

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**TREG HÜCRELERİNİN İLK TRİMESTER
GEBELİK KAYIPLARINDA ETYOPATOLOJİK ROLÜ:
BİR İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMA**

DR. MUSTAFA CÜNEYT CEVİZCİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2021

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**TREG HÜCRELERİNİN İLK TRİMESTER
GEBELİK KAYIPLARINDA ETYOPATOLOJİK ROLÜ:
BİR İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMA**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. MUSTAFA CÜNEYT CEVİZCİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. ERDENER ÖZER

TEŞEKKÜR

Bu uzmanlık tezi çalışmasının gerçekleşmesinde büyük emeği ve her aşamada desteği olan tez danışmanım Prof. Dr. Erdener Özer başta olmak üzere, uzmanlık eğitimimde katkısı olan Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine,

Projenin yürütülmesindeki katkılarından dolayı Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Yeliz Arman Karakaya ile Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Erkan Çağlıyan'a,

Birlikte çalışmakta olduğum Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nın uzmanlık öğrencisi meslektaşlarıma ve Anabilim Dalı'nın tüm teknik ve yardımcı personeline,

Bugünlere gelebilmemin yegane sebebi olan sevgili Aileme,

Sonsuz teşekkürler...

Dr. Mustafa Cüneyt Cevizci

İzmir, Temmuz 2021

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	1
ŞEKİL LİSTESİ	2
RESİM LİSTESİ	3
KISALTMALAR	4-5
ÖZET	6-7
İNGİLİZCE ÖZET	8-9
1. GİRİŞ	10-16
1.1 Gebelik ve İmmun Sistem	10
1.2. Spontan Abortus	12
1.2.1 Tanımı ve Klinik Önemi	12
1.2.2 Epidemiyoloji	13
1.2.3 Etyopatogenez	15
2. MATERYAL METOD	17-19
2.1 Olgu Seçimi	17
2.2 CD25 İmmünohistokimyasal İncelemesi	17
2.3 İstatistiksel Analiz	19
3. BULGULAR	20-28
3.1 Demografik Veriler	20
3.2 İmmünohistokimyasal Bulgular	23
3.3 İstatistiksel Analiz Bulguları	28
4. TARTIŞMA	29-39
5. SONUÇLAR	40
6. KAYNAKLAR	41-51

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. CD 25 immünohistokimyasındaki immunboyanmanın yoğunluk skorlaması	18
Tablo 2. CD 25 immünohistokimyasındaki immunboyanmanın dağılım skorlaması	18
Tablo 3. Çalışma gruplarındaki ortalama anne yaşı ve gestasyon haftaları	20
Tablo 4. Olguların anne yaşı ve gestasyon haftaları.....	21
Tablo 5. Çalışma gruplarındaki CD25 immunboyanmasına ait sonuçların dökümü	26
Tablo 6. Çalışma gruplarına ait CD25 immunboyanma Q skorları	28

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Treg hücrelerinin gelişim ve fonksiyonu..... 12

Şekil 2: IVİg'in modölatör etkisi 37



RESİM LİSTESİ

Resim 1. CD25 immünohistokimya boyaması: Kontrol grubu	23
Resim 2. CD25 immünohistokimya boyaması: Spontan abortus grubu	24
Resim 3. CD25 immünohistokimya boyaması: Habituel abortus grubu	24
Resim 4. CD25 immünohistokimya boyaması: IVF abortus grubu.....	25



KISALTMALAR

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

APC : “Antigen Presenting Cells”

CD : “Cluster of Differentiation”

CTLA4 : “Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4”

FOX P3: “Forkhead box P3”

HA : Habitual (Tekrarlayan) Abortus

HCG : İnsan Koryonik Gonadotropin

ICSI “Intra Cytoplasmic Sperm Injection”

IG : İmmünoglobulin

IL : İnterlökin

IVF : İn Vitro Fertilizasyon

IVIG : İntravenöz İmmünoglobulin

mRNA : “Messenger RNA”

NK : “Natural Killer”

PD1 : “Programmed Cell Death Protein 1”

PD-L1 : “Programmed Death Ligand 1”

ROR γ : “RAR-related Orphan Receptor Gamma”

SNP : “Single Nucleotide Polymorphism”

TGF : “Transforming Growth Factor”

Th : T “Helper” hücresi

TLR4 : “Toll-like Receptor 4”

TNF : “Tumor Necrosis Factor”

TNSA : Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırmaları

Treg : Regulator T Hücreleri

**TREG HÜCRELERİNİN İLK TRİMESTER
GEBELİK KAYIPLARINDA ETYOPATOLOJİK ROLÜ:
BİR İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMA**

Dr. Mustafa Cüneyt Cevizci

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD

Amaç: Habitual abortus tüm gebe kadınların %1-5'ini etkileyen ve dünya çapında önemi artan bir sağlık problemidir. Yardımcı üreme teknikleri günümüzde neredeyse rutin bir obstetrik prosedür haline gelmiş ve başarısı artmış olsa da olguların önemli bir kısmı spontan abortus ile sonuçlanmaktadır. Etyopatogenezi net olarak aydınlatılamasa da spontan abortusun patogenezi maternal immün toleranstaki bozukluk ile ilişkilendirilmektedir. T regülatuar (Treg) hücreleri genel olarak immüntolerans mekanizmalarında rolü olan hücrelerdir. Bu çalışmada Treg hücrelerinin, spesifik olarak hem habitual, hem de IVF sonrası spontan abortuslarda etyopatogenetik öneminin aydınlatılması amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metod: Çalışmaya dört grup halinde, her grupta 24 olgu olmak üzere; missed abortus, habitual abortus, IVF sonrası spontan abortus ve istenmeyen gebelik (kontrol grubu) grupları dahil edildi. Küretaj materyallerine ait kesitlerde CD25 pozitif Treg hücrelerinin immunboyanma yoğunluğu ve dağılımı ayrı ayrı skorlandıktan sonra, her iki skor kombine edilerek Q skoru elde edildi.

Bulgular: Treg hücrelerinin CD25 immunboyanma Q skoru, her 4 grupta anlamlı farklılık göstermekteydi (one-way ANOVA testi, $p=0,003$). Yapılan post-hoc testinde

(Bonferroni t testi) Q skoru, kontrol grubu ile missed abortus grubunda anlamlı fark göstermezken, habitual abortus ve IVF abortus olgularında kontrol grubuna göre anlamlı oranda daha düşük düzeyde bulundu (sırasıyla $p=0,003$ ve $p=0,02$).

Sonuç: Çalışmamızdaki bulgular ışığında Treg hücrelerinin niceliksel durumu habituel abortus ve IVF abortus olgularında, hastalığın etyopatogenezinde rol oynayan önemli bir parametre olabilir. Ancak bu konuda kesin bir sonuca varmak için ekspresyon analizi düzeyinde moleküler çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: düşük, habitual abortus, in vitro fertilizasyon, spontan abortus, Treg hücresi

ETIOPATHOLOGICAL ROLE OF TREG CELLS IN FIRST TRIMESTER PREGNANCY LOSES: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

Dr. Mustafa Cüneyt Cevizci

Dokuz Eylül University Medical School Department of Pathology

Aim: Habitual abortion is a worldwide health problem that affects 1-5% of all pregnant women. Although assisted reproductive techniques have become an almost routine obstetric procedure and its success has increased, a significant number of cases result in spontaneous abortion. Although the etiopathogenesis of the abortion has not been clarified clearly, the data shows that spontaneous abortion is associated with impaired maternal immune tolerance. T regulatory (Treg) cells have a significant role in immune tolerance mechanisms. The aim of the present study was to address the etiopathogenetic importance of Treg cells specifically in both habitual and post-IVF spontaneous abortions.

Material and Methods: This study included 24 cases in each four groups of missed abortion, habitual abortion, spontaneous abortion after IVF, and unwanted pregnancy (control group). The immunostaining intensity and distribution of CD25 positive Treg cells in the curettage materials were scored separately, and the Q score was calculated by combining both scores.

Results: The CD25 Q score of Treg cells showed a significant difference between four groups (one-way ANOVA testi, $p=0,003$). Post-hoc test (Bonferroni t test) showed that Q score did not show any difference between the missed abortion and control group, whereas it significantly

decreased in habitual abortion and IVF abortion cases compared to the control group ($p=0,003$ ve $p=0,02$, respectively).

Conclusion: Based on our findings, we conclude that Treg cell loss may play a significant role in the etiopathogenesis of habitual and post-IVF abortion cases. However, molecular studies at the level of expression analysis are needed for a definite conclusion related to this hypothesis.

Key Words: abortion, habitual abortion, in vitro fertilization, miscarriage, spontaneous abortion, Treg cells



1. GİRİŞ

1.1 Gebelik ve İmmun Sistem

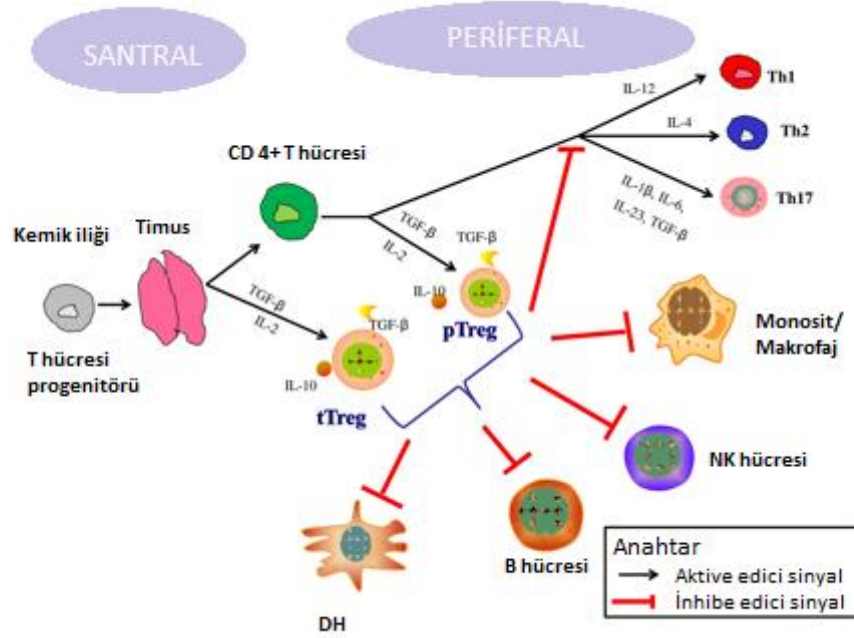
İnsanlarda sağlıklı bebeklerin dünyaya gelmesi için başarılı bir fertilizasyonun ardından gebeliğin sürdürülmesi gerekmektedir. Spontan abortus, intrauterin 20. haftadan daha önce gebeliği sonlandıracak medikal ya da cerrahi müdahaleler olmaksızın gerçekleşen erken gebelik kayıplarına verilen isimdir (1). Spontan abortusu tetikleyici immünolojik faktörler güncel tıbbi araştırmaların önemli odak noktalarından biridir (2). Dolayısıyla bu immünolojik faktörlerin detaylı bilinmesi önem kazanmıştır.

Döllenme ile birlikte embriyolar, paternal antijenler eksprese ederler. Dolayısı ile embriyonun uterusu implantasyonu semi-allojenik bir nakil gibi değerlendirilir. Başarılı bir gebelik için annenin fetüse karşı immüntoleransının gelişmesi gerekmektedir (3). Bu nedenlerle gebeliğin sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesi için maternal mikroçevrenin immünolojik açıdan önemli bir faktör olduğu anlaşılmaktadır. Gebelik mikroçevresinde bu rolü esas üstlenen hücrelerin Treg hücreleri olduğu düşünülmektedir. Treg hücreleri CD4 ve CD25 eksprese eden bir tür T helper hücresidir. T hücreleri, timusta olgunlaşan ve spesifik reseptörlere, yani T hücre reseptörlerine sahip lenfositlerdir (4, 5). Bu hücreler, adaptif immün yanıtın bir parçasıdır.(6) Özellikle, CD4+ T hücreleri olarak da bilinen T yardımcı (Th) hücreleri, antijen sunan hücreler (APC) tarafından aktive edilir ve klonal genişleme ve sitokin salgılanmasına ilerlerler (7). Bu aşamada salgılanan sitokin profili, Th hücrelerinin birkaç alt kümesinden birine hücre farklılaşmasının yönünü tanımlayacak ve sonraki bağışıklık tepkisi tipini belirleyecektir (8). Bu alt tipler T yardımcı hücre tip 1 (Th1), T yardımcı hücre tip 2 (Th2), Th17 hücreleri ve Treg hücrelerini içerir. Th1 hücreleri, interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) ve tümör nekroz faktörü

a (TNF-a) gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ile karakterize edilir. Bu moleküller, hücresel bağışıklıkta ve hücre içi patojenlere karşı konak savunmasında rol oynarlar. Buna karşılık, Th2 hücreleri humoral bağışıklık mediatörleri olan interlökin-4 (IL-4), interlökin-5 (IL-5), interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10) ve interlökin-13 (IL-13) eksprese edebilir ve bunlar hücre dışı parazitlerin temizlenmesinden sorumludur (9).

CD4⁺ T hücrelerinin farklı bir tipi olan Th17 hücreleri, inflamasyonun indüklenmesinde kritik bir rol oynar ve anormal bir Th17 hücresi seviyesi otoimmün hastalıkların patogenezi ile ilişkilendirilmiştir (10, 11). İnsanlarda Th17 hücrelerinin TGF- β , IL 6, IL-23 ve IL-1'in etkisi altında antijen uyarısını takiben saf CD4⁺ T hücrelerinden geliştiği ve IL-17A, IL-17F, IL-22 ve IL-26 salgıladığı bilinmektedir (12-14) Th17 hücrelerinin farklılaşmasından sorumlu olan transkripsiyonel faktör ise insanlarda ve farelerde ROR γ 't'dir (14).

Treg hücrelerinin üretim ve fonksiyonu Şekil 1'de özetlenmiştir. Treg hücreleri adenozin reseptör aktivasyonu ve ardından hücre içi "Protein Kinaz A" (PKA) yoluyla, enflamatuvar T hücrelerinde ve makrofajlarda inhibitör yolları tetiklerler (9). Treg hücreleri ya timusta üretilir ve timik T hücreleri (tTreg) hücreleri (15) olarak isimlendirilir ya da periferik dokulardaki saf T hücre prekürsörlerinden farklılaşarak, periferik sentez edilen indüklenebilir Treg hücreleri (pTreg) olarak ortaya çıkarlar (16). Ayrıca in vitro ortamda saf T hücrelerinin TGF- β ve IL2 ile T hücresi reseptör (TCR) stimülasyonu sonucunda in vitro indüklenmiş Treg hücreleri (iTreg) ortaya çıkmaktadır. Bu immün sistem hücreleri ayrıca CD4⁺ T hücreleri, CD8⁺ T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri, NKT hücreleri ve dendritik hücreleri içeren aşırı immün yanıtı azaltan IL-10 ve TGF- β gibi spesifik anti-inflamatuvar sitokinleri eksprese eder (17).



Şekil 1. Treg hücrelerinin immünite mekanizmalarındaki fonksiyonları (9)

1.2 Spontan Abortus

1.2.1 Tanım ve Klinik Önemi

Spontan abortus 20 haftadan daha önce gebeliği sonlandıracak medikal ya da cerrahi müdahaleler olmaksızın gerçekleşen erken gebelik kaybı anlamına gelmektedir (1). Spontan abortuslar değişik tiplerde karşımıza çıkmaktadır. Habituel (tekrarlayan, rekürrent) abortus (HA) 20. gebelik haftasından önce üç veya daha fazla ardışık düşük gerçekleşmesi olarak tanımlanır (18). Erken gebelik döneminde spontan abortus; gerek doğal yolla, gerek ise in vitro fertilizasyon (IVF) gibi yardımcı üreme teknikleri ile gerçekleşen gebeliklerde duygusal, ekonomik ve sosyolojik etkileri sonucunda, anne sağlığı açısından önemli problemler oluşturmaktadır.

Abortusun gerek primer komplikasyonları gerek ise tedavi kaynaklı sekonder komplikasyonları; gebeliğin evresine, abortus tipine, uygulanan hasta yönetiminin kalitesine, annenin sağlık durumuna bağlı olarak farklı klinik etkiler oluşturabilir. Gelişen komplikasyonlar erken, geç ya da psikolojik/duygusal morbiditeler olarak sınıflandırılabilir. Erken morbiditeler kanama, anemi, septik inkomplet abortus, post abortal sepsis, şok ve organ hasarı iken, geç morbiditeler pelvik inflamatuvar hastalık, Asherman's sendromu ve infertilite olarak sıralanabilir (19).

1.2.2 Epidemiyoloji

Erken gebelik kayıpları klinik olarak tanınan gebeliklerin %8-15'inde, tüm gebeliklerin yaklaşık %30'unda ortaya çıkmaktadır (20). Kadınların tahminen %1 ila %3'ü HA deneyimi yaşamakla birlikte, yardımcı üreme teknikleri ile gerçekleşen gebeliklerin de önemli bir kısmı spontan abortus ile sonuçlanmaktadır (21, 22). Bu durumların tıbbi, psikolojik, sosyal ve ekonomik etkileri, epidemiyolojik veriler ile birlikte değerlendirildiğinde, önemli bir halk sağlığı sorunu ile karşı karşıya olunduğu açıktır.

Ülkemizde Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırmaları verilerine göre evlenmiş kadınların %22'si en az bir kez spontan düşük yapmıştır. Bununla beraber yaşam boyu gerçekleşen spontan abortusların oranında son 20 yılda büyük bir değişim gerçekleşmemiştir. Bu oran 1993 yılında %21 iken, 2013'te %23'tür. Annelerde yaşam boyu deneyimlenen ortalama spontan abortus sayısı ise 0.32'dir. Bu oran da çok değişmemiştir. (2008 yılında 0,28 ve 2013'te 0,33). Ayrıca 100 gebelikte görülen spontan abortus güncel sayısı da 2013 yılı ile benzerdir (2013'te 14, 2018'te 13) (23).

Yardımcı üreme teknikleri ile gerçekleştirilen gebelikler yüksek riskli gebelikleri oluşturur. Yüksek kan basıncı, preeklampsi, büyüme geriliği ve kanama spontan gebeliklere kıyasla daha sıktır. Hamilelik sırasında ortaya çıkabilecek ilk komplikasyonlardan biri de ovaryan hiperstimülasyon sendromudur. Prematüre doğum oranı ve intrauterin ölüm sıklığı tüm gebeliklerin ortalamasının çok üzerindedir. Ayrıca, IVF kaynaklı gebeliklerin, uyarılmış doğum veya sezaryen gerektirme oranları önemli ölçüde daha yüksektir. Ancak, bu komplikasyonların ve talihsiz gelişmelerin, in vitro fertilizasyonun kendisinden değil, çoğul gebeliklerin sıklığından ve ilgili kadınların risk faktörlerinden kaynaklandığı düşünülmelidir. IVF uygulanan kadınlar ortalama olarak daha yaşlıdır ve genellikle tüm gebeliklerin toplamından daha fazla döngü düzensizlikleri, uterus anomalileri ve obezite ile ilgili sorunlar vardır. Ayrıca, yardımcı üreme tedavisi prosedürlerinden sonra ortaya çıkan gebeliklerde abortus ve tubal gebelik insidansı ortalamanın üzerindedir. Modern üreme tıbbi yöntemleri ile genellikle daha yüksek oranda çoğul gebelik oluşmaktadır. En önemli ve önlenmesi kolay komplikasyon çoğul gebeliktir. Çoğul gebeliklerin klinik sorunu, her şeyden önce, bu çocuklar için önemli ölçüde daha yüksek morbidite ve mortalite oranını artıran yüksek prematürite ve intrauterin büyüme geriliği oranlarıdır. Tüm çoğul fetüsler doğuma ulaşmaz, çünkü kadının yaşına bağlı olarak tüm çoğul gebeliklerin %30-%50'sinde bir veya tüm fetüslerde abortus ya da kendinden gerileme gerçekleşir. (24).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD) verilerine göre yardımcı üreme teknikleri ile olguların yaklaşık %14,7 oranında başarısızlık ile sonuçlanmakta olup, bu bulgular ışığında yardımcı üreme teknikleri spontan abortus için risk oluşturmadığı düşünülmektedir (21). Ancak farklı bir çalışmada yardımcı üreme teknikleri sonrası abortus oranı normal kohort grubuna kıyasla 1,20 oranıyla daha yüksektir. Bu çalışmaya göre, anne yaşı ve önceki spontan düşüklere göre

ayarlandıktan sonra, yardımcı üreme teknolojisinin gebeliklerde spontan düşük riskini çok az artırdığı görülmektedir (25).

1.2.3 Etiyopatogenez

HA patolojisinin nedenleri arasında kromozomal, endokrinolojik, anatomik, enfeksiyöz durumlar ve otommünite yer alsa da HA etiyolojisi net olarak bilinmemektedir (18). Olguların yarısından fazlasının spesifik bir nedeni bulunamamasından dolayı, bu olgulara açıklanamayan HA denir ve büyük ölçüde fetomaternal immüntoleransın başarısızlığı ile ilişkilidir (26, 27). Bu abortuslarda tetikleyici immünolojik faktörler güncel tıbbi araştırmaların önemli odak noktalarından biridir (2).

Döllenme ile birlikte fetüsler paternal antijenler eksprese ederler. Bu nedenle başarılı bir gebelik için annenin fetüse karşı immüntoleransının gelişmesi gerekmektedir (3). Gebelikte fetomaternal ara yüzde lokalize Treg hücrelerinin genetik düzenlemeleri, fetüse karşı immün tolerans ve patojenlere karşı defans mekanizmalarında yer alır. Özellikle Treg ve Th17 hücreleri arasındaki denge maternal toleransa aracı olur (9). Treg hücrelerindeki disfonksiyon immün ilişkili gebelik komplikasyonlarına katkı sağlayabilir (3). Son çalışmalar Treg ve Th17 hücreleri arasındaki dengenin bozulmasının açıklanamayan HA patofizyolojisi ile ilişkili olabileceğini savunmaktadır (9). Açıklanamayan HA olgularında periferik kandan yapılan akım sitometrik çalışmada Treg hücre oranının azaldığı, Th17 hücre oranının arttığı rapor edilmiştir (28). Ayrıca farklı bir çalışmada bu gebelerde periferik Treg hücrelerinin artmadığı; maternal fetal arayüzde Treg hücreleri, CTLA-4 ve TGF- β 1 seviyelerinin azaldığı ve IL6, TNF-alfa ve Th17/Treg hücre oranının arttığı gösterilmiştir (29).

Çalışmamızda farklı spontan abortus olgularına ait küretaj materyallerinde desiduadaki Treg hücre sayıları CD25 immunohistokimyasal yöntemi ile değerlendirilmiş olup ilk trimestir gebelik kayıpları arasında HA yanısıra, IVF sonrası abortus olgularının patogeneğine ışık tutmak ve gelecekte yapılacak tedavi araştırmalarına yol göstermek hedeflenmektedir. Çalışmamız IVF sonrası gebelik kayıplarında Treg hücre sayısını inceleyen literatürdeki ilk çalışmadır.



2. MATERYAL METOD

2.1 Olgu seçimi

Bu çalışmaya 2012-2020 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde tanı almış ilk trimester abortus materyalleri dahil edilmiştir. Çalışmanın etik kurallar açısından onayı, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Bilimsel Çalışmalar Etik Kurulu tarafından verilmiştir. Maternal hastalık ya da kromozomal anomali öyküsü olan vakalar dışlanmış olup, kalan olgular missed abortus, HA, IVF sonrası spontan abortus ve kontrol grubu olan istemli düşük materyalleri olarak dört gruba ayrılmıştır. Grupların her birinde 24 olmak üzere toplam 96 vaka çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil olan olgulara ait hematoksilen eosin boyalı kesitler, bir araştırmacı tarafından (MCC) ışık mikroskopunda tekrar değerlendirilmiş ve en fazla desidua içeren bloklardan hazırlanan kesitler immunohistokimya için seçilmiştir.

2.2. CD25 immünohistokimyasal incelemesi

Çalışmanın immunohistokimyasal inceleme için gereken bütçesi, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destek Fonu'ndan karşılanmıştır. Seçilen bloklardan hazırlanan kesitlere Treg hücrelerinin sayısını değerlendirmek amacı ile CD25 immünohistokimyasal analizi uygulanmıştır. Bu amaçla uygulanan yöntem aşağıdaki basamakları içermektedir:

1. Lizinli lamlara alınan 3 mikron kalınlığında kesitler, 60 dakikalık etüvde 2 saat bekletildikten sonra, Ventana Benchmark Ultra cihazına yüklendiler.

2. Cihazda lamlara antijen retrival olarak 64 dakika CC1 solüsyonu uygulandıktan sonra, 44 dakika, 37 °C’de CD25 (4C9) (Ventana) “mouse monoklonal antibody” uygulandı.
3. Zemin boyaması olarak da hematoksilen uygulanıp, lamlara kapatma yapıldı.

İmmunohistokimyasal yöntem ile belirlenen CD25 pozitif Treg hücrelerinin immunboyanma özellikleri, birbirinden bağımsız iki araştırmacı (EÖ, MCC) tarafından her olguda yoğunluk (1-3 arası) ve dağılım (1-3 arası) olarak ayrı ayrı skorlandıktan sonra, elde edilen iki skorun çarpımı şeklinde kombine edilerek, 0-9 arası Q skoru elde edildi (Tablo 1 ve 2).

Tablo 1. CD 25 immünohistokimyasındaki immunboyanmanın yoğunluk skorlaması

Boyanma yok	0
Zayıf boyanma, sadece BBA’da görünüyor.	1
Orta yoğunluk, KBA’da zorla görünüyor.	2
Kuvvetli boyanma, KBA’da kolayca görünüyor.	3

*BBA: Büyük büyütme alanı, KBA: Küçük büyütme alanı

Tablo 2. CD 25 immünohistokimyasındaki immunboyanmanın dağılım skorlaması

< %5 immunreaktif hücreler var	0
% 5-33 immunreaktif hücreler var	1
% 34-66 immunreaktif hücreler var	2
≥ 67% of immunreaktif hücreler var	3

2.3 İstatistiksel Analiz

Veriler IBM SPSS Statistics v.22 yazılım programında istatistiksel analiz açısından değerlendirilmiştir. Gruplar arasında Q skor ortalamalarının farklı olup olmadığı One-Way ANOVA testi ile analiz edilmiş ve anlamlı bulunduğu durumlarda hangi ikili gruplar arasında anlamlığın olduğunu bulmak için Post Hoc (Banferroni t testi) testi uygulanmıştır. Analizler sonucunda p değeri 0.05'ten küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



3. BULGULAR

3.1 Demografik veriler

Çalışmamıza dahil ettiğimiz 4 ayrı grubun demografik özellikleri Tablo 3'te özetlenmiş olup, Tablo 4'te liste olarak belirtilmiştir. Missed abortus grubundaki olgularda ortalama anne yaşı 36,4 olup, ortalama gestasyon haftası 8,4 haftadır. HA grubunda ortalama anne yaşı 33,6 olup, ortalama gestasyon haftası 8,7 haftadır. IVF sonrası abortus grubunda ortalama anne yaşı 33,5 olup, ortalama gestasyon haftası 8,8 haftadır. Kontrol grubu olan istemli düşüklerde ise ortalama anne yaşı 32,8 olup, ortalama gestasyon haftası 7,2 haftadır. Gruplar arasında anne yaşı ve gestasyon haftası yönünden istatistiksel fark yoktur.

Tablo 3. Çalışma gruplarında ortalama anne yaşı ve gestasyon haftaları

	Anne Yaşı (ortalama)	Gestasyon Haftası (ortalama)
MissedAbortus	36,4	8,4
Habituel Abortus	33,6	8,7
IVF- Abortus	33,5	8,8
İstemli Düşük	32,8	7,2

Tablo 4. Tüm olguların anne yaşı ve gestasyon haftaları

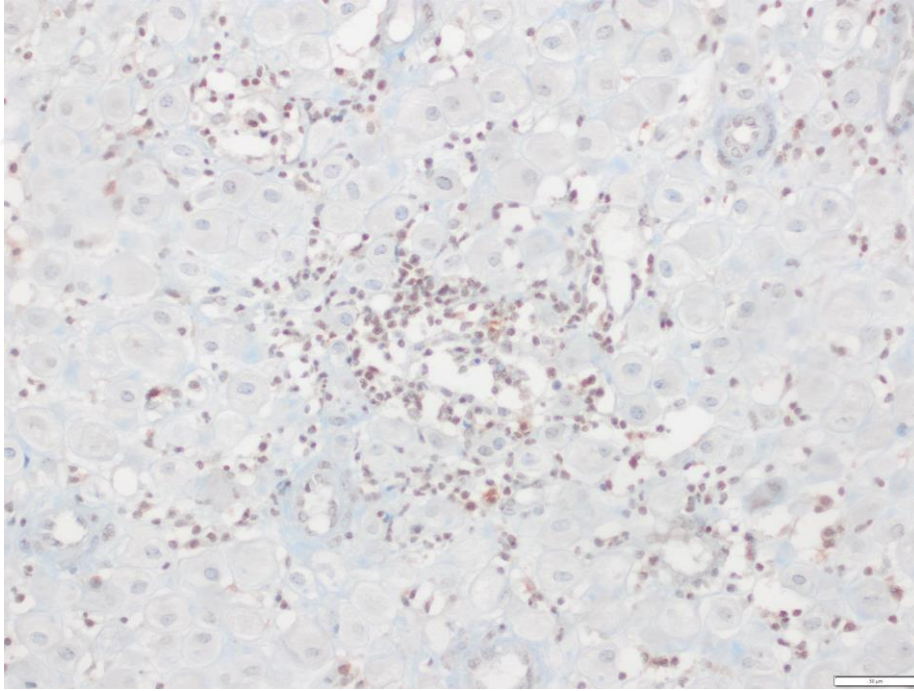
Olgu no	Çalışma Grubu	Yaş	Gestasyon Haftası
1	SPONTAN ABORTUS	33	9
2	SPONTAN ABORTUS	34	12
3	SPONTAN ABORTUS	35	8
4	SPONTAN ABORTUS	32	12
5	SPONTAN ABORTUS	28	10
6	SPONTAN ABORTUS	20	10
7	SPONTAN ABORTUS	24	9
8	SPONTAN ABORTUS	34	10
9	SPONTAN ABORTUS	29	12
10	SPONTAN ABORTUS	38	11
11	SPONTAN ABORTUS	34	10
12	SPONTAN ABORTUS	24	12
13	SPONTAN ABORTUS	27	11
14	SPONTAN ABORTUS	43	10
15	SPONTAN ABORTUS	42	9
16	SPONTAN ABORTUS	37	10
17	SPONTAN ABORTUS	29	8
18	SPONTAN ABORTUS	35	9
19	SPONTAN ABORTUS	31	8
20	SPONTAN ABORTUS	37	12
21	SPONTAN ABORTUS	43	8
22	SPONTAN ABORTUS	33	9
23	SPONTAN ABORTUS	36	10
24	SPONTAN ABORTUS	27	10
25	HABİTÜEL ABORTUS	46	8
26	HABİTÜEL ABORTUS	36	12
27	HABİTÜEL ABORTUS	37	8
28	HABİTÜEL ABORTUS	36	11
29	HABİTÜEL ABORTUS	28	9
30	HABİTÜEL ABORTUS	29	9
31	HABİTÜEL ABORTUS	46	6
32	HABİTÜEL ABORTUS	34	6
33	HABİTÜEL ABORTUS	36	8
34	HABİTÜEL ABORTUS	25	12
35	HABİTÜEL ABORTUS	35	8
36	HABİTÜEL ABORTUS	47	8
37	HABİTÜEL ABORTUS	33	9
38	HABİTÜEL ABORTUS	41	8
39	HABİTÜEL ABORTUS	41	8
40	HABİTÜEL ABORTUS	20	8
41	HABİTÜEL ABORTUS	34	9
42	HABİTÜEL ABORTUS	37	9
43	HABİTÜEL ABORTUS	24	12
44	HABİTÜEL ABORTUS	33	7
45	HABİTÜEL ABORTUS	40	7
46	HABİTÜEL ABORTUS	46	8
47	HABİTÜEL ABORTUS	21	8
48	HABİTÜEL ABORTUS	38	12

Tablo 4. Olguların anne yaşı ve gestasyon haftaları (devam)

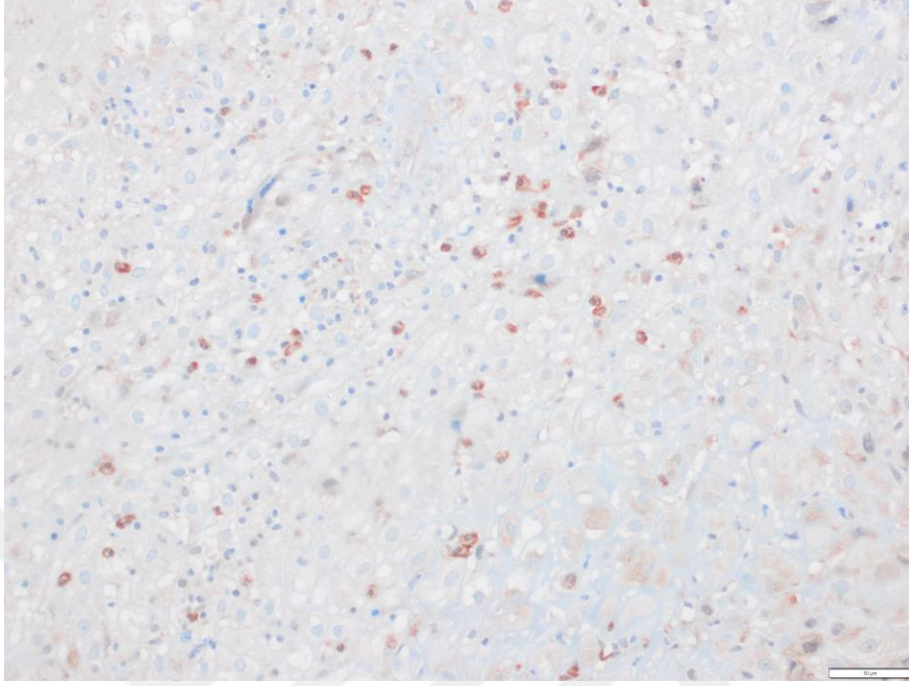
Olgu no	Çalışma Grubu	Yaş	Gestasyon haftası
49	IVF-ABORTUS	37	9
50	IVF-ABORTUS	38	12
51	IVF-ABORTUS	39	9
52	IVF-ABORTUS	33	10
53	IVF-ABORTUS	44	9
54	IVF-ABORTUS	39	8
55	IVF-ABORTUS	32	9
56	IVF-ABORTUS	30	6
57	IVF-ABORTUS	31	9
58	IVF-ABORTUS	33	8
59	IVF-ABORTUS	36	8
60	IVF-ABORTUS	32	9
61	IVF-ABORTUS	23	10
62	IVF-ABORTUS	30	9
63	IVF-ABORTUS	32	11
64	IVF-ABORTUS	34	7
65	IVF-ABORTUS	29	8
66	IVF-ABORTUS	31	8
67	IVF-ABORTUS	37	9
68	IVF-ABORTUS	30	10
69	IVF-ABORTUS	29	12
70	IVF-ABORTUS	32	9
71	IVF-ABORTUS	35	7
72	IVF-ABORTUS	36	5
73	KONTROL GRUBU	41	6
74	KONTROL GRUBU	28	7
75	KONTROL GRUBU	31	8
76	KONTROL GRUBU	37	6
77	KONTROL GRUBU	36	9
78	KONTROL GRUBU	33	9
79	KONTROL GRUBU	22	9
80	KONTROL GRUBU	38	7
81	KONTROL GRUBU	25	8
82	KONTROL GRUBU	38	9
83	KONTROL GRUBU	36	7
84	KONTROL GRUBU	33	8
85	KONTROL GRUBU	29	7
86	KONTROL GRUBU	33	7
87	KONTROL GRUBU	31	8
88	KONTROL GRUBU	37	5
89	KONTROL GRUBU	41	5
90	KONTROL GRUBU	36	6
91	KONTROL GRUBU	29	7
92	KONTROL GRUBU	33	7
93	KONTROL GRUBU	37	6
94	KONTROL GRUBU	29	10
95	KONTROL GRUBU	29	6
96	KONTROL GRUBU	36	6

3.2 İmmünohistokimyasal bulgular

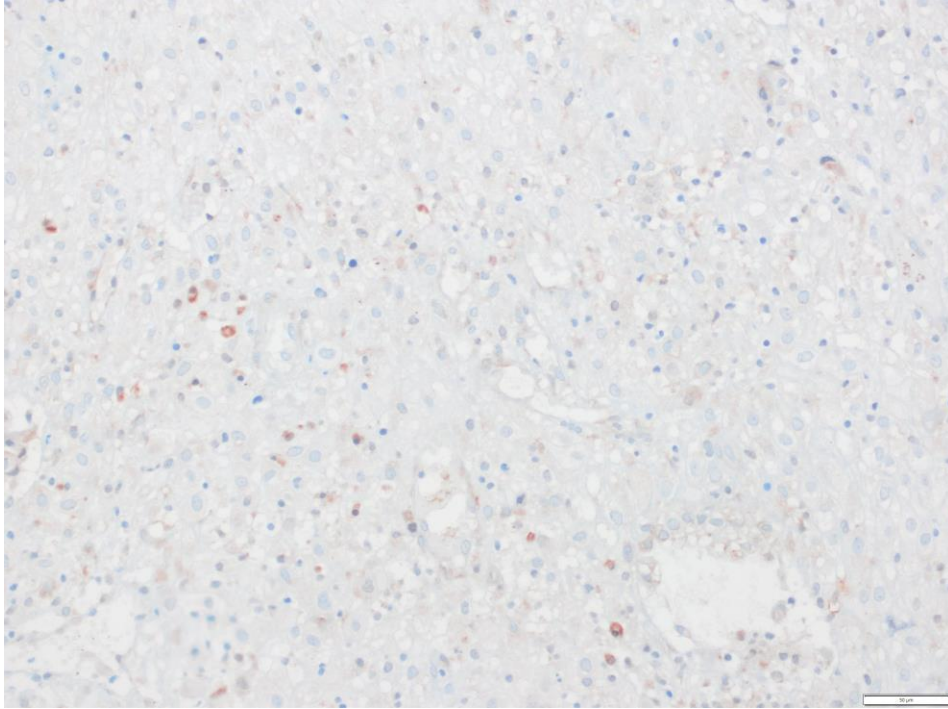
Çalışmamıza dahil edilen 4 grupta CD25 immünohistokimyasal boyaması ile pozitif bulunan Treg hücreleri için skorlama yapılmıştır (Resim 1-4). Değerlendirme sonuçlarının dökümü Tablo 5’te gösterilmiştir. Missed abortus grubundaki olguların ortalama yoğunluk skoru 2.25, ortalama dağılım skoru 1.67 ve ortalama Q skoru 3.96’dır. HA grubunda ortalama yoğunluk skoru 1.75, ortalama dağılım skoru 1.67 ve ortalama Q skoru 3.25’tir. IVF abortus grubunda ortalama yoğunluk skoru 1.87, ortalama dağılım skoru 1.4 ve ortalama Q skoru 3.62’dir. Kontrol grubu olan istemli düşük olgularında ise ortalama yoğunluk skoru 2.33, ortalama dağılım skoru 2.37 ve ortalama Q skoru ise 5.46’dır. (Tablo 6).



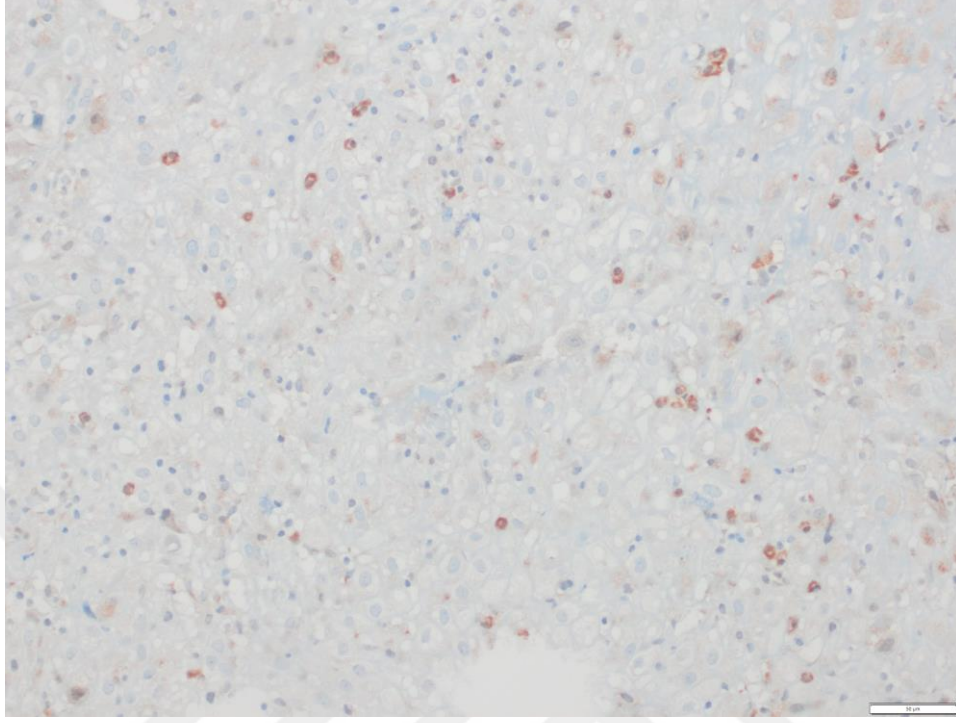
Resim 1. Kontrol grubunda yüksek Q skoru: CD25 Treg hücreleri sayıca göreceli olarak daha yüksek oranda izlendi.



Resim 2. Spontan abortus grubunda, desidual CD25 pozitif Treg hücreleri sayıca azalmıştı.



Resim 3. Habitual abortus grubunda, desidual Treg hücreleri sayıca belirgin azalmıştı.



Resim 4. IVF abortus grubunda, desidual Treg hücreleri sayıca belirgin azalmıştı.

Tablo 5. Çalışma gruplarının CD25 boyanması açısından yoğunluk, dağılım ve Q skorları

OLGU NO	GRUP	Yoğunluk skoru	Yaygınlık skoru	Q skoru
1	SPONTAN ABORTUS	0	0	0
2	SPONTAN ABORTUS	2	2	4
3	SPONTAN ABORTUS	1	1	1
4	SPONTAN ABORTUS	1	1	1
5	SPONTAN ABORTUS	0	0	0
6	SPONTAN ABORTUS	1	1	1
7	SPONTAN ABORTUS	0	0	0
8	SPONTAN ABORTUS	2	1	2
9	SPONTAN ABORTUS	2	2	4
10	SPONTAN ABORTUS	3	2	6
11	SPONTAN ABORTUS	2	1	2
12	SPONTAN ABORTUS	2	3	6
13	SPONTAN ABORTUS	2	3	6
14	SPONTAN ABORTUS	2	3	6
15	SPONTAN ABORTUS	2	2	4
16	SPONTAN ABORTUS	3	2	6
17	SPONTAN ABORTUS	2	2	4
18	SPONTAN ABORTUS	3	2	6
19	SPONTAN ABORTUS	3	2	6
20	SPONTAN ABORTUS	3	2	6
21	SPONTAN ABORTUS	3	2	6
22	SPONTAN ABORTUS	3	2	6
23	SPONTAN ABORTUS	3	2	6
24	SPONTAN ABORTUS	3	2	6
25	HABİTÜEL ABORTUS	2	1	2
26	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
27	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
28	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
29	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
30	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
31	HABİTÜEL ABORTUS	2	1	2
32	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
33	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
34	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
35	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
36	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
37	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
38	HABİTÜEL ABORTUS	1	1	1
39	HABİTÜEL ABORTUS	0	0	0
40	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
41	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
42	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
43	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
44	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
45	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
46	HABİTÜEL ABORTUS	2	2	4
47	HABİTÜEL ABORTUS	0	0	0
48	HABİTÜEL ABORTUS	1	1	1

Tablo 5 (devam)

OLGU NO	GRUP	Yoğunluk skoru	Yaygınlık skoru	Q skoru
49	IVF ABORTUS	0	0	0
50	IVF ABORTUS	1	1	1
51	IVF ABORTUS	3	2	6
52	IVF ABORTUS	3	2	6
53	IVF ABORTUS	0	0	0
54	IVF ABORTUS	2	2	4
55	IVF ABORTUS	0	0	0
56	IVF ABORTUS	0	0	0
57	IVF ABORTUS	3	2	6
58	IVF ABORTUS	2	1	2
59	IVF ABORTUS	0	0	0
60	IVF ABORTUS	0	0	0
61	IVF ABORTUS	3	2	6
62	IVF ABORTUS	3	2	6
63	IVF ABORTUS	3	2	6
64	IVF ABORTUS	2	3	6
65	IVF ABORTUS	3	1	3
66	IVF ABORTUS	3	2	6
67	IVF ABORTUS	3	2	6
68	IVF ABORTUS	1	1	1
69	IVF ABORTUS	2	3	6
70	IVF ABORTUS	2	2	4
71	IVF ABORTUS	3	2	6
72	IVF ABORTUS	3	2	6
73	KONTROL GRUBU	2	2	4
74	KONTROL GRUBU	2	2	4
75	KONTROL GRUBU	2	2	4
76	KONTROL GRUBU	3	2	6
77	KONTROL GRUBU	2	2	4
78	KONTROL GRUBU	2	2	4
79	KONTROL GRUBU	3	2	6
80	KONTROL GRUBU	3	3	9
81	KONTROL GRUBU	2	2	4
82	KONTROL GRUBU	3	2	6
83	KONTROL GRUBU	2	2	4
84	KONTROL GRUBU	2	2	4
85	KONTROL GRUBU	3	2	6
86	KONTROL GRUBU	2	3	6
87	KONTROL GRUBU	2	3	6
88	KONTROL GRUBU	2	3	6
89	KONTROL GRUBU	2	3	6
90	KONTROL GRUBU	2	3	6
91	KONTROL GRUBU	2	2	4
92	KONTROL GRUBU	2	2	4
93	KONTROL GRUBU	3	2	6
94	KONTROL GRUBU	3	3	9
95	KONTROL GRUBU	3	3	9
96	KONTROL GRUBU	2	3	6

3.3 İstatistiksel analiz bulguları

Gruplar arasında Q skor ortalamalarının farklı olup olmadığı One-Way ANOVA testi ile değerlendirilmiş olup, p değeri 0,003 olduğundan dolayı gruplar arası anlamlı fark vardır. Bu farkın nereden kaynaklandığı saptamak için yapılan post hoc testinde; kontrol grubu ile HA ve IVF-abortus grubu arasında anlamlı fark olduğu (sırasıyla $p= 0,003$ ve $p= 0,02$), ancak kontrol grubu ile missed abortus grupları arasında ise anlamlı fark bulunmadığı ($p=0,09$) saptanmıştır. HA ve IVF-abortus olgularında desidual CD25 pozitif Treg hücrelerinin sayısı ve ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı görülmektedir.

Tablo 6: Çalışma grupları ortalama Q skorları ve standart sapmalar

Grup	Ortalama	N	Std. Dev.
Missed Abortus	3,96	24	2,39
Habituel Abortus	3,25	24	1,39
IVF Abortus	3,62	24	2,67
Kontrol Grubu	5,46	24	1,67

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda HA ve spontan abortus ile komplike olan IVF olgularında, desidual CD25 pozitif Treg hücrelerinin sayısı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmış olarak bulunmuştur. Bu durum spontan abortuslar içerisinde, diğer spontan abortuslardan farklı olarak bu iki gruba özgü bir bulgudur. Dolayısıyla Treg hücrelerinin niceliksel özelliği, HA yanısıra IVF sonrası abortus gelişimi ile ilişkili olabilir.

Gebelik ile ilgili 17 çalışmanın meta analiz incelemesinde, kontrol grubundaki kadınlara kıyasla HA olgularda hem periferik kanda hem de desiduada Treg hücrelerinin sayısı ve işlevselliğinin azaldığı gösterilmiştir (30). Benzer şekilde preeklampsili kadınlarda da hem periferde hem de desiduada azalmış Treg hücre sayıları ve periferik kan Treg sinyallerinde bozulma bulunmuştur (31-33). Periferik kandaki Th17 ve Treg hücrelerinin dengesi ile ilgili farklı bir araştırmada, daphnetin isimli maddenin nedeni açıklanamayan HA olgularında Th17 tipi sitokinleri ve IL2'yi azalttığı gibi Treg tipi TGFB1 ve IL6 gibi sitokinleri ise arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca bu araştırmada daphnetin isimli maddenin RoRyt/FOXP3 oranında düşüşe ve Treg hücrelerinden yana artışa neden olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle bu madde ile tedavinin gebeliğin devamlılığına katkı sağlayabileceği belirtilmiştir (34).

Sağlıklı gebelikler ile HA ile sonuçlanan olguları karşılaştıran bir araştırmada kromozom anomalisi olmayan 30 hastaya Ig (immünoglobulin) ve HCG (human koryonik gonadotropin hormon) kombine tedavisi uygulandıktan sonra, akım sitometri ile Treg ve Th17 hücre sayıları saptanıp kıyaslanmıştır. Tedavi öncesinde kontrol grubuna göre HA'lı grupta periferik kandaki ve desidudaki Th17 hücre sayısı daha yüksek iken Treg hücre sayısı daha düşüktür. Tedavi sonrası ise tedavi öncesi hasta gruba kıyasla, Th17 hücre oranı daha düşük ve Treg hücre oranı daha

yüksek saptanmıştır. Böylelikle Th17 ve Treg hücre dengesi Treg lehine tersine dönmüştür. Bu çalışmaya göre Ig ile kombine HCG tedavisinin, olumsuz gebelik sonuçlarında düzelme sağlayabileceği düşünülmüştür (35).

Yeterli nitelikteki embriyolara rağmen rekürren implantasyon başarısızlığı yaşayan kadınlarda, endometrial mikro çevre anahtar faktör olabilir. Bu esnada endometriumdaki immün hücrelerin yarısından çoğu doğal immün sisteme ait uterin NK hücreleridir. Makrofajlar, dendritik hücreler ve Treg hücreler gibi adaptif immün T hücreler de bulunur. Rekürren implantasyon başarısızlığında, kan ve endometriumda CD57+/CD56+ NK hücrelerinin oranının artmış olduğu bulunmuştur. Bu oran kandaki FOXP3+ Treg hücre sayısı ile ters orantılı olarak gösterilmiştir (36). Ayrıca FOXP3 gen polimorfizmi ile HA arasında ilişki saptayan araştırmalar da vardır (3, 37). Klinik çalışmalar normal gebe kadınlara kıyasla bu gebelerde CD4 +, CD25 + ve FOXP3 + Treg ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını göstermiştir (38, 39). Ayrıca geç folliküler fazda periferik CD4 + CD25 + FOXP3 + Treg hücre yüzdelерinin azalmış olması, yapay donör sperm inseminasyonu başarısızlığı ile ilişkilidir (26). FOXP3 + Treg hücrelerinin gebeliğin sürdürülmesindeki önemi açık iken, farklı FoxP3– Treg türlerinin de konuyla ilişkisinin belirlenmesi gerekmektedir. Süpresif kapasitesi kanıtlanmış olan FOXP3 - Treg hücreleri desiduada bulunur ve bu yüzden, görünüme göre maternal mikroçevreye katkı sağlamaktadırlar (40).

Treg hücrelerinin farklı alt grupları olup, bunlar farklı fenotip özelliklere sahiptir ve farklı şekillerde fonksiyon gösterirler. Hangi mekanizmaların Treg hücrelerini desiduaya gerçek anlamda çektiği açıklığa kavuşturulmayı beklemektedir. Treg hücrelerinin çoğaldıkları yerler olan desiduada veya lenf düğümlerinde antijen sunan hücreler (APC'ler) tarafından lokal olarak aktive ediliyor olabilir ya da fetal antijenlere spesifik olabilirler (40). Farelerde fetüse özgü

Treg'lerin, semen maruziyetinden kısa bir süre sonra uterusu drene eden lenf düğümlerinde tespit edilebildiği ve gebelikle birlikte sayılarının arttığı da gösterilmiştir (41).

Erken HA olgularında PD-1 (Programlı hücre ölüm reseptörü 1) ve PD-L1 (Programlı hücre ölüm ligandı 1) ile Treg hücreleri arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada, Treg hücrelerinde PD-L1 molekülü ve mRNA seviyeleri daha düşük bulunmuştur. Bu durum Treg hücrelerinin PD-1/PD-L1 yolağı üzerinden maternal-fetal immün toleransa, immünsüpresyon yönünde katkı yaptığı şeklinde yorumlanmıştır (42). Mikroarray yaklaşımı ile yapılan ilk çalışmada desidual hücrelerde gen ekspresyonu değerlendirilmiş; sonucunda immunité ve hücre invazyonu ile ilişkili genlerin HA etyopatogenezinde rol oynadığı öne sürülmüştür (43).

Treg hücrelerini hem periferik kanda hem de desiduada değerlendiren çalışmalar mevcuttur. Literatürde Treg hücrelerinin saptanması için en sık kullanılan yöntem akım sitometri olsa da CD25 ve FOXP3 immünohistokimyalarını uygulayan nadir araştırmalar da vardır (44). Biz bu çalışmamızda Treg hücrelerini saptamak için CD25 immünohistokimyasını kullandık. Ayrıca CD25 immünohistokimyası ile değerlendirme yapan çalışmalar içinde, ek olarak boyanma dağılım ve yoğunluğunu ayrı ayrı skorlamamız çalışmamızın özgün yönüdür.

CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg hücrelerinin açıklanamayan HA üzerindeki etkilerini ve etki mekanizmasını araştıran bir başka çalışmada, akım sitometri ve ELİSA yöntemleri ile periferik kanda bu hücrelerin sayısı ve enflamatuar sitokin konsantrasyonları ölçülmüştür. Abortusa yatkın bir fare modeli oluşturmak için CBA/JxDBA/2J eşleşmesi kullanılmış ve model farelere, Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) antagonisti olan E5564 ile TLR4 agonisti lipopolisakarit uygulanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada açıklanamayan HA'lı kadınlarda CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg hücrelerinin sayısının düşük olduğu ve inflammatuar yanıtın fazla olduğu

gösterilmiştir. Bu bulgu bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla uyumludur. Fare modelinde ise Toll like reseptör (TLR) antagonisti E5564'ün CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg hücre sayısını arttırdığı, inflamatuvar yanıtı azalttığı ve FOXP3 mRNA ve protein ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. TLR4 agonisti lipopolisakkaritlerin ise bu bakımdan ters yönde etkileri olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak bizim bulgularımızı açıklayacak tarzda, CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg hücrelerinin, HA olgularında homeostazisi TLR4/nuclear factor-kB yolağı üzerinden yönettiği çıkarımı yapılmış ve TLR4 antagonisti olan E5564 maddesinin HA tedavisinde kullanılabilecek yeni bir potansiyel ilaç olabileceği belirtilmiştir. (26)

Farklı bir çalışmada ise immünsüpresan siklosporin A kullanımının HA öyküsü olan gebelerde ko-inhibitör molekülleri artırarak periferik kandaki Th17 hücre oranını azalttığı ve Treg hücrelerini baskın hale getirdiği saptanmıştır. Aynı çalışmada ayrıca, geleneksel anne bakım ilacı olan progesteronun, HA tedavisinde birkaç yardımcı inhibitör molekülün seviyelerini düzenleyen bir immünomodülatör role sahip olduğu da öne sürülmüştür (45).

Treg hücrelerinin gebelikteki rolü ile ilgili 17 çalışmanın sistematik bir incelemesinde, kontrol grubundaki gebelere kıyasla HA kadınlarda hem periferik kanda hem de desiduada Treg'lerin sayısı ve işlevselliğinin azaldığı gösterilmiştir (30). Aluvihare ve ark. (46) farelerdeki Treg hücrelerinin fetal allogreft toleransı olayında çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir. T hücre eksikliği olan gebe farelere, CD25 pozitif Treg hücreleri özelliği tükenmiş lenfositlerin uygulanması ile yapılan adoptif transfer deneyleri abortus ile sonuçlanmıştır. Aradaki nedensel ilişkiyi güçlendiren bir diğer çalışma ise anti CD25 monoklonal antikorlarının transferinin farelerde implantasyon başarısızlığına yol açtığını göstermektedir (47). Ayrıca, gebeliğin indüklediği CD4⁺ CD25⁺ Treg'lerin uygulanması, düşük yapmaya meyilli hamile fareleri fetüs

rejeksiyonundan korumuştur (48, 49). Bütün bu sonuçlar çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir.

Ayrıca son çalışmalar Treg ve Th17 hücreleri arasındaki dengenin bozulmasının açıklanamayan HA patofizyolojisi ile ilişkili olabileceğini savunmaktadır. Normalde desiduada bir Th17 hücresi popülasyonu bulunur ve maternal-fetal arayüzü mikrobiyal enfeksiyonlardan koruduğu düşünülür. Th17 hücreleri genellikle proinflamatuvar özelliktedir ve hamilelik sırasında popülasyon genişler (50). Ancak bu genişlemenin Treg hücreleri tarafından düzenlendiği öne sürülmüştür (51, 52). Treg hücreleri tarafından düzenlenen immuntolerans ile Th17 hücrelerinin rol oynadığı koruma arasındaki dengeyi sağlamak kritiktir. Bu denge Th17/Treg hücre oranı olarak tanımlanır (46, 53).

İmmünolojik faktörlerin gebelik başarısızlığında önemli bir rol oynadığı gösterildiğinden, implantasyon sırasında uygun immün yanıtların oluşturulması başarılı bir gebelik için kritik öneme sahiptir (9). Bu faktörler antifosfolipid antikorları (54, 55), antitiroid antikorları (56, 57), antinükleer antikorlar (58), antiovaryan antikorlar (59) ve artmış IgM (60) seviyeleri gibi humoral immün anormallikleri yanı sıra NK hücresi artışı (61, 62, 63) ya da süpresör T hücre azalması (64) gibi hücrel immün anormallikleri içerir. HA olgularında periferik kandan yapılan akım sitometrik çalışmada Treg hücre oranının azaldığı, Th17 hücre oranının arttığı rapor edilmiştir (28). İnsanlarda yapılan kimi çalışmalarda ise farklı olarak, HA olgularında kontrol grubuna göre desidua ve periferik kandaki Treg sayısı azalmıştır (65, 66). Ancak bu çalışmalarda Treg hücreleri için farklı belirteçler kullanılmış olup, farklı kontrol grupları ve abortus için farklı tanımlar mevcuttur.

İmmüfenotipe göre değerdendirilen Treg hücreleri çalışmalarına ek olarak, bazı çalışmalarda HA öyküsü olan kadınlar ile normal fertil kadınlarda bu hücrelerin fonksiyonel özellikleri incelemiştir. Arruvito ve ark. (67) periferik kandaki Treg hücrelerin, karışık bir lenfosit reaksiyonunda paternal allo-stimölasyona yanıt olarak, hem kontrol grubundan hem de HA olgularından üretilen CD4⁺ CD25⁻ efektör hücrelerin proliferasyonunu inhibe etme yeteneğini değerdendirmiştir. HA öyküsü olan kadınlarda sağlıklı, HA öyküsü olmayan kadınların seviyesinde süpresyon yapabilmek için daha fazla CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg hücresinin gerektiğini bildirmişlerdir. Bao ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada, CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ Treg hücrelerinin, HA olgularının desidualarındaki efektör T hücrelerinin proliferasyonu üzerinde daha düşük bir inhibitör etkisi olduğu gösterilmiştir (68). Ayrıca başka bir çalışmada ise Treg hücrelerinin inhibitör etkilerine aracılık eden IL10 ve TGF- β 'nın HA olgularında kontrol grubuna göre Treg hücrelerinde azalmış olduğu gösterilmiştir (68-71) .

Teshnizi ve ark. (3), FOXP3'te saptanan iki single nükleotid polimorfizm (SNP) ile immün ilişkili gebelik komplikasyonları arasında anlamlı bir korelasyon göstermiştir. Ancak bu SNP değışikliğı sadece abortus değil, ayrıca preeklampsi ve endometriozisli gebeleri içeren çeşitli gebelik komplikasyonlarını da içermektedir. Dolayısıyla bu bulgu spontan abortus olgularına özgü bir durum değildir.

HA olgularına ait çalışmalarda elde edilen bu veriler, maternal fetal arayüzde normal immün homeostazı düzeltmek amacıyla çeşitli immün tedavilerin geliştirilmesine ve kullanılmasına yol açmıştır. Bu immün modölatorlerden biri intravenöz immünoglobulin (IVIg) kullanımıdır (9). İmmünoglobulinler, bağışıklık sisteminin hümoral kolu olan B lenfositleri ve plazma hücreleri tarafından üretilen proteinlerdir. Beş immünoglobulin sınıfı arasında IgG insan serumunda bulunan en yaygın antikor tipidir ve bakteriyel ve viral enfeksiyonlarla savaşmak için

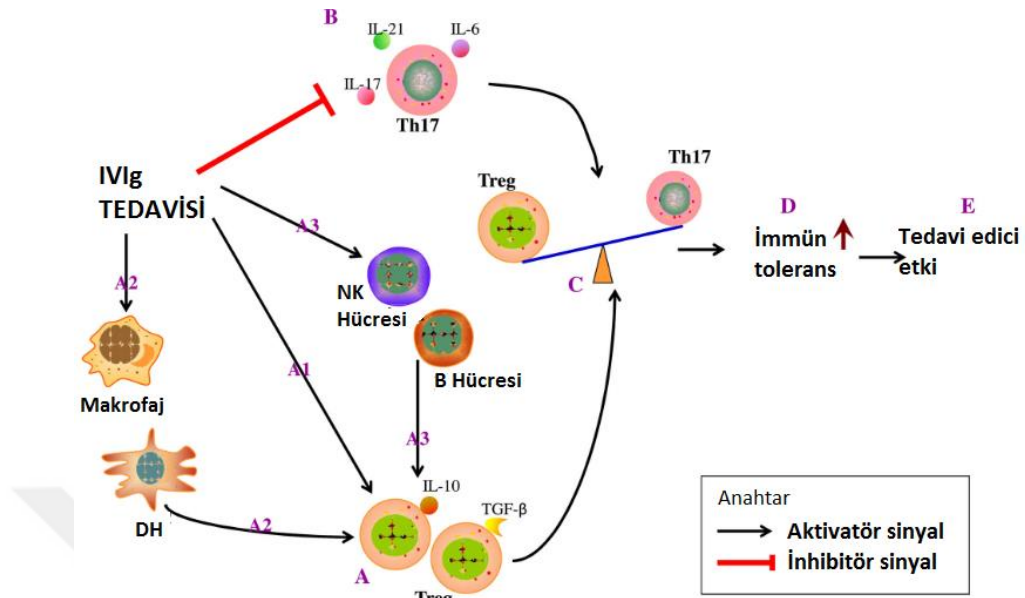
en önemli olanıdır (72-74). IVIg, normal kan donörlerinin plazmasından IgG fraksiyonları ekstrakte edilerek yapılır ve 1000-15.000 donör serumunun havuzundan hazırlanır. IVIg, antikor eksiklikleri gibi immünolojik bozuklukları olan hastalarda tercih edilen tedavi yöntemidir (75). Aslında immünomodülatör etkileri nedeniyle çok sayıda immün ve inflamatuvar bozuklukta da kullanılmaktadır (76-79).

Günümüzde gebelikte immüntolerans ile ilişkili tedavi edici yöntemler konusunda az sayıda çalışma vardır. Otoimmün aracılı gebelik/üreme yetmezliğinin tedavisi için önerilen tedavilerden biri sağlıklı donörlerin plazmasından türetilen geniş bir antikor yelpazesini içeren intravenöz immünoglobulin (IVIg) infüzyonunu içerir. Geçmiş yıllarda IVIg, HA ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığından muzdarip kadınlarda canlı doğum oranını iyileştirmek için kullanılmıştır (80-82). IVIg'in ana etki mekanizması NK hücre inhibisyonu, antijen sunan hücrelerin işlevlerinin modülasyonu, sitokinlerin ve otoantikorların nötralizasyonu, B hücre farklılaşmasının inhibisyonu ve Treg hücrelerin artışı ile ilgilidir (83-88). Farklı bir çalışmada ise doğum eyleminin, Treg hücre fonksiyonunda azalma ve mononükleer hücre aktivitesiyle ilişkili olduğu öne sürülmüştür (89). IVIg ile ilgili yapılan farklı bir araştırmada ise tregitopların immün aracılı gebelik kayıplarında terapötik müdahale için potansiyel araç olabileceği belirtilmiştir (90).

Mueller-Eckhardt ve ark (9) HA olguları için IVIg bazlı tedaviyi ilk kullanan araştırmacılarıdır. HA için terapötik yaklaşım için önerilen gerekçe, normalde annenin bağışıklık sistemi tarafından fetüsü immünolojik reddedilmeye karşı korumak için üretilen bloke edici antikorların HA olgularında eksik olduğu hipotezine dayanmaktadır. Yazarlar IVIg'nin geniş bir donör havuzunda işlendiği için, bu preparatların muhtemelen fetüsü immünolojik rejeksiyondan koruyabilecek spesifik antikorlar içermesi gerektiğini öne sürmüşlerdir. HA olgularında

kullanılan intravenöz immünoglobulin, daha önce HA tedavisinde uygulanan allojenik lenfositlerle aktif immünizasyonun aksine, pasif immünizasyon olarak adlandırılmıştır. IVIg'in, parental lenfositler ile aktif immünizasyondan daha avantajlı olduğu, başarılı gebelik ve doğum oranlarına yol açtığı ve daha az yan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (9).

Başlangıçta HA öyküsü olan kadınlarda IVIg tedavisinin önemli bir yararı olduğu öne sürülmüştür (91, 92). Ancak daha sonraki randomize, plasebo kontrollü çalışmalarda hiçbir yararlı etki bulunamamıştır (93, 94). Dolayısıyla HA olgularında IVIg uygulamasının terapötik etkinliği ve avantajı konusunda fikir birliği yoktur. Bununla birlikte Treg hücre popülasyonunun genişlemesinin, IVIg'in bağışıklık sistemini modüle ettiği mekanizmalardan biri olabileceği ve anormal Th17/Treg oranı ile karakterize belirli bir hasta grubunda etkili olduğu da öne sürülmüştür. IVIg'in Treg hücre popülasyonunun genişlemesini ve Th17 hücrelerinin baskılanmasını indükleyebileceği önerilen mekanizma Şekil 2'de sunulmuştur. IVIg tedavisi, Treg hücrelerinin proliferasyonunu ve ilgili sitokinlerin ekspresyonunu artırarak etki eder. IgG'nin T hücreler ile doğrudan etkileşimini veya diğer hücrel hedeflerin, genellikle de dendritik hücre (DH) ve makrofajlar gibi APC'lerin modülasyonunu içerebilir. Ayrıca B hücreleri veya NK hücreleri gibi diğer hücrelerle etkileşime girebilir. IVIg tedavisi ayrıca, Th17 hücrelerinin ve bunların ilgili sitokinlerinin proliferasyonunu ve olgunlaşmasını inhibe ederek de etki eder. IVIg tedavisi, Th17/Treg hücre dengesini azaltarak, bağışıklık toleransını artırır ve başarılı bir gebeliğin sürmesini sağlayabilir (9).



Şekil 2. İntravenöz immünoglobulinin (IVIg) tedavisinin etki mekanizması (9)

Sayıca sınırlı olmalarına rağmen, Treg hücrelerinin Th17 hücreleri ile oranını değiştirmeye yönelik Daphnetin, HCG, siklosporin A gibi tedavilere yanıtı inceleyen farklı çalışmalar da bulunmaktadır (34, 35, 26). Ancak bu tedaviler ile gebelik sonuçlarının korelasyonu konusundaki sorular henüz yanıtlanmamış ve tartışmalı olmuştur. Bu yönüyle yaptığımız çalışma hem bu çalışmalar için destekleyici, hem de yeni araştırmalar için ön açıcı niteliktedir.

HA olgularında Treg'lerinin seviyeleri ve işlevi azalmıştır. Bu etki periferik kandan daha çok plasentada analiz edilen Treg'ler için belirgindir. Ancak aradaki ilişkiyi nedensel olarak açıklayabilmek için ek moleküler çalışmalar yanısıra kohort çalışması yapılmasına ihtiyaç vardır (30). Treg hücrelerinin etki mekanizmalarını daha detaylı araştırmak için, uterus anormalliği gibi bilinen bir nedeni olan HA olguları ile nedeni açıklanmayan idiyopatik HA olgularını içeren bir kohort çalışması yapılabilir. Her iki grupta Treg hücrelerinin sayıca azaldığı gösterilebilirse, bu azalma spontan abortusun genel bir sonucunu işaret edebilir.

Yardımcı üreme teknikleri, IVF ve ICSI (“Intra Cytoplasmic Sperm Injection”) ile gerçekleşen gebelikler arasında abortus ile sonuçlanan vakaların hücresel ve moleküler özelliklerini inceleyen bir araştırmada, ister doğal yolla ister yardımcı üreme teknikleri ile olsun, spontan abortusun gebelik ile ilgili en sık görülen komplikasyon olduğu belirtilmiş ve bunların yarısından fazlasında kromozomal anormalliklerin neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadaki veriler ışığında, ilk trimester kayıplarının gebeliklerin doğal gebelik, IVF veya ICSI ile gerçekleştiğine bakılmaksızın %59 ile %64 arasında değişen oranlarda kromozomal anormalliklerden kaynaklandığını ve karyotipleme sonuçlarının dağılımında istatistiksel bir farklılık bulunmadığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar yardımcı üreme tekniklerinin normal gebeliğe kıyasla sitogenetik riski artırmadığını gösteren diğer çalışmalarla uyumludur. Ayrıca önceki çalışmalarda anöploidi oranlarının, konvansiyonel IVF ve ICSI grupları arasında hiçbir korelasyon göstermediğini doğrular şekildedir. Sonuç olarak fetüsün kromozomal anormalliği, gebeliklerin doğal gebelik, IVF veya ICSI yoluyla gerçekleşmesinden bağımsız olarak spontan abortuslarının ilk trimesterde ana nedenidir (95).

Treg hücreleri ve spontan abortus ilişkisinden yola çıkılarak abortus riskini öngörmek açısından, Treg hücrelerinin sayı ve ekspresyonu eşik değerlerle gruplandırılabilir. Ancak literatürdeki çalışmaların çoğu çalışma gruplarının ortalama Treg hücre değerlerini paylaşmıştır ve geniş bir analiz için yeterli datayı sağlamamaktadır. Bizim bu çalışmada tüm olguları tek tek boyanma özelliklerine göre tablo olarak paylaşmamız, bu açıdan ilerde farklı araştırmalar için veri sağlama özelliği taşımaktadır. Bir eşik değeri belirlemek için “Bireysel Hasta Verileri” incelemesi önerilir (96). Geleneksel meta-analizin aksine, bireysel hasta verilerin meta analizi, orijinal çalışmaların verilerini kullanır ve bir “cut-off” değerinin hesaplanmasını sağlayan bireysel düzeyde analize izin verir. Farklı kohortlar arasındaki Treg değerleri değişebilse de bir

eşik değere ulaşabilmek için aynı aralıkta Treg değerlerine sahip kohortlardan veri alınmalıdır. Bu eşik değeri, terapötik bir riski öngörmek için HA olgularında prospektif kohort çalışmalarında kullanılabilir. Kwiatek ve ark. (97) kendi datalarını temel alarak bir “cut-off” değeri belirlemişlerdir. Bu çalışmada kullanılan belirteç CD4⁺ hücrelerin, CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg hücrelerine oranıdır. Eşik değeri %1.50 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre, %70 duyarlılık ve %75 özgüllük ile Treg düzeyi en iyi öngörücü belirteç olarak bildirilmiştir. Ancak bu saptama pratik açıdan tartışmalıdır.

5- SONUÇLAR

1. Çalışmamızda Treg hücrelerinin, özellikle spontan abortus ile komplike olan IVF gebeliklerin etyopatogenezindeki rolünün çalışılmış olması özgün değer taşımaktadır.
2. Desidual CD25+ Treg hücrelerinin sayısı HA ve IVF sonrası spontan abortus gruplarında anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Spontan abortus grubu ile kontrol grubu arasında ise anlamlı fark bulunmamıştır. Dolayısıyla Treg hücreleri niceliksel olarak, HA ve IVF sonrası spontan abortus gelişimi ile ilgili olabilir.
3. Treg hücrelerinin bu konuda önemi ile ilgili kesin bir sonuca varmak için ekspresyon analizi düzeyinde moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.
4. IVIg tedavisinin Treg hücre popülasyonunu genişletici etkisinin olduğunu öne süren çalışmalar ışığında, spontan abortus riskinin öngörüldüğü HA ve IVF olgularında, IVIg tedavisinin etkinliğini ortaya koyacak kanıta dayalı klinik çalışmalara gereksinim vardır.

6-KAYNAKLAR

1. Griebel CP, Halvorsen J, Golemon TB, Day AA. Management of spontaneous abortion. *Am Fam Physician*. 2005 Oct 1;72(7):1243-50. PMID: 16225027.
2. Zhao X, Jiang Y, Wang L, Li Z, Li Q, Feng X. Advances in Understanding the Immune Imbalance between T-Lymphocyte Subsets and NK Cells in Recurrent Spontaneous Abortion. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2018;78(7):677–683. doi:10.1055/a-0634-1813
3. Hosseini Teshnizi, S, Ali-Hassanzadeh, M, Gharesi-Fard, B, Kabelitz, D, Kalantar, K. Influence of forkhead box protein 3 polymorphisms (rs2232365, rs3761548) with the outcome of pregnancy: A meta-analysis. *J Cell Physiol*. 2019; 234: 16573– 16581.
4. McClory, Susan, et al. "Evidence for a stepwise program of extrathymic T cell development within the human tonsil." *The Journal of clinical investigation* 122.4 (2012): 1403-1415.
5. Valor, Larissa, et al. "Estradiol-dependent perforin expression by human regulatory T-cells." *European journal of clinical investigation* 41.4 (2011): 357-364.
6. Aluvihare, Varuna R., and Alexander G. Betz. "The role of regulatory T cells in alloantigen tolerance." *Immunological reviews* 212.1 (2006): 330-343.
7. Li W, Li B, Fan W, et al. CTLA4Ig gene transfer alleviates abortion in mice by expanding CD4 + CD25 + regulatory T cells and inducing indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Reprod Immunol*. 2009;80(1–2):1-11
8. Jimeno R, Leceta J, Garin M, et al. Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect. *J Leukoc Biol*. 2015;98(2):257-269.
9. Muyayalo, KP, Li, Z-H, Mor, G, Liao, A-H. Modulatory effect of intravenous immunoglobulin on Th17/Treg cell balance in women with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*. 2018; 80:e13018
10. Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology*. 2010;129(2):147-153.

11. Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol*. 2010;159(2):109-119.
12. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol*. 2008;9(6):641-649.
13. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*. 2008;454(7202):350-352.
14. Laurence A, O'Shea JJ. T(H)-17 differentiation: of mice and men. *Nat Immunol*. 2007;8(9):903-905.
15. Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med*. 2005;202(7):901-906.
16. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4 + CD25- naive T cells to CD4 + CD25 + regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003;198(12):1875-1886.
17. Jutel M, Akdis M, Budak F, et al. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2003;33(5):1205-1214.
18. Sierra S, Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006; 24: 17–24.
19. John D. Ojule and Rosemary N. Ogu (March 6th 2019). Miscarriage and Maternal Health, Complications of Pregnancy, Hassan Abduljabbar, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.8211
20. R Linnakaari, N Helle, M Mentula, A Bloigu, M Gissler, O Heikinheimo, M Niinimäki, Trends in the incidence, rate and treatment of miscarriage—nationwide register-study in Finland, 1998–2016, *Human Reproduction*, Volume 34, Issue 11, November 2019, Pages 2120–2128

21. Schieve, Laura A., et al. "Spontaneous abortion among pregnancies conceived using assisted reproductive technology in the United States." *Obstetrics & Gynecology* 101.5 (2003): 959-967.
22. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol.* 2009 Spring;2(2):76-83. PMID: 19609401; PMCID: PMC2709325.
23. Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü (2019). *2018 Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması* , Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü, TC Cumhurbaşkanlığı Strateji ve Bütçe Başkanlığı ve TÜBİTAK, Ankara, Türkiye (159, 160)
24. Zollner, Ursula and Dietl, Johannes. "Perinatal risks after IVF and ICSI" *Journal of Perinatal Medicine*, vol. 41, no. 1, 2013, pp. 17-22. <https://doi.org/10.1515/jpm-2012-0097>
25. Wang JX, Norman RJ, Wilcox AJ. Incidence of spontaneous abortion among pregnancies produced by assisted reproductive technology. *Hum Reprod.* 2004 Feb;19(2):272-7. doi: 10.1093/humrep/deh078. PMID: 14747166
26. Qin S, Li L, Liu J, Zhang J, Xiao Q, Fan Y, Wei X. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells regulate immune balance in unexplained recurrent spontaneous abortion via the Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B pathway. *J Int Med Res.* 2020 Dec;48(12):300060520980940. doi: 10.1177/0300060520980940. PMID: 33356705; PMCID: PMC7768580.
27. Arjmand F, Ghasemi N, Mirghanizadeh SA, et al. The balance of the immune system between HLA-G and NK cells in unexplained recurrent spontaneous abortion and polymorphisms analysis. *Immunol Res* 2016; 64: 785–790.
28. Yang Yang, Laiyang Cheng, Xiaohui Deng, Hongling Yu, Lan Chao, Expression of GRIM-19 in unexplained recurrent spontaneous abortion and possible pathogenesis, *Molecular Human Reproduction*, Volume 24, Issue 7, July 2018, Pages 366–374

29. Jinfeng Qian, Na Zhang, Jing Lin, Caiyan Wang, Xinyao Pan, Lanting Chen, Dajin Li, Ling Wang. Distinct pattern of Th17/Treg cells in pregnant women with a history of unexplained recurrent spontaneous abortion. *Biosci Trends*. 2018 May 13;12(2):157-167. doi: 10.5582/bst.2018.01012
30. Keller CC, Eikmans M, van der Hoorn M-LP, Lashley LEELO. Recurrent miscarriages and the association with regulatory T cells; A systematic review. *J Reprod Immunol*. (2020) 139:103105. doi: 10.1016/j.jri.2020.103105
31. Zare M, Namavar Jahromi B, Ghareisi-Fard B. Analysis of the frequencies and functions of CD4(+)CD25(+)CD127(low/neg), CD4(+)HLA-G(+), and CD8(+)HLA-G(+) regulatory T cells in pre-eclampsia. *J Reprod Immunol*. (2019) 133:43–51. doi: 10.1016/j.jri.2019.06.002
32. Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, et al. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*. (2007) 149:139–45. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03397.x
33. Han X, Ghaemi MS, Ando K, Peterson LS, Ganio EA, Tsai AS, et al. Differential Dynamics of the Maternal Immune System in Healthy Pregnancy and Preeclampsia. *Front Immunol*. (2019) 10:1305. doi: 10.3389/fimmu.2019.01305
34. Zhang Z, Long S, Huang Z, Tan J, Wu Q, Huang O. Regulatory effect of daphnetin on the balance of Th17 and Treg cells in the peripheral blood mononuclear cells from patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Cent Eur J Immunol*. 2020;45(4):403-408. doi: 10.5114/ceji.2020.103414. Epub 2021 Jan 30. PMID: 33658888; PMCID: PMC7882414.
35. Guo Z, Xu Y, Zheng Q, Liu Y, Liu X. Analysis of chromosomes and the T helper 17 and regulatory T cell balance in patients with recurrent spontaneous abortion. *Exp Ther Med*. 2020 Apr;19(4):3159-3166. doi: 10.3892/etm.2020.8537. Epub 2020 Feb 21. PMID: 32256804; PMCID: PMC7086275.
36. Jiang, R, Yan, G, Wang, Z, et al. Abnormal ratio of CD57+ cells to CD56+ cells in women with recurrent implantation failure. *Am J Reprod Immunol*. 2017; 78:e12708.

37. Faezeh Naderi-Mahabadi, Saeed Zarei, Ramina Fatemi, Koorosh Kamali, Zhamak Pahlavanzadeh, Mahmood Jeddi-Tehrani, Tohid Kazemi, Farah Idali. Association study of forkhead box P3 gene polymorphisms with unexplained recurrent spontaneous abortion, *Journal of Reproductive Immunology*, Volume 110, 2015, 48-53
38. Lu Y, Zhang F, Zhang Y, et al. Quantitative reduction of peripheral CD4+CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in reproductive failure after artificial insemination by donor sperm. *Am J Reprod Immunol* 2013; 69: 188–193.
39. Lee S, Kwak-Kim J, Gilman-Sachs A. Expression of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in women with idiopathic recurrent spontaneous abortion and implantation failure: 3-color flow cytometric analysis. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55: 412–413
40. Krop J, Heidt S, Claas FHJ, Eikmans M. Regulatory T Cells in Pregnancy: It Is Not All About FoxP3. *Front Immunol*. 2020 Jun 23;11:1182. doi: 10.3389/fimmu.2020.01182. PMID: 32655556; PMCID: PMC7324675.
41. Shima T, Inada K, Nakashima A, Ushijima A, Ito M, Yoshino O, et al. Paternal antigen-specific proliferating regulatory T cells are increased in uterine-draining lymph nodes just before implantation and in pregnant uterus just after implantation by seminal plasma-priming in allogeneic mouse pregnancy. *J Reprod Immunol*. (2015) 108:72–82. doi: 10.1016/j.jri.2015.02.005
42. Li G, Lu C, Gao J, et al. Association between PD-1/PD-L1 and T regulate cells in early recurrent miscarriage. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(6):6512–6518. Published 2015 Jun 1.
43. S.A. Krieg, X. Fan, Y. Hong, Q.-X. Sang, A. Giaccia, L.M. Westphal, R.B. Lathi, A.J. Krieg, N.R. Nayak, Global alteration in gene expression profiles of deciduas from women with idiopathic recurrent pregnancy loss, *MHR: Basic science of reproductive medicine*, Volume 18, Issue 9, September 2012, Pages 442–450
44. Pichler, Renate & Fritz, Josef & Zavadil, Claudia & Schaefer, Georg & Culig, Zoran & Brunner, Andrea. (2016). Tumor-infiltrating immune cell subpopulations influence the oncologic outcome after intravesical Bacillus Calmette-Guérin therapy in bladder cancer. *Oncotarget*. 7. 10.18632/oncotarget.9537.

45. Wang S, Li M, Sun F, Chen C, Ye J, Li D, Qian J, Du M. Th17/Treg-cell balance in the peripheral blood of pregnant females with a history of recurrent spontaneous abortion receiving progesterone or cyclosporine A. *Exp Ther Med*. 2021 Jan;21(1):37. doi: 10.3892/etm.2020.9469. Epub 2020 Nov 17. PMID: 33273967; PMCID: PMC7706386.
46. Aluvihare, Varuna R., Marinos Kallikourdis, and Alexander G. Betz. "Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus." *Nature immunology* 5.3 (2004): 266-271.
47. Shima, Tomoko, et al. "Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice." *Journal of reproductive immunology* 85.2 (2010): 121-129.
48. Zenclussen, Ana Claudia, et al. "Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model." *The American journal of pathology* 166.3 (2005): 811-822.
49. Zenclussen, Ana C., et al. "Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface." *European journal of immunology* 36.1 (2006): 82-94.
50. Lissauer D, Goodyear O, Khanum R, Moss PA, Kilby MD. Profile of maternal CD4 T-cell effector function during normal pregnancy and in women with a history of recurrent miscarriage. *Clin Sci (Lond)*. 2014;126(5):347-354.
51. Robertson SA, Guerin LR, Bromfield JJ, Branson KM, Ahlstrom AC, Care AS. Seminal fluid drives expansion of the CD4 + CD25 + T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biol Reprod*. 2009;80(5):1036-1045.
52. Balandya E, Wieland-Alter W, Sanders K, Lahey T. Human seminal plasma fosters CD4(+) regulatory T-cell phenotype and transforming growth factor-beta1 expression. *Am J Reprod Immunol*. 2012;68(4):322-330.
53. Lee JH, Ulrich B, Cho J, Park J, Kim CH. Progesterone promotes differentiation of human cord blood fetal T cells into T regulatory cells but suppresses their differentiation into Th17 cells. *J Immunol*. 2011;187(4):1778-1787

54. Blank M, Cohen J, Toder V, Shoenfeld Y. Induction of anti-phospholipid syndrome in naive mice with mouse lupus monoclonal and human polyclonal anti-cardiolipin antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(8):3069-3073.
55. Rand JH, Wu XX, Andree HA, et al. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome—a possible thrombogenic mechanism. *N Engl J Med*. 1997;337(3):154-160.
56. Stagnaro-Green A, Roman SH, Cobin RH, el-Harazy E, Alvarez-Marfany M, Davies TF. Detection of at-risk pregnancy by means of highly sensitive assays for thyroid autoantibodies. *JAMA*. 1990;264(11):1422-1425.
57. Mecacci F, Parretti E, Cioni R, et al. Thyroid autoimmunity and its association with non-organ-specific antibodies and subclinical alterations of thyroid function in women with a history of pregnancy loss or preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2000;46(1):39-50.
58. Xu L, Chang V, Murphy A, et al. Antinuclear antibodies in sera of patients with recurrent pregnancy wastage. *Am J Obstet Gynecol*. 1990;163(5 Pt 1):1493-1497.
59. Geva E, Fait G, Lerner-Geva L, et al. The possible role of antiovary antibodies in repeated in vitro fertilization failures. *Am J Reprod Immunol*. 1999;42(5):292-296.
60. Gleicher N, Friberg J. IgM gammopathy and the lupus anticoagulant syndrome in habitual aborters. *JAMA*. 1985;253(22):3278-3281.
61. Kwak JY, Beaman KD, Gilman-Sachs A, Ruiz JE, Schewitz D, Beer AE. Up-regulated expression of CD5 + , CD56 + /CD16 + , and CD19 + cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol*. 1995;34(2):93-99.
62. Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, et al. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet*. 1995;345(8961):1340-1342.
63. Dosiou C, Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev*. 2005;26(1):44-62.

64. Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4 + CD25 + regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod*. 2004;10(5):347-353.
65. Mei, Shanshan, et al. "Changes of CD4+ CD25high regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion patients." *Fertility and sterility* 94.6 (2010): 2244-2247.
66. Inada, Kumiko, et al. "Characterization of regulatory T cells in decidua of miscarriage cases with abnormal or normal fetal chromosomal content." *Journal of reproductive immunology* 97.1 (2013): 104-111.
67. Arruvito, Lourdes, et al. "Expansion of CD4+ CD25+ and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction." *The Journal of Immunology* 178.4 (2007): 2572-2578.
68. Bao, Shi Hua, et al. "Decidual CD4+ CD25+ CD127dim/- regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous miscarriage." *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 155.1 (2011): 94-98.
69. Sereshki, Nasrin, et al. "Variations in T-helper 17 and regulatory T cells during the menstrual cycle in peripheral blood of women with recurrent spontaneous abortion." *International journal of fertility & sterility* 8.1 (2014): 59.
70. Zhang, X. X., X. M. Kang, and A. M. Zhao. "Regulation of CD4+ FOXP3+ T cells by CCL20/CCR6 axis in early unexplained recurrent miscarriage patients." *Genet. Mol. Res* 14 (2015): 9145-9154.
71. Zhu, Liqiong, et al. "Treg/Th17 cell imbalance and IL-6 profile in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion." *Reproductive Sciences* 24.6 (2017): 882-890.
72. Oxelius VA. Immunoglobulin G (IgG) subclasses and human disease. *Am J Med*. 1984 Mar 30;76(3A):7-18. doi: 10.1016/0002-9343(84)90314-0. PMID: 6369977.

73. Pirofsky, Bernard. "Intravenous immune globulin therapy in hypogammaglobulinemia: a review." *The American journal of medicine* 76.3 (1984): 53-60.
74. ulshrestha, Reena, T. S. Srinivasa, and Jayant Biswas. "Role of immunoglobulin G and A in periodontitis: A review." *J Pure Appl Microbiol* 7.1 (2013): 673-676.
75. Hanna, Kim, et al. "Intravenous immune globulin use in Canada." *The Canadian journal of clinical pharmacology= Journal canadien de pharmacologie clinique* 10.1 (2003): 11-16.
76. Newburger, Jane W., et al. "The treatment of Kawasaki syndrome with intravenous gamma globulin." *New England Journal of Medicine* 315.6 (1986): 341-
77. Imbach, Paul. "Immune thrombocytopenic purpura and intravenous immunoglobulin." *Cancer* 68.S6 (1991): 1422-1425.
78. Klassen, Lynell W., Leonard H. Calabrese, and Ronald M. Laxer. "Intravenous immunoglobulin in rheumatic disease." *Rheumatic Disease Clinics* 22.1 (1996): 155-173.
79. Hughes, Richard AC, Anthony V. Swan, and Pieter A. van Doorn. "Intravenous immunoglobulin for Guillain-Barré syndrome." *Cochrane Database of Systematic Reviews* 9 (2014).
80. Yamada, H. et al. A high dose intravenous immunoglobulin therapy for women with four or more recurrent spontaneous abortions. *ISRN Obstet. Gynecol.* 2012, 512732 (2012)
81. Bozic Antic, I. et al. Recurrent spontaneous abortions, Hashimoto thyroiditis and alopecia totalis: response to anticoagulation and intravenous immunoglobulin therapy. *Gynecol. Endocrinol.* 30, 100–102 (2014).
82. Vaquero, E. et al. Pregnancy outcome in recurrent spontaneous abortion associated with antiphospholipid antibodies: a comparative study of intravenous immunoglobulin versus prednisone plus low-dose aspirin. *Am. J. Reprod. Immunol.* 45, 174–179 (2001)
83. Schwab, I. & Nimmerjahn, F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat. Rev. Immunol.* 13, 176–189 (2013).
84. Baerenwaldt, A., Biburger, M. & Nimmerjahn, F. Mechanisms of action of intravenous immunoglobulins. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 6, 425–434 (2010).

85. Fettke, F., Schumacher, A., Costa, S.-D. & Zenclussen, A. C. B cells: the old new players in reproductive immunology. *Front. Immunol* 5, 285 (2014).
86. Han, A. R. & Lee, S. K. Immune modulation of i.v. immunoglobulin in women with reproductive failure. *Reprod. Med. Biol* 17, 115–124 (2018).
87. Padet, L. & Bazin, R. IVIg prevents the in vitro activation of T cells by neutralizing the T cell activators. *Immunol. Lett.* 150, 54–60 (2013).
88. Kessel, A. et al. Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function. *J. Immunol.* 179, 5571–5575 (2007).
89. Shah NM, Edey LF, Imami N, Johnson MR. Human labour is associated with altered regulatory T cell function and maternal immune activation. *Clin Exp Immunol.* 2020 Feb;199(2):182-200. doi: 10.1111/cei.13384. Epub 2019 Nov 3. PMID: 31617583; PMCID: PMC6954681.
90. Kedzierska, A.E., Lorek, D., Slawek, A. et al. Tregitopes regulate the tolerogenic immune response and decrease the foetal death rate in abortion-prone mouse matings. *Sci Rep* 10, 10531 (2020).
91. Stricker, Raphael B., Alex Steinleitner, and Edward E. Winger. "Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy for immunologic abortion." *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2.3 (2002): 187-199.
92. Stricker, Raphael B., et al. "Successful treatment of immunologic abortion with low-dose intravenous immunoglobulin." *Fertility and sterility* 73.3 (2000): 536-540.
93. Christiansen, Ole B., et al. "A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intravenous immunoglobulin in the prevention of recurrent miscarriage: evidence for a therapeutic effect in women with secondary recurrent miscarriage." *Human Reproduction* 17.3 (2002): 809-816.
94. Stephenson, Mary D., et al. "Intravenous immunoglobulin and idiopathic secondary recurrent miscarriage: a multicentered randomized placebo-controlled trial." *Human Reproduction* 25.9 (2010): 2203-2209.

95. Wu, T., Yin, B., Zhu, Y. et al. Molecular cytogenetic analysis of early spontaneous abortions conceived from varying assisted reproductive technology procedures. *Mol Cytogenet* 9, 79 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13039-016-0284-2>
96. Keller, Caroline C., et al. "Recurrent miscarriages and the association with regulatory T cells; A systematic review." *Journal of reproductive immunology* 139 (2020): 103105.
97. Kwiatek, Maciej, et al. "Peripheral dendritic cells and CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in the first trimester of normal pregnancy and in women with recurrent miscarriage." *PLoS One* 10.5 (2015): e0124747.

