lynch AM, Gibbs RS, Murphy JR, Giclas PC, Salmon JE, Holers VM. Early elevations of the complement activation fragment C3a and adverse pregnancy outcomes. *Obstet Gynecol*. 2011; 117:75–83. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181fc3afa.

Male, V., Sharkey, A., Masters, L., Kennedy, P. R., Farrell, L. E., & Moffett, A. The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire. *European journal of immunology*. 2011;41(10),3017–3027. <https://doi.org/10.1002/eji.201141445>.

Mann K., Hamilton S., Evans J., Sibbring J., Dore J. ACGS best practice guidelines for use of Quantitative Fluorescence-PCR for the detection of aneuploidy v4. Association for Clinical Genomic Science (ACGS). 2018.

Mao D, Wu X, Deppong C, et al. Negligible role of antibodies and C5 in pregnancy loss associated exclusively with C3-dependent mechanisms through complement alternative pathway. *Immunity*. 2003;19(6):813-822. doi:10.1016/s1074-7613(03)00321-2.

Matsubayashi H, Maruyama T, Ozawa N, et al. Anti-paternal antibodies by flow cytometry in the management of alloimmunization on recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol*. 2000;44(5):284-288. doi:10.1111/j.8755-8920.2000.440506.x.

McConnachie PR, McIntyre JA. Maternal antipaternal immunity in couples predisposed to repeated pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol*. 1984;5(4):145-150. doi:10.1111/j.1600-0897.1984.tb00186.x.

Meuleman, T., Cohen, D., Swings, G. M., Veraar, K., Claas, F. H., & Bloemenkamp, K. W. Increased complement C4d deposition at the maternal-fetal interface in unexplained recurrent miscarriage. *Journal of reproductive immunology*. 2016;113, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.12.001>.

Micheloud D, Sarmiento E, Teijeiro R, Jensen J, Rodri'guez Molina JJ, Ferna'ndez-Cruz E, Carbone J: Hypocomplementemia in the absence of autoantibodies in women with recurrent pregnancy loss. *Allergol Immunopathol* 2007; 35:90–94.

Mirkin, S., Arslan, M., Churikov, D., Corica, A., Diaz, J. I., Williams, S., Bocca, S., & Oehninger, S. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Human reproduction* (Oxford, England). 2005;20(8),2104–2117. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei051>.

Mohlin, F. C., Mercier, E., Fremeaux-Bacchi, V., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P., Gris, J. C., & Blom, A. M. Analysis of genes coding for CD46, CD55, and C4b-binding protein in patients with idiopathic, recurrent, spontaneous pregnancy loss. *European journal of immunology*. 2013;43(6),1617–1629. <https://doi.org/10.1002/eji.201243196>.

Nesargikar, P. N., Spiller, B., & Chavez, R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *European journal of microbiology & immunology*. 2012;2(2),103–111. doi:10.1556/EuJMI.2.2012.2.2.

Ni, Nan & Li, Qinglei. TGFβ superfamily signaling and uterine decidualization. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2017;15. 10.1186/s12958-017-0303-0.

Okada, H., Tsuzuki, T., & Murata, H. Decidualization of the human endometrium. *Reproductive medicine and biology*. 2018;17(3),220–227. doi:10.1002/rmb2.12088.

Pan-Castillo, B., Gazze, S. A., Thomas, S., Lucas, C., Margarit, L., Gonzalez, D., Francis, L. W., & Conlan, R. S. Morphophysical dynamics of human endometrial cells during decidualization. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2018;14(7), 2235–2245. doi:10.1016/j.nano.2018.07.004.

Pandya, Abhilash & Das, Mrinal & Rolin, Johannes. Role of Cytokines in Healthy and Pathological Pregnancies. 2015; 10.1201/b19151-25.

Pavone, M., Malpani, S., Dyson, M., & Bulun, S. Altered retinoid signaling compromises decidualization in human endometriotic stromal cells, *Reproduction*. 2017;154(3),207-216. Retrieved Sep 27, 2020, from <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/154/3/REP-16-0592.xml>.

Persson, G., Jørgensen, N., Nilsson, L. L., Andersen, L., & Hviid, T. A role for both HLA-F and HLA-G in reproduction and during pregnancy?. *Human immunology*. 2010;81(4),127–133. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2019.09.006>.

Petroff, Margaret. Immune interactions at the maternal-fetal interface. *Journal of reproductive immunology*. 2006;68. 1-13. 10.1016/j.jri.2005.08.003.

Piccinni, M. P., Beloni, L., Livi, C., Maggi, E., Scarselli, G., & Romagnani, S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nature medicine*. 1998;4(9), 1020–1024. <https://doi.org/10.1038/2006>.

Pollheimer, J., Vondra, S., Baltayeva, J., Beristain, A. G., & Knöfler, M. Regulation of Placental Extravillous Trophoblasts by the Maternal Uterine Environment. *Frontiers in immunology*. 2018; 9,2597. doi:10.3389/fimmu.2018.02597.

Pourazar, Abbas & Andalib, Alireza & Oreizy, Farzad & Karimzadeh, Hadi & Ghavami-Nejad, Ahmad & Pournasr, Behshad. (2005). A Flow Cytometry Study For CD55 And CD59 Expression On Erythrocytes In Rheumatoid Arthritis Patients. *Iranian journal of immunology: IJI*. 2005; 2. 91-96.

Popli, R., Sahaf, B., Nakasone, H., Lee, J. Y., & Miklos, D. B. Clinical impact of H-Y alloimmunity. *Immunologic research*. 2014;58(2-3),249–258. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8514-3>.

Puscheck, E. E., & Jeyendran, R. S. The impact of male factor on recurrent pregnancy loss. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2007;19(3),222–228. <https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e32813e3ff0>.

Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Seminars in immunology*. 2001;13(4),219–227. <https://doi.org/10.1006/smim.2001.0316>.

Ratnoff, W.D., Brockman, W.W., Hasty, L.A. Immunohistochemical localization of C9 neoantigen and the terminal complement inhibitory protein CD59 in human endometrium. 1995; *Am. J. Reprod. Immunol.* 34, 72–79.

Redman, C. W., McMichael, A. J., Stirrat, G. M., Sunderland, C. A., & Ting, A. Class 1 major histocompatibility complex antigens on human extra-villous trophoblast. *Immunology.* 1984;52(3),457–468.

Regan, L., Braude, P. R., & Hill, D. P. A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of anti-paternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy. *Human reproduction (Oxford, England).* 1991;6(2),294–298. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137325>.

Robertson SA, Mau VJ, Hudson SN, Tremellen KP. Cytokine-leukocyte networks and the establishment of pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 1997;37(6):438-442. doi:10.1111/j.1600-0897.1997.tb00257.x.

Robertson, Sarah & Moldenhauer, Lachlan. Immunological determinants of implantation success. *The International journal of developmental biology.* 2014;58. 205-217. 10.1387/ijdb.140096sr.

Rogenhofer N, Toth B, Kiessig S, et al. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) as screening method for anti-paternal allo-antibodies in patients with recurrent pregnancy loss (RPL). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;136(2):155-159. doi:10.1016/j.ejogrb.2007.03.002.

Rogenhofer N, Ochsenkühn R, von Schönfeldt V, Assef RB, Thaler CJ. Antitrophoblast antibodies are associated with recurrent miscarriages. *Fertil Steril.* 2012;97(2):361-366. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.11.014.

Roman E. Fetal loss rates and their relation to pregnancy order. *Journal of epidemiology and community health.* 1984;38(1), 29–35. doi:10.1136/jech.38.1,29.

Ruder, E. H., Hartman, T. J., Blumberg, J., & Goldman, M. B. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Human reproduction update.* 2008;14(4),345–357. doi:10.1093/humupd/dmn011.

Saini, V., Arora, S., Yadav, A., & Bhattacharjee, J. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2011;412(9-10),702–708. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.01.002>.

Sarma, J. V., & Ward, P. A. The complement system. *Cell and tissue research.* 2011;343(1),227–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>.

Scambi C, Ugolini S, Tonello M, et al. Complement activation in the plasma and placentas of women with different subsets of antiphospholipid syndrome. *Am J Reprod Immunol.* 2019;82(6):e13185. doi:10.1111/aji.13185

Schönermark S, Rauterberg EW, Shin ML, Loke S, Roelcke D and Hänsch GM. Homologous species restriction in lysis of human erythrocytes: a membrane-derived protein with C8-binding capacity functions as an inhibitor. *J Immunol.* 1986; 136:1772–1776.

Schumacher, A., Sharkey, D. J., Robertson, S. A., & Zenclussen, A. C. Immune Cells at the Fetomaternal Interface: How the Microenvironment Modulates Immune Cells To Foster Fetal Development. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). 2018;201(2),325–334.

Schwartz N, Verma A, Bivens CB, Schwartz Z, Boyan BD. Rapid steroid hormone actions via membrane receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(9):2289-2298. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.06.004.

Simpson, K.L., Holmes, C.H. Differential expression of complement regulatory proteins decay-accelerating factor (CD55), membrane cofactor protein (CD46) and 59CD during human spermatogenesis. 1994; *Immunology* 81, 452–461.

Singh, Meenakshi & Rajak, Jyoti & Kadam, Shalaka & Rajadhyaksha, Sunil. Alloimmunization and Role of HLA in Pregnancy. 2019. 10.5772/intechopen.84211.

Szekeres-Bartho, J., & Wegmann, T. G. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *Journal of reproductive immunology.* 1996;31(1-2),81–95. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(96\)00964-3](https://doi.org/10.1016/0165-0378(96)00964-3).

Talbi, S., Hamilton, A. E., Vo, K. C., Tulac, S., Overgaard, M. T., Dosiou, C., Le Shay, N., Nezhat, C. N., Kempson, R., Lessey, B. A., Nayak, N. R., & Giudice, L. C. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology.* 2006;147(3),1097–1121. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1076>.

Tedesco F, Pausa M, Nardon E et al. Prevalence and biological effects of anti-trophoblast and anti-endothelial cell antibodies in patients with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38: 205–211.

Teirilä, L., Heikkinen-Eloranta, J., Kotimaa, J., Meri, S., & Lokki, A. I. Regulation of the complement system and immunological tolerance in pregnancy. *Seminars in immunology.* 2019;45, [101337]. doi:10.1016/j.smim.2019.101337.

Thielen, A., van Baarsen, I. M., Jongsma, M. L., Zeerleder, S., Spaapen, R. M., & Wouters, D. CRISPR/Cas9 generated human CD46, CD55 and CD59 knockout cell lines as a tool for complement research. *Journal of immunological methods.* 2018;456,15–22. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.02.004>.

Tilburgs, T., Scherjon, S. A., van der Mast, B. J., Haasnoot, G. W., Versteeg-V D Voort-Maarschalk, M., Roelen, D. L., van Rood, J. J., & Claas, F. H. Fetal-maternal HLA-C mismatch is associated with decidual T cell activation and induction of

functional T regulatory cells. *Journal of reproductive immunology*. 2009;82(2),148–157. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.05.003>.

Ticconi, C., Pietropolli, A., Di Simone, N., Piccione, E., & Fazleabas, A. Endometrial Immune Dysfunction in Recurrent Pregnancy Loss. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(21), 5332. doi:10.3390/ijms20215332.

Tirado-González, I., Muñoz-Fernández, R., Blanco, O., Leno-Durán, E., Abadía-Molina, A. C., & Olivares, E. G. Reduced proportion of decidual DC-SIGN+ cells in human spontaneous abortion. *Placenta*. 2010;31(11),1019–1022. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.09.008>.

Tsuzuki, T., Okada, H., Cho, H., Shimoi, K., Miyashiro, H., Yasuda, K., & Kanzaki, H. Divergent regulation of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and vascular endothelial growth factor by hypoxia and female sex steroids in human endometrial stromal cells. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2013;168(1),95–101. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2012.12.040>.

Unander AM, Olding LB. Habitual abortion: parental sharing of HLA antigens, absence of maternal blocking antibody, and suppression of maternal lymphocytes. *Am J Reprod Immunol*. 1983;4(4):171-178. doi:10.1111/j.1600-0897.1983.tb00273.x.

Unnewehr, H., Rittirsch, D., Sarma, J. V., Zetoune, F., Flierl, M. A., Perl, M., Denk, S., Weiss, M., Schneider, M. E., Monk, P. N., Neff, T., Mihlan, M., Barth, H., Gebhard, F., Ward, P. A., & Huber-Lang, M. Changes and regulation of the C5a receptor on neutrophils during septic shock in humans. *Journal of immunology (Baltimore,Md.:1950)*. 2013;190(8),4215–4225.

van Kampen CA, Versteeg-vd Voort Maarschalk MF, Langerak-Langerak J, Roelen DL, Claas FH. Kinetics of the pregnancy-induced humoral and cellular immune response against the paternal HLA class I antigens of the child. *Hum Immunol*. 2002;63(6):452-458. doi:10.1016/s0198-8859(02)00396-8.

van Pampus MG, Dekker GA, Wolf H, Huijgens PC, Koopman MM, von Blomberg BM, Büller HR. High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1999 May;180(5):1146-50. doi: 10.1016/s0002-9378(99)70608-3. PMID: 10329869.

Vianna, Priscila & Chies, José. Maternal exposure to paternal antigens can modulate the foetus immune system and is associated with reduced atopy in the childhood. *Bioscience Hypotheses*. 2008; 1. 248-250. 10.1016/j.bihy.2008.04.007.

von Schonfeldt V, Rogenhofer N, Ruf K, Thaler CJ, Jeschke U. Sera of patients with recurrent miscarriages containing anti-trophoblast antibodies (ATAB) reduce hCG and progesterone production in trophoblast cells in vitro. *J Reprod Immunol*. 2016;117:52–6. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.07.005> PMID: 27472296.

Yang, Shao-Liang & Wang, Hai-Yan & Li, Da-Jin & Li, Ming-Qing. Role of decidual natural killer cells at the Maternal–Fetal interface during pregnancy. *Reproductive and Developmental Medicine*. 2019; 3. 165. 10.4103/2096-2924.268161.

Young, S. L., Lessey, B. A., Fritz, M. A., Meyer, W. R., Murray, M. J., Speckman, P. L., & Nowicki, B. J. In vivo and in vitro evidence suggest that HB-EGF regulates endometrial expression of human decay-accelerating factor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(3),1368–1375. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.3.8350>.

Zhang, Y., & Jin, S. Mitigating placental injuries through up-regulating DAF in experimental APS mice: new mechanism of progesterone. *Clinical and experimental immunology*. 2019;197(3), 376–386. <https://doi.org/10.1111/cei.13313>.

ZHAO Xiao-xuan, ZHANG Rui, LI Na, CHEN Lu, LI Da-zhi, FENG Xiao-ling. Disorder of Complement System in Recurrent Spontaneous Abortion[J]. *Journal of International Reproductive Health/Family Planning*, 2018, 37(3): 238-242.

Zhou Q, Yan G, Ding L, et al. EHD1 impairs decidualization by regulating the Wnt4/ β -catenin signaling pathway in recurrent implantation failure. *EBioMedicine*. 2019;50:343-354. doi:10.1016/j.ebiom.2019.10.018

Weintraub AY, Sheiner E, Bashiri A, Shoham-Vardi I, Mazor M. Is there a higher prevalence of pregnancy complications in a live-birth preceding the appearance of recurrent abortions?. *Arch Gynecol Obstet*. 2005;271(4):350-354. doi:10.1007/s00404-004-0640-z

Wirstlein P, Jasiński P, Rajewski M, Goździewicz T, Skrzypczak J. Complement inhibitory proteins expression in placentas of thrombophilic women. *Folia Histochem Cytobiol*. 2012;50:460-467.

Wirstlein, P., Mikołajczyk, M., & Skrzypczak, J. Assessment of the transcription levels for the complement activation control system in eutopic endometrium in women with two or more consecutive miscarriages of unknown etiology. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2010;48(3),328–332. <https://doi.org/10.2478/v10042-10-0021-3>.

Qu X, Yang M, Zhang W, et al. Osteopontin expression in human decidua is associated with decidual natural killer cells recruitment and regulated by progesterone. *In Vivo*. 2008;22(1):55-61.

Xu, J.S. & Lee, Yi-Lun & Lee, Kai-Fai & Kwok, K & Lee, W & Luk, John & Yeung, William. Embryotrophic factor-3 from human oviductal cells enhances proliferation, suppresses apoptosis and stimulates the expression of the 1 subunit of sodium-potassium ATPase in mouse embryos. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2005; 19. 2919-26. 10.1093/humrep/deh497.

Kitap:

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, fifth ed. Elsevier Inc. 2016, Canada.

Atasü T, Şahmay Ş. Abortus. Jinekoloji, Nobel, 2. Baskı, İstanbul; 2001, 37:533–45.

Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF. The placental hormones. Williams Obstetrics, ed 20. Stamford, CT, Appleton & Lange; 1997, pp 125-129.

Weintraub, A. Y., & Sheiner, E. (2011). Early Pregnancy Loss. Bleeding During Pregnancy, Chapter 2, p: 25–44.

Çeviri kitap:

Abbas AK., Lichtman AH. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System Çeviren: Deniz G., Camcıoğlu Y. Temel İmmünoloji: İmmün Sistemin Fonksiyonları ve Bozuklukları. 1, Baskı, İstanbul Medikal Yayıncılık Ltd. Şti., İstanbul; 2007, s: 149-153.

Tez:

Kılıççı Ç. Erken Gebelik Kayıplarında Homosistein Düzeyinin Rolü. Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, 2004, İstanbul.

Mader R. Effect of glucose concentration and insülin on human endometrial stromal cells and their decidualization process. Yale School of Medicine, Lisans tezi, 2013, USA.

15. EKLER

Kongre Bildiri (Tez)

Yilmaz I., Ata P., Karakas N., Buyukbayrak E.E., “Expression Profile of Complement Activation at Decidual Tissue in Patients with RPL”, ESHG (European Society of Human Genetics) Virtual Congress 2020, Berlin, June 6-9, 2020.

