



**T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

ANNE SERUMUNDAKİ ÇÖZÜNEBİLİR HLA-G DÜZEYLERİNİN MİSSED ABORTUSLAR İLE İLİŞKİSİ

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR. FATİH KESKİN**

DÜZCE-2012



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

ANNE SERUMUNDAKİ ÇÖZÜNEBİLİR HLA-G DÜZEYLERİNİN MISSED ABORTUSLAR İLE İLİŞKİSİ

DR. FATİH KESKİN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

YARD. DOÇ. DR. AHMET KARATAŞ
TEZ DANIŞMANI

DÜZCE-2012

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında daima beni destekleyen ve yanımda olan eşim ve aileme. Eğitimimde ve tezimin yazımında büyük katkıları olan Yrd. Doç. Dr. Ahmet Karataş'a. Tezimin düzeltilmesinde katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Mustafa Albayrak ve Prof. Dr. Serdar Dilbaz'a.

Dr. Fatih KESKİN

Düzce-2012

ÖZET

Giriş ve Amaç: Fetal genlerin yarısı baba kaynaklıdır ve gebelikte annede fetüse karşı immün toleransın nasıl geliştiği açık değildir. Fetal dokuların reddini önleyen moleküllerden biri de, aynı zamanda anne serumunda da saptanabilen çözünebilir HLA-G (sHLA-G)'dir. Bu molekül başlıca ekstrasvillöz trofoblastlar, plasental makrofajlar ve mezenkimal koryonik villuslardaki endotelial hücreler tarafından üretilir. sHLA-G, gebe olmayan kadınların serumunda da saptanmasına rağmen gebelerde daha yüksek düzeylerde saptanır. Gebelik kayıplarının patogeneğinde maternal immün tolerans ile ilgili sorunlar olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızın amacı, anne serum sHLA-G düzeylerinin, missed abortus ile olan ilişkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmaya 40 normal ve 40 missed abortus olmak üzere toplam 80 gebe dahil edildi. Rutin gebelik takibi için başvuran olgulara transvajinal ultrasonografi ve laboratuvar parametrelerine ek olarak anne serumundaki sHLA-G düzeyine bakıldı.

Bulgular: Gruplar arasında demografik parametreler açısından fark saptanmadı. Çalışma grubu hastalarının ortanca serum sHLA-G düzeyleri kontrol grubundaki gebelerin ortanca serum sHLA-G düzeylerinden anlamlı olarak daha düşük bulundu ($P < 0,001$).

Sonuç: Missed abortus riski artmış kadınların öngörülmesinde, anne serum sHLA-G ölçümü prenatal tanıda önemli ve yeni bir tanısal araç olabilir.

Anahtar kelimeler: Gebelik kaybı, çözünebilir HLA-G, missed abortus, gebelik komplikasyonları

ABSTRACT (SUMMARY)

Introduction: Half of fetal genome is originated from paternal chromosome, and it is unclear how immune tolerance develops to fetal tissues in pregnancy. Soluble HLA-G (sHLA-G) which is detectable in maternal serum is one of the molecules that prevent fetal rejection in pregnancy. This molecule is expressed by extravillous trophoblasts, placental macrophages and endothelial cells of mesenchymal chorionic villuses. Although sHLA-G is detectable in serum of non-pregnant women at low levels, it is detectable in mainly pregnancy with high serum levels. Problems concerning the maternal immune tolerance are thought to play role in pregnancy wastage. The aim of our study is to detect the relationship between the missed abortus and maternal serum HLA-G levels.

Materials and Methods: 40 women with missed abortuses and 40 women with uncomplicated pregnancies, 80 women in total were included into the study. Serum HLA-G levels were measured in addition to routine transvaginal ultrasonography and laboratory work-up during pregnancy visits.

Results: Demographic parameters were statistically similar between the groups. Median serum HLA-G level in study group was statistically lower than the median serum HLA-G level of control group ($P < 0,001$).

Conclusion: Maternal serum sHLA-G measurement can be used as a new diagnostic tool in predicting the pregnant women with high risk of missed abortus.

Key words: Pregnancy loss, soluble HLA-G, missed abortions, pregnancy complications

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ALT : Alanin Aminotransferaz = SGPT = Serum Glutamik-Piruvik Transaminaz
- AST : Aspartat Aminotransferaz = SGOT = Serum Glutamik-Oksaloasetik Transaminaz
- BUN : Blood Urea Nitrogen = Kan Üre Azotu = Üre nitrojeni
- CRL : Crown-Rump Length (Baş popo mesafesi)
- DC : Dentritik Hücre
- ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- EVT : Ekstravillöz trofoblastlar
- EDTA : Etilen Diamin Tetra Asetik asit
- HLA : Human Lökosit Antijen
- sHLA-G : Soluble Human Lökosit Antijen-Gestation (Çözünebilir İnsan Lökosit Antijeni-Gebelik)
- IUGR : İntrauterin Gelişme Geriliği
- IVF : İn Vitro Fertilizasyon
- IFN γ : İnterferon gama
- IVIG : İntravenöz immün globulin
- IL8 : İnterlöklin-8
- MHC : *Major Histocompatibility Complex*
- NK : Natural Killer
- PPROM : Preterm Premature Rupture of Membranes
- TNF α : Tümör Nekrozis Faktör Alfa
- SAT : Son adet tarihi
- VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
- VKI : Vücut kitle indeksi

İÇİNDEKİLER

Sayfalar

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iv
İÇİNDEKİLER	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Fertilizasyon, İmplantasyon (Yerleşme) ve Gebelik.....	2
2.2. Plasenta.....	4
2.3. HLA-G.....	8
2.4 Erken Dönem Gebelik Kayıpları (Spontan Düşükler).....	11
2.4.1 Tanımlar.....	11
2.4.1.1 Abortus imminens (Düşük tehdidi).....	11
2.4.1.2 Abortus insipiens (Engellenemez düşük).....	12
2.4.1.3 İnkomplet abortus	12
2.4.1.4 Komplet abortus	12
2.4.1.5 Missed abortus	13
2.4.1.6 Habitüel abortus	13
2.4.2 Patoloji.....	13
2.4.3 Etyoloji	13
2.4.3.1 Bebeğe ait nedenler.....	13
2.4.3.2 Anneye ait nedenler	14
2.4.3.3 Babaya ait nedenler	18
2.4.4 Tanı	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Çalışmanın Yeri.....	19
3.2. Çalışmanın Zamanı.....	19
3.3. Örneklem Biçimi.....	19
3.4. Laboratuar Ölçümleri.....	20
3.5. Gruplar.....	20

3.6. Çalışmanın Şekli.....	20
3.7. İstatistik Analizi.....	21
4. BULGULAR	22
5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇLAR	31
7. KAYNAKLAR	32
8. ETİK KURUL ONAY BELGESİ	39



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fetüsün genlerinin yarısı baba kaynaklıdır ve gebelik süresi boyunca fetüse karşı annedeki immün toleransın nasıl geliştiği açık değildir. Fetal dokuların reddini önleyen moleküllerden biri de, aynı zamanda annenin kanında da saptanabilen çözünabilir insan lökosit antijeni-gebelik (Human Lökosit Antijen – Gestation, sHLA-G)'dir. Bu molekül başlıca ekstrasvillöz trofoblastlar, plasental makrofajlar ve mezenkimal koryonik villuslardaki endotelial hücreler tarafından üretilir. HLA-G antijeni annede spesifik sitotoksik T lenfosit cevabını baskılar ve NK hücrelerinin fonksiyonlarını azaltarak annenin gebelik ürünlerine karşı immün yanıtını engeller.

sHLA-G, gebe olmayan kadınların kanında da saptanmış olmasına rağmen bu konuda gebe kadınların serumunda daha yüksek düzeylerde olduğu bildirilmiştir. Gebeliğin özellikle ilk üç ayında diğer üç aylık dönemlere göre daha yüksek düzeydedir ve gebeliğin sonuna doğru düzeyi giderek azalır. Yapılan çalışmalarda sHLA-G düzeyleri ile gebelik komplikasyonları arasında bir ilişki olabileceği bildirilmesine rağmen görüş birliği ve yeterli prospektif çalışma mevcut değildir. Yapılan çalışmalarda anne kanındaki sHLA-G miktarının intrauterin gelişme geriliği (IUGR), preeklampsi ve spontan abortus gibi durumlarda sağlıklı gebeliklere göre düşük düzeylerde, önlenemeyen preterm eylem olgularında ise yüksek düzeylerde olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada, anne kanındaki sHLA-G düzeylerinin, patogenezinde annenin immün toleransı ile ilgili sorunlar olduğu düşünülen gebelik kaybı vakaları ile olan ilişkisini ve sHLA-G'nin gebelik kaybındaki belirleyiciliğinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Fertilizasyon, İmplantasyon (Yerleşme) ve Gebelik

Konsepsiyondan doğuma kadar geçen sürece gebelik denir. Gebelik kadının son adet tarihinin ilk gününden itibaren başlayarak genellikle 40 haftada sonlanır (1). Yumurta sperm tarafından döllendikten sonra uterusu endometriuma yerleşir. Daha sonra plasenta, embriyo ve en sonunda fetus oluşur (2).

Fertilizasyon sırasında yumurta ve spermin birleşmesi önemli ve ilginç bir süreçtir. Ovulasyon sürecinde overden sekonder oosit ve kumulus-oosite tutunan hücrelerin atılmasına neden olur. Oosit hızlıca fallop tüplerinin infundibulumu tarafından tutulur. Oositin, fallop tüpünden uterusu doğru taşınması, tuba epiteli silialarının uterusu yönlendirilmiş hareketi ve tubanın peristaltizmi ile sağlanır. Fertilizasyon fallop tüpünde gerçekleşir ve kabul edilen görüş, bunun ovulasyondan sonraki birkaç saat içinde ve bir günü geçmeyen bir süreçte olduğudur. Bu olasılıkların olduğu zaman diliminde spermatozoa, oositin varış zamanında fallop tüpünde olmalıdır. Gebeliklerin çoğu ovulasyondan önceki iki gün veya ovulasyon gününde gerçekleşen cinsel ilişki sonucu oluşmaktadır (3,4).

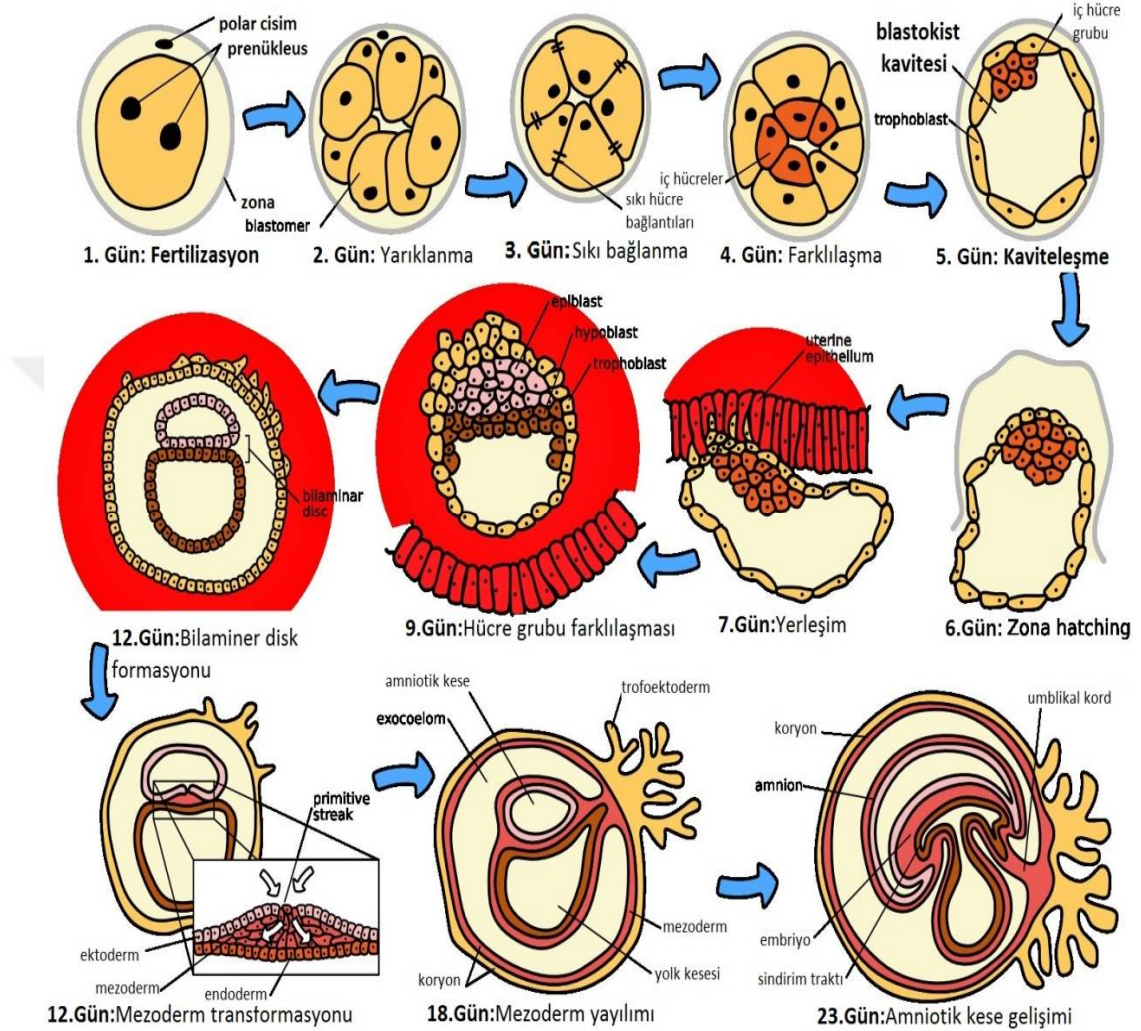
Fertilizasyonu ilgilendiren basamaklar oldukça karmaşıktır. Moleküler mekanizmalar, spermatozoanın foliküler hücreler arasından, zona pellusidanın içinden geçişine ve zigot oluşumuyla sonuçlanan sitoplâzmaya girişine izin verir.

Fallop tüpünde gerçekleşen fertilizasyonun ardından olgun ovum, zigota (46 kromozomlu bir diploid hücre) dönüşür. Daha sonra yarıklanma yoluyla blastomerler oluşur. İki hücreli zigotta, polar cisim ve blastomerler perivitellin sıvı içinde serbesttir ve zigot, kalın zona pellusida ile çevrilidir. Zigot fallop tüpünün içinde 3 gün boyunca yavaş bir şekilde bölünmeye devam eder. Blastomerler bölünmeye devam ettikçe morula olarak adlandırılan, duta benzeyen hücre kitlesi oluşur. Morula uterus boşluğuna fertilizasyondan 3 gün sonra ulaşır. Blastomerler arasında yavaş bir şekilde sıvı birikmesi sonucunda erken blastokist oluşur (3-5) (Şekil 1).

Embriyonun uterus duvarına implantasyonu fertilizasyondan 6-7 gün sonra gerçekleşir. Bu işlem 3 ayrı evreye ayrılabilir:

- 1) Appozisyon; uterus duvarına blastokistin ilk olarak tutunması
- 2) Adezyon; blastokist ile uterus epiteli arasında artmış fiziki temas

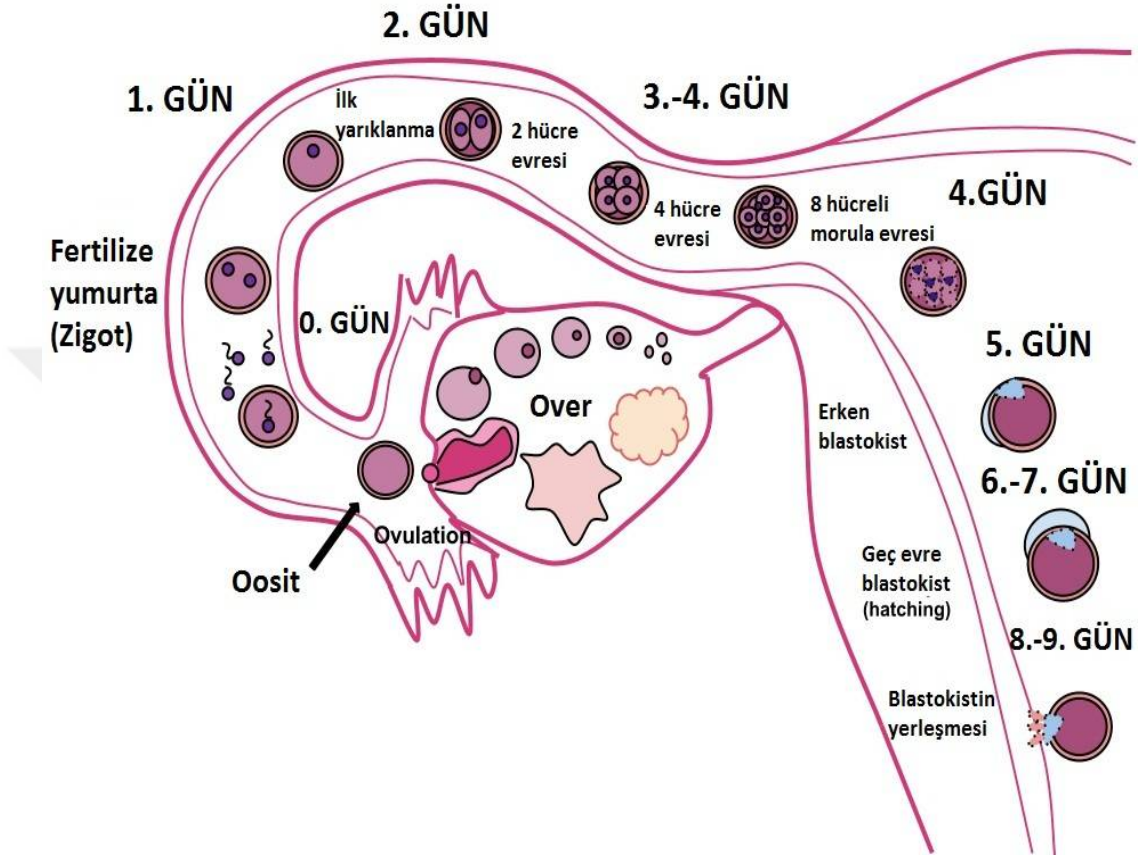
3)İnvazyon; sinsityotrofoblast ile sitotrofoblastların endometrium, myometriumun üçte birlik iç kısmına penetrasyonu ile invazyonu ve uterus damar yapısı (6) (Şekil 2).



Şekil 1: Fertilizasyondan embriyo oluşumuna kadar olan hücre farklılaşması süreci (Zephyris, Human Embryogenesis. svg, View Wikimedia Commons, pregnancy, <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=File:HumanEmbryogenesis.svg&page=1>)

Endometrium ile etkileşmeye başladığında, blastokist 100-250 hücreden oluşan bir yapı şeklindedir. Blastokist endometrium epiteline gevşek bir şekilde yapışır; buna appozisyon denir. İmplantasyon genellikle uterusun üst arka duvarının endometriumunda olur. Blastokist trofoektodermine, appozisyon ve yapışma ile

endometrium yüzeyine bağlanması, bu iki doku arasındaki etkileşimlerle düzenlenmektedir (3-8).



Şekil 2: Ovulasyondan, zigotun endometrium kavitesine yerleştiği ana kadar geçen zamanın şematik gösterimi. (Ttrue12, Human Fertilization View, Wikimedia Commons, pregnancy, http://en.wikipedia.org/wiki/File:Human_Fertilization.png)

2.2 Plasenta

Yarı-allojenik (genetik yapısının diğer yarısını aynı türün farklı bireyinden alan) fetal greftin nasıl hayatta kalabildiği halen tam olarak açıklanamamış bir konudur (2). Birçok teori ileri sürülmüştür. İlk teorilerden biri embriyo-fetusun antijenik immaturite kuramıdır. Bu kuram organ nakli antijenlerinin (HLA), embriyonik yaşamın çok erken evrelerinde var olduğunun gösterilmesiyle çürütülmüştür. Diğer bir teori ise gebelerin immünolojik yanıtlarının azalmış olduğuna dayandırılmaktaydı. Ne var ki bunun bir yardımcı faktör olmasının dışında

bir etken olduğunu gösterebilecek hiçbir kanıt bulunamadı. Bir başka teori ise uterusun (desidua) immünolojik olarak ayrıcalıklı bir doku olduğuydu. Bu teori de ilerlemiş dış gebelik olgularıyla dışlanmıştır. Bu nedenle fetal greftin nasıl hayatta kaldığı bilinmezliğini korumaktadır. Yarı-allogreftin bu başarısının açıklanması, daha başarılı organ nakli cerrahisi ve belki de neoplazinin immünolojik tedavisini daha iyi kavramamızı sağlayacaktır (6-8).

Uterusta diğer dokular ile karşılaştırılsa fetal grefti sağlıklı bir şekilde taşıması ve organ nakli bağışıklığının uterusda oluşmamış olması benzersiz bir durumdur. Bu durum implantasyon ve fetal-plasental gelişim ile ilişkili hücrelerin özelliği ile ilişkilendirilebilir. Burada rol alan hücreler etkin olmayan sitotoksik özellikleri ile desiduada doğal killer (NK) hücreleri, desidual stromal hücreler ve desidua içinde yer alan invaziv trofoblastlardır. Desidual NK hücreler desidual stromal hücreler ile uyum içinde çalışır. Bu hücreler vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor) (VEGF) gibi pro-angiogenik faktörler salgılayarak angiogeneze aracılık ederler ve İnterlökin-8 (IL-8) üreterek spiral arterlere trofoblast kemo-atraksiyonunu kontrol ederler (6,9,10).

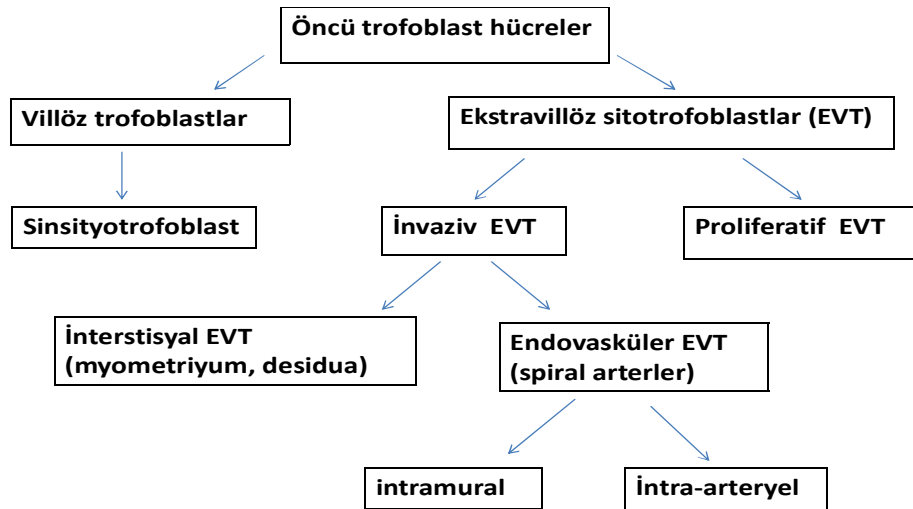
Desidua gebeliğin özelleşmiş, belirgin şekilde değişikliğe uğramış endometriumudur. Desidua ve istila eden trofoblastlar arasındaki özel ilişki görünüşte organ nakli immünolojisi kurallarına karşı gelmektedir (6,10,11).

Plasenta ve fetusun gelişimi fertilizasyondan itibaren başlayan ve devam eden bir süreçtir. Plasentanın normal gelişimi fetal büyüme, gelişim ve sağlıklı bir gebelik için gereklidir. Plasenta anne ve fetus arasında önemli kritik bir rol üstlenmektedir; fetal allogreftin reddedilmesini önler, respiratuar gazların ve besinlerin değişimine izin verir, fetal artıkların atılımını sağlar, peptit ve steroid hormon salgılar (6,11).

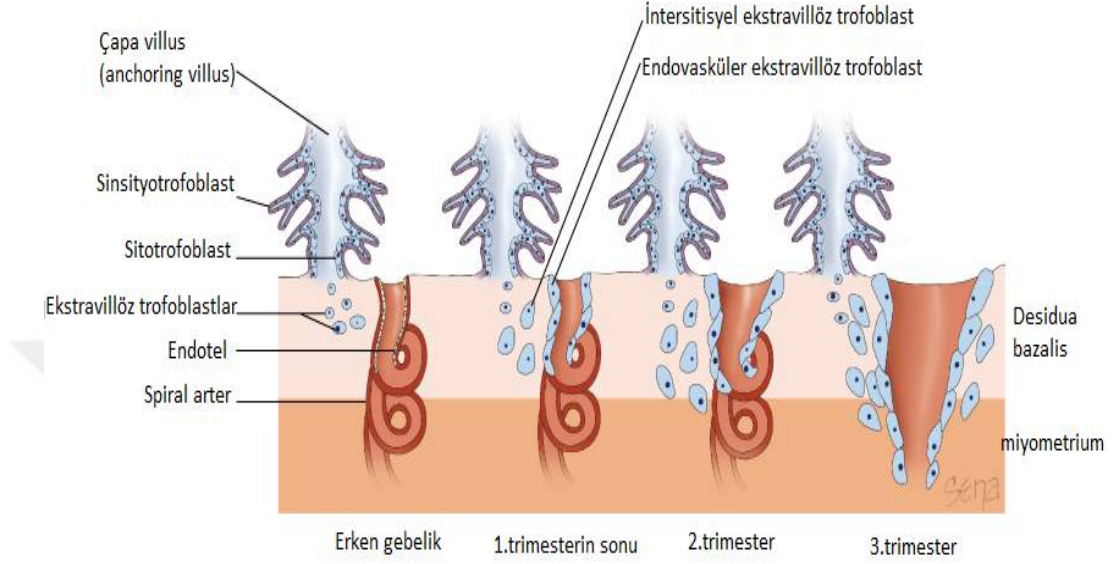
Fetus intrauterin dönem boyunca plasentaya akciğer, karaciğer ve böbrek fonksiyonları açısından bağımlıdır. Plasenta bu fonksiyonlarını anne ile olan anatomik ilişkisi ile başarır. Plasenta anne ile fetusu, uteroplasental damarlardan çıkan maternal kanla dolaylı etkileşimle birbirine bağlar. Fetusun ve annenin kanı bu hemokoryal tip plasentada karışmaz. Bu durum fetus ile anne arasındaki iletişim ile gebelik ürününün annenin immünolojik sistemi tarafından kabul edilmesi için önemli bir düzenlemedir (5).

İnsan plasentasının oluşumu morula (16 hücreli evre) evresindeki farklılaşan ilk doku olan trofo-ektoderm ile başlar. Bu yapı, trofoblast hücre tabakasının oluşumunu başlatır. Sinsityotrofoblastlar blastokist implantasyonundan önce ayırt edilememektedir. Embriyonun uterus duvarına implantasyonu fertilizasyondan 6-7 gün sonra gerçekleşir. Fertilizasyon sonrası 8. günde, blastokist implantasyonu sonrası trofoblastlar dışta sinsityotrofoblast ve iç katmanda sitotrofoblastlara farklılaşır (6,12).

Trofoblastlar implantasyon tamamlandıktan sonra villöz ve ekstravillöz trofoblastlar (EVT) olmak üzere 2 ana yola farklılaşır. Her iki yol anne dokuları ile ilişkili fakat farklı işlevleri olan trofoblast hücre topluluklarını oluşturur. Villöz trofoblastlar plasentanın koryonik villuslarını oluşturur ve anne ile fetus arasında oksijen ve besin alışverişini sağlar. Ekstravillöz trofoblastlar, desidua ve myometrium içine göç eder ve ayrıca annenin damarlarını da penetre ederek farklı maternal hücre tipleriyle ilişkiye girer. Ekstravillöz trofoblastlar interstisiyel trofoblastlar ve endovasküler trofoblastlar olarak farklılaşmaya devam eder. İntersitisiyel trofoblastlar maternal desiduyu invaze eder ve sonuçta plasental yataktaki dev hücreleri oluşturmak için myometrium içine girer. Bu trofoblastlar ayrıca annenin spiral arterlerini de çevreler. Endovasküler trofoblastlar spiral arterlerin lümenine girer (Şekil 3-4) (6,13).



Şekil 3: Trofoblast hücrelerinin farklılaşması (Victoria Roberts, Leslie Myatt, Placental Development and physiology, from UpToDate, September 2012, figure 1)

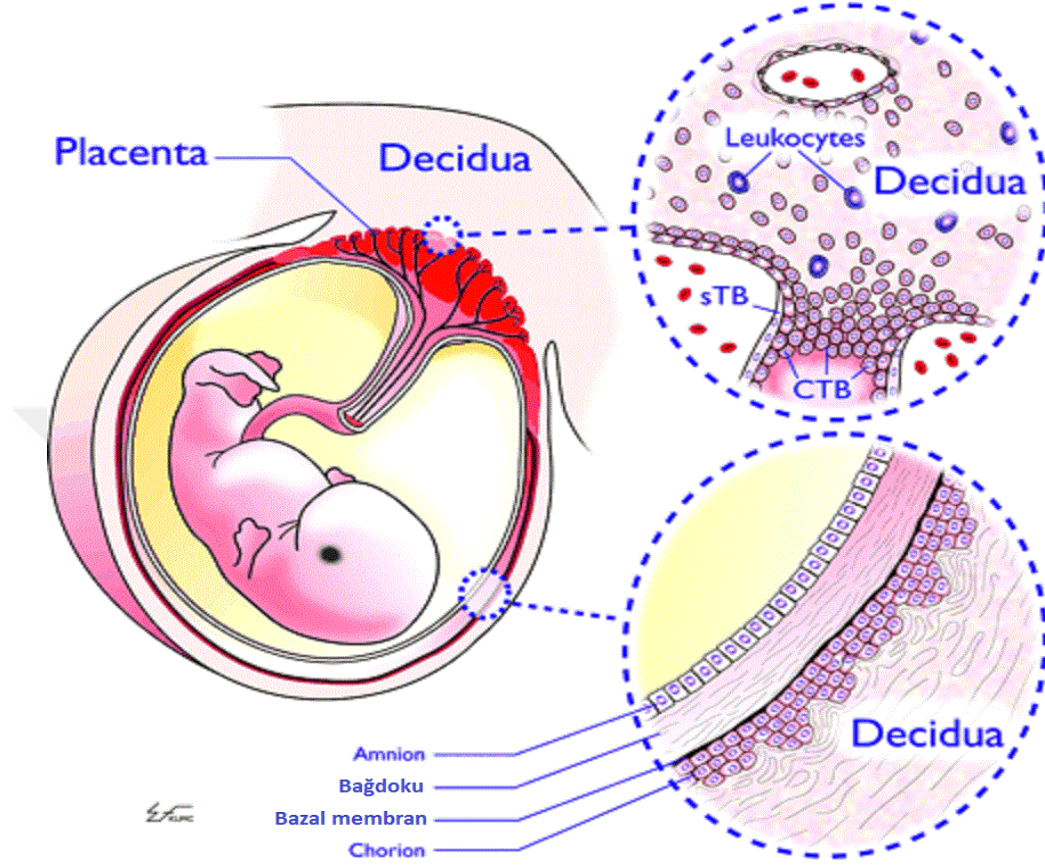


Source: Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong CY: Williams Obstetrics, 23rd Edition: <http://www.accessmedicine.com> Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Şekil 4: Trofoblastlar implantasyon tamamlandıktan sonra, villöz ve ekstravillöz trofoblastlar olmak üzere iki ana yolda daha farklılaşır, her iki yol maternal dokularla ilişkili, fakat işlevleri olan trofoblast hücre topluluklarını oluşturur.

Trofoblastların endometrium içine invazyon mekanizmaları metastaz yapan malign hücrelerin mekanizmaları ile benzerdir. Villöz trofoblastlarda gebeliğin hiçbir evresinde major doku-uyum kompleksi (Major Histocompatibility Complex) (MHC) sınıf I ve sınıf II antijenler bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu hücreler tüm gebelik boyunca immünolojik olarak etkisiz görünmektedir. Buna karşın invaziv EVT hücreleri, MHC sınıf I moleküllerini eksprese eder. İnsandaki MHC proteinlerine HLA da denmektedir. HLA-G antijen ekspresyonu yalnızca desidua içindeki ekstravillöz trofoblastlarda ve koryon laeve de bulunmaktadır (6,13). HLA-G antijeninin uterin NK ve dendritik hücrelerden (DC) her iki hücre grubu ile etkileşmesinin trofoblastik invazyonun düzenlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir. (14) Fetusa karşı oluşan maternal immun toleransın çoklu bir

mekanizması vardır (15). Bu konu ile ilgili moleküller arasında HLA-G de yer alır. HLA-G nin başarılı bir implantasyonda önemli görevleri olduğu bildirilmektedir (16) (Şekil 5).



Şekil 5: İnsan fetusu, plasenta, ekstraplasental membranlar ve decidua (14)

2.3 HLA-G

İnsanın üreme aşamalarından, embriyonun uterusu implantasyonu ve bunun devamı, karışıklığını ve anlaşılmağını sürdürmektedir. Fetusun genetik yapısının yarısı anneden yarısı babadan gelmektedir. Anne için fetusun yarı-allograft olduğu bilinmesine rağmen immun toleransın nasıl oluştuğu net değildir (17-20). Fetusu karşı oluşan maternal immun toleransın çoklu bir mekanizması vardır (15). Bu konu ile ilgili moleküller arasında HLA-G de yer alır. HLA-G ilk kez 1987 yılında Geraghty ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (16,21,22). HLA-G trofoblastik hücre invazyonunu ve lokal immün toleransı sürdürebilmek için sitokin sekresyonunu düzenleyerek implantasyon ve gebeliğin devamlılığında anahtar rol üstlenmektedir (16).

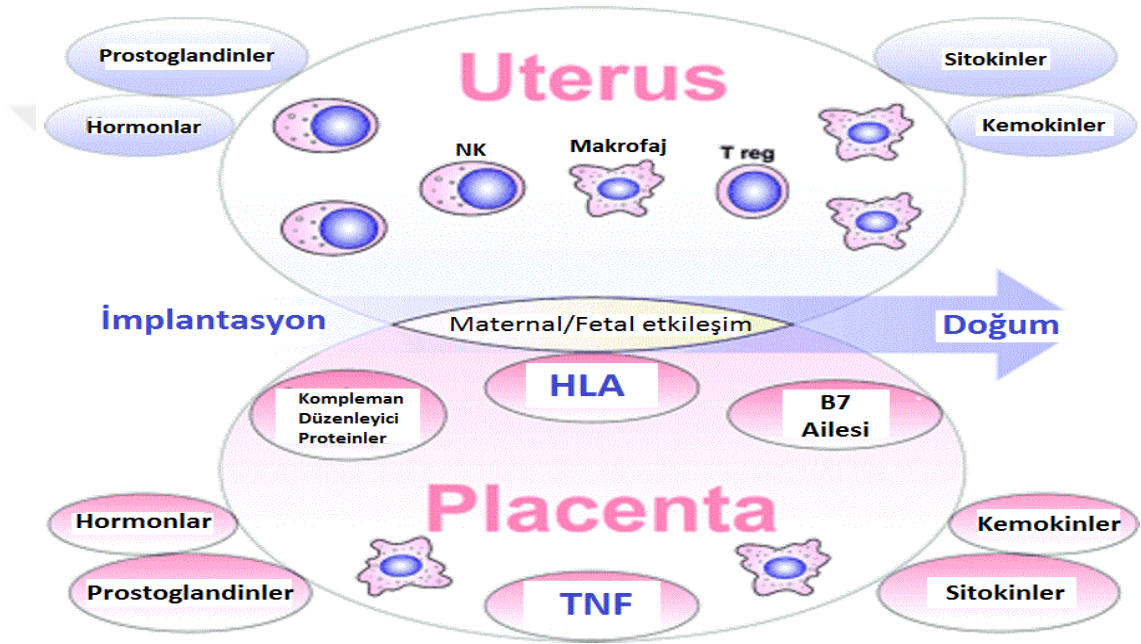
HLA-G nin gebelikteki en önemli ve kendine has görevi uterusda lokal olarak ve maternal periferik dokularda sistemik olarak immün toleransın artırılması böylelikle yarı-allojenik fetüsün korunmasıdır (23). İnsan majör doku uygunluk kompleksi (MHC) 6. kromozomun kısa kolunda yerleşmiştir. Klasik HLA sınıf Ia ve II genlerini içerir. Sınıf Ia genleri klasik yüksek poliformik HLA-A, B, C antijenlerini kodlar. HLA-G klasik olmayan Sınıf Ib HLA gen grubundadır. Sınıf Ib genleri ise daha az polimorfik olan HLA-E, F, G antijenlerini kodlar. HLA-A, B, C antijenleri çekirdekli hücrelerin çoğu tarafından üretilirken, HLA-E,F,G antijenleri ise sınırlı doku tarafından üretilir. HLA-G antijenleri ekstrasitotrofoblastlar, bazı villöz trofoblastlar, kök hücreleri, ilk trimester plasentasının koryonik fetal damar endotel hücreleri ve amnion epitel hücreleri, kornea, timus ve periferik kandaki monositler tarafından üretilir (19,24,25,26). HLA-G'nin sitokin salınımını ayarlayarak trofoblastik hücre invazyonunun kontrol ettiği ve lokal immün-supresif durumu sağladığı düşünülmektedir (16).

İnvitro çalışmaların sonuçları göstermiştir ki, sHLA-G molekülü interferon gama (IFN γ) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF α) gibi Th 1'in sitokinleri olan, desidua ve periferik kandaki monositler tarafından da üretilen mediatörlerin üretimini azaltmakta; Th2 sitokini olan IL4'ün periferik kandaki monositlerde üretiminin artırılmasını ise teşvik etmektedir. İyi bilinen bir durum olarak Th1 sitokinleri allograft reddini sağlamakla iken Th2 sitokinleri Th1'i baskılayarak fetusun reddini önlemektedir (20). Bunu inhibitör reseptörlere bağlanarak yapar. CD 4 (+) ve CD 8 (+) T hücrelerinin aktivasyonunu baskılar ve NK hücrelerinin indüklediği hücrel lizisi inhibe eder. Regülatuar T hücrelerinin inhibitör reseptörlerinin up-regülasyonunu yaparak DC aktivasyon ve olgunlaşmasını inhibe eder (19).

sHLA-G salınımının da Fas/FasL yoluyla CD 8 (+) T hücre apoptozisini indüklediği görülmüştür (20). HLA-G moleküllerinin membrana bağlı olan dört isoformu (HLA-G1, G2, G3, G4) ve salgılanan, serumda çözünür formda olan üç isoformu (sHLA-G5, G6, G7) olmak üzere yedi isoformu mevcuttur (16,19,21). HLA-G1 ve HLA-G2'nin çözülebilir (soluble) isoformlarına sırasıyla sHLA-G5 ve sHLA-G6 denilmektedir. HLA-G1 ve HLA-G2 proteinleri maternal-fetal alanda çok miktarda bulunmakla birlikte gebelik boyunca maternal dolaşıma da geçmektedir.

HLA-G'nin seviyesi fetal kayıp ile ilişkilidir. Düşük seviyelerdeki HLA-G1 spontan abortus için risk faktörü olabilir (23).

Fetüs hiçbir zaman maternal dokular ile direkt temas halinde değildir ve plasentanın maternofetal yüzeyinde koruyucu mekanizmalar bulunmaktadır (27). Trofoblast hücreleri klasik MHC sınıf Ia ve sınıf II moleküllerini üretmezler, oysa HLA-G immunolojik olarak nötral olan trofoblastları tahribattan korur. HLA-G uzun dönem immun toleransda ve immun cevabın baskılanmasında rol oynamaktadır (21) (Şekil 6).



Şekil 6: Fetusa karşı annede oluşan immun toleransın çoklu mekanizması (14)

HLA-G sınırlı doku tarafından üretilmektedir. Daha öncede belirtildiği gibi plasentadaki trofoblastlar ve monositler başta olmak üzere immun sistem hücreleri en çok bahsi geçenlerdir (21). sHLA-G (bazı gebeliği bulunmayan kadınların ve erkeklerin serumlarında bulunsa da), sağlıklı gebeliği olan kadınların serumunda mevcuttur. Gebeliği bulunmayan kadınların ve erkeklerin serumundaki sHLA-G'nin ana kaynağı monositlerdir (21). Gebedeki asıl sHLA-G kaynağı ise EVT'nin bir çeşidi olan maternal spiral arterleri istila eden endovasküler trofoblastik hücrelerdir (28,29). sHLA-G salınımı, in vitro fertilizasyon(IVF) gebeliklerdeki implantasyon kayıpları, preeklampsi ve düşük riski gibi gebelik komplikasyonları ile ilişkili görülmektedir (21,30). IVF tedavisinde embriyo transferi için embriyonun

seçiminde sHLA-G ELISA kullanılabilir bir potansiyel marker olarak önerilmektedir (20). Bazı çalışmalar azalmış HLA-G üretiminin, preeklampsinin patofizyolojisinde invaziv trofoblast etkinliğinde azalma ile rol oynadığını desteklemiştir (31,32). Prekonsepsiyonel dönemde NK hücre aktivitesi yüksek olan kadınlarda spontan abortus riski NK hücre aktivitesi normal olan kadınlara göre 3,5 kat fazla bulunmuştur (33). Başka çalışmalarda da sHLA-G düzeyi düşük olan grupta fetal kayıp oranları daha yüksek bulunmuştur (34,35).

2.4 Erken Dönem Gebelik Kayıpları (Spontan Düşükler)

2.4.1 Tanımlar

Son adet ilk günü temel alınarak 20 haftadan önce veya ağırlığı 500g'dan az olan fetüsün doğurtulması veya gebelik ürünlerinin kaybı spontan düşük (abortus) olarak tanımlanır. Spontan abortus erken gebeliğin en sık komplikasyonudur (36). Görülme sıklığı gestasyonel haftanın ilerlemesi ile düşüş gösterir ve %80'i gebeliğin ilk 12 haftası içinde meydana gelir (37,38). Klinik olarak tanımlanan gebeliklerin % 15'inde meydana gelmektedir (39). Histerektomi materyalindeki histolojik verilerle ve laboratuvar ölçümleri (β -hCG) ile tesbit edilen erken gebeliklerde bu oranın 2-3 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (39). Sonuç olarak tüm gebeliklerin %50'ye yakın kısmının abortus ile sonuçlandığı düşünülmektedir (40). Klinik olarak altı alt gruba ayrılır (41).

1. Abortus İmminens (Düşük Tehidi)
2. Abortus İnsipiens (Önlenemez Düşük)
3. İnkomplet Abortus (Tamamlanmamış Düşük)
4. Komplet Abortus (Tamamlanmış Düşük)
5. Missed Abortus
6. Habitüel Abortus (Tekrarlayan Düşük)

2.4.1.1 Abortus imminens (Düşük tehidi)

Gebeliğin ilk yarısı boyunca kapalı servikal os'tan kanlı vajinal akıntı ya da kanama görülmesi abortus imminens (düşük tehidi) olarak adlandırılır. Erken

gebelik haftalarındaki her dört ya da beş kadından biri değişik şiddetlerde kanama geçirebilir. Bunların da yarısında abortus olur (41).

Kanama genellikle ağrısızdır, bazen minimal suprapubik ağrı ile beraber görülebilir. Serviks kapalı ve normal uzunluktadır. Kanamanın kesin etyolojisi tanımlanamamakla birlikte sıklıkla plasentanın marjinal ayrılmasıyla birliktelik gösterir.

Düşük tehtidi terminolojisinin kullanılmasının nedeni, kanamanın tekrarlasa ve çok miktarda olsa bile kesin olarak düşükle sonlanmamasıdır. Gerçekte 7-11 hafta arasındaki fetal kalp atımının izlendiği gebeliklerde kanama olsa bile, bu gebeliklerin %90-96'sı devam etmekte ve sağlıklı bir şekilde ileri gebelik haftalarına ulaşabilmektedir (42).

2.4.1.2 Abortus insipiens (Engellenemez düşük)

Servikal dilatasyonun olması, kanamanın artışı, şiddetli uterin krampların olması, gestasyonel dokunun internal servikal os'ta görülmesi ve membranların büyük bir kısmının rüptürü ile kendini gösterir. Abortus kaçınılmazdır (43).

2.4.1.3 İnkomplet abortus (Tamamlanmamış Düşük)

Fetüs ve eklerinin düşük esnasında tamamen uterustan dışarı atılamaması durumudur (41). Eğer abortus 12. gebelik haftasından önce ise gebelik genellikle komplet abortusla sonuçlanır. 12. Haftadan sonra fetüs membranları rüptüre ederek düşer, ciddi miktarda plasental doku geride kalır ve bu da inkomplet abortus olarak tanımlanır. Gebelik ürünlerinin uterin kaviteden kısmen geçtiği, eksternal ostan dışarıya taşıdığı ya da vajinada olduğu, sürekli kramplar ve kanama ile birlikte olduğu durumudur (39,41).

2.4.1.4 Komplet abortus (Tamamlanmış Düşük)

Fetüs ve eklerinin tamamen uterustan dışarı atılması durumudur. Gebelik ürünlerini atılmasını takiben ağrı ve kanama hızlı bir şekilde son bulur (43).

2.4.1.5 Missed abortus

20 haftadan küçük gebeliklerde fetus ya da embriyonun uterusun içinde olarak ölmesi ve uzun süre uterus içinde kalmasına missed abortus denir. Serviks genellikle kapalıdır. Fetüsün ölümünden sonra gebeliğin uterustan atılmadan beklemesi, kendiliğinden sonlanmamasının nedeni belli değildir (39).

2.4.1.6 Habitüel abortus

En yaygın kabul edilen tanımı arka arkaya üç ya da daha fazla spontan abortustur (41). Çiftlerin % 1'ini etkilemektedir. Primer habitüel abortus, daha önce hiç başarılı gebeliği olmayan gebeler, sekonder habitüel abortus ise bir canlı doğumu takiben tekrarlayan gebelik kayıplarının olması durumudur (39).

2.4.2 Patoloji

Düşüklerin çoğu embriyonun ölümünden birkaç hafta sonra meydana gelir. Başlangıçta, implantasyon bölgesinde inflamasyon ve nekrozisle birlikte desidua bazaliste hemoraji oluşur. Gestasyonel kese kısmen ya da tamamen tespit edilebilir. Takiben uterin kontraksiyon ve servikal dilatasyon ile birlikte gebelik ürünlerinin çoğunluğu ya da tamamının dışarı atılması ile sonuçlanır. Histolojik olarak dokuda sıvı tutulumuna bağlı plasental villuslarda hidropik dejenerasyon yaygın olarak izlenmektedir (39).

2.4.3 Etyoloji

2.4.3.1 Bebeğe ait nedenler

A) Anormal zigot gelişimi: Erken spontan abortusta en sık gözlenen morfolojik bulgu, zigot, embriyo, erken fetus ya da plasentanın gelişimindeki anormalliklerdir. Baş popo mesafesi (CRL) 30mm den daha az olan embriyolar arasında anormal morfoloji gelişme sıklığı % 70`dir (41).

B) Anöploid abortus: Spontan abortus vakalarında embriyo ve fetüslerde kromozomal anomaliler sıklıdır. Kromozomal anomaliler bütün spontan abortusların %50'sini oluşturur. Bunların çoğu anöploidiktir (41).

C) Öploid abortus: Öploid abortus insidansının anne yaşı 35'in üzerinde olduğunda arttığı, yaklaşık 13. haftada en yüksek değere ulaştığı bildirilmiştir. Nedenleri;

- 1) İzole mutasyon gibi genetik bir anormallik
- 2) Maternal faktörler
- 3) Muhtemelen paternal faktörler (41)

2.4.3.2 Anneye ait nedenler

A) Yaş

Sağlıklı kadınlardaki düşük oranlarını etkileyen en önemli risk faktörü ileri anne yaşı olarak görülmektedir. 20-30 yaşlar arasında % 9-17, 35 yaşta %20, 40 yaşında %40 ve 45 yaşı sonrasında %80 oranlarındadır (39,44).

B) Enfeksiyonlar

Rol oynadığı düşünölen enfeksiyonlar arasında U. urealyticum, Listeria monocitogenes, T. gondii, M. hominis yer alır (45).

C) Kronik hastalıklar

Erken gebelikte tüberküloz ve karsinomatozis gibi hastalıklar nadirde olsa abortusa neden olurlar. Çölyak hastalığının hem kadın, hem de erkeklerde infertiliteye ve de tekrarlayan abortuslara neden olduğu bildirilmiştir (41).

D) Endokrin anormallikler

Tüm gebelik kayıplarının %10-30'unda endokrin etkenler söz konusudur (45). Luteal faz defektinin sporadik düşöklere etkisi şüphelidir. Progesteron verilen

gebelerle ilgili çalışmaların erken sonuçlarında, gebelik sonuçlarında düzelme izlenmiştir.

Polikistik over sendromlu kadınlar ile abortuslar arasında pozitif bir ilişki mevcuttur. Yapılan çalışmalarda metformin ile insülin rezistansı tedavisinin düşük yapma oranlarını azalttığı rapor edilmiştir (39). Hipotiroidi de düşük etkenlerindendir (41,45). Hem spontan abortus hemde major konjenital malformasyonlar insüline bağlı diyabeti olan kadınlarda artmıştır (41).

E) Çevresel faktörler

Tütün: Günde 10 adetten fazla sigara kullanımı artmış gebelik kaybı riskiyle ilişkilidir (46).

Alkol: Aşırı miktarda alkol tüketiminin spontan abortus riskinde artışla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (47).

Non-Steroid Anti İnflamatuvar (NSAİ) ilaçlar: Asetaminofen haricindeki NSAİ ilaçların konsepsiyon zamanında kullanılması abortus riskinde artışla ilişkili bulunmuştur (48).

Ateş: Vücut sıcaklığının 37.8 C (100 F) ve üzerinde olmasının abortus riskini arttırdığına dair 2 geniş çalışma yapılmış ama kesin sonuca ulaşılamamıştır (49,50).

Bazı maddelerin kullanımının gebelik kayıplarına neden olduğu bildirilmiştir.

Kemoteröptikler ve ağır metaller de gebelik kaybına neden olan çevresel faktörlerdir (45).

F) İmmünolojik faktörler

Otoimmün faktörler ve alloimmun faktörler gebelik kayıplarının %15'inden sorumludur. Antifosfolipid antikorları (lupus antikoagüan, antikardiyolipin antikorları) en sık görülenleridir (45). Tekrarlayan gebelik kaybındaki önemi nedeniyle dikkatler immün sisteme odaklanmıştır. İki önemli patofizyolojik model; otoimmün teori ve alloimmün teoridir.

Otoimmün faktörler: Çalışmaların derlenmesiyle tekrarlayan gebelik kaybı hastalarının yaklaşık %15'inin otoimmün faktörlerle karşılaştıkları görülmüştür. En belirgin antikorlar lupus antikoagülanı ve ankardiyolipin antikorudur. Gebelik kaybı

olan 500 hastalık bir çalışmada antikardiyolipin antikor insidansı %17, lupus antikoagülanı için insidans %7 olarak bildirilmiştir. İlk trimester gebeliği bulunan 860 hastada yapılan prospektif bir çalışmada antikardiyolipin pozitiflik oranı %7 olarak bulunmuştur. Negatif olan grupta spontan abortus oranı %10 iken pozitif gruptaki abortus oranı %25 olarak bulunmuştur. Simpson ve arkadaşları (1998) ise antikardiyolipin ve lupus antikoagülanının erken gebelik kaybı ile bağlantısı olmadığı sonucuna ulaşmışlardır.

Kadınlardaki gebelik kaybı mekanizmasının plasental tromboz ve enfarktüs sonucu olduğu düşünülmektedir. Tedavisinde, düşük doz aspirin ve heparin kullanılır. Yapılan bir çalışmada intravenöz immünglobulin verilmiş, düşük doz aspirin ya da heparinden daha iyi sonuçlar alınmadığı bildirilmiştir (39, 41).

Alloimmün faktörler: Tekrarlayan gebelik kaybı için allojenik lökosit immünizasyon tedavisi üzerine dünya çapında, 400'den fazla olguda yapılan retrospektif gözlemsel bir çalışma immünize kadınlarda yüksek oranda iyileşmeyi göstermiştir. Tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınların tedavisi için intravenöz immün globulin (IVIG) kullanılan retrospektif çift kör plasebo kontrollü bir çalışmada, plaseboya karşı bu tedaviyi alan kadınlarda gebelik başarısında artış olduğunu ortaya koymuştur. 3 ya da daha fazla açıklanamayan gebelik kaybı olan 47 olgu ile ilgili prospektif bir çalışmada düşük doz IVIG verilmesinin gebelik sonuçlarını iyileştirmede faydalı olduğu ortaya konmuştur (39, 41).

G) Kalıtsal trombofili

Trombofilisi olan gebelerde normal gebelere göre anlamlı derecede daha fazla gebelik komplikasyonu meydana gelmektedir. Trombofilik defekler; faktör 5 Leiden, protrombin G20210A mutasyonları ve protein C defekleri, protein S ve antitrombin 3 eksikliklerinden oluşmaktadır (39).

H) Yaşlanan gametler

Başarılı gebeliklere göre, inseminasyon bazal vücut ısısı değişiminden 4 gün önce ve 3 gün sonra gerçekleştiği zaman, abortus insidansında bir artış olduğu tespit

edilmiş, fertilizasyondan önce gametlerin kadın genital kanalında yaşlanmasının abortus oranını arttırdığı sonucuna varılmıştır (41).

I) Uterin defektler

Mekanizması net olmamakla birlikte, azalmış kanlanma desteği, küçülmüş uterin kavite, anormal plasantasyon ve implantasyondan bahsedilmektedir. Gebeliğin prognozu malformasyonun tipine bağlıdır. Asimetrik füzyon defekti kötü prognozlu olarak kabul edilmekte, septat, bi kornuat ve didelfik uteruslar ise iyi prognozlu olarak bildirilmektedir. Leiomyoma uteri ve Asherman Sendromu da yine benzer nedenlerden dolayı gebelik kayıplarına neden olabilmektedir (39).

J) Servikal yetersizlik

Kasılmaların yokluğuna rağmen, serviksin ağrısız dilatasyonudur. Tanısında gebelik esnasında yapılan transvajinal ultrasonografi ile servikal uzunluğun değerlendirilmesi bir seçenek olsa da yapılan son çalışmalar sonucunda, servikal yetmezlik tanısında sonografi kullanımı önerilmemektedir (41). Tanıda klasik yöntem ise menstürel siklusun luteal döneminde dirençle karşılaşmadan 8 nolu Hegar bujisinin servikal kanaldan geçmesidir. Tedavisinde serklaj yöntemleri kullanılmaktadır (41, 45).

K) Annenin kilosu

Vücut kitle indeksi(VKİ) $18,5 \text{ kg/m}^2$ nin altında olması veya 25 kg/m^2 nin üzerinde olması ile infertilite ve spontan abortus riskinde artış gösterilmiştir (51,52).

L) Ovulasyondan implantasyona kadar geçen sürenin uzaması

Ovulasyondan implantasyona kadar geçen sürenin 10 günden daha uzun olması durumunda erken gebelik kayıplarında artış izlenmektedir (53).

2.4.3.3 Babaya ait nedenler

Ebeveynlerden biri dengeli translokasyon taşıyıcısı ise var olan gebelikteki fetüsün karyotipi normal ya da aynı dengeli kromozom veya dengesiz bir translokasyon ile birlikte olabilir. Dengesiz bir translokasyon gebelik kaybına, fetal anomaliye veya ölü doğuma neden olabilir (41).

2.4.4 Tanı

Günümüzde düşüklerin tanınmasında ultrasonografi en önemli tanı aracıdır. Son adet tarihine göre 6 hafta ve üzerinde gebeliği olan hastalarda fetal kalp atışının görülmemesi missed abortus tanısı koydurur. Gebelik haftası 6 haftanın altında olanlar için gestasyonel kese çapı 10 mm olmasına rağmen yolk sac'ın izlenmemesi ya da fetüsün görülememesi boş gebelik (blighted ovum) tanısı koydurur (40). İlk trimester kanaması olan, daha önceden ultrasonografi ile izlenmiş intrauterin gebeliği mevcut bulunan olgularda artık intrauterin kesenin izlenmemesi ya da kesenin bozulmuş olduğunun görülmesi abortusu düşündürür.

İnkomplet abortusun ultrasonografik tanısında gebelik ürünlerinin bir kısmının uterusda kalması asıl problemdir. Endometriyal kalınlık ölçümü tanı koymak için kullanılsa da kesme(cut-off) değeri konusunda bir fikir birliği yoktur. Fakat 15mm'lik endometriyal kalınlık genellikle tanı için kullanılır (54).

Missed abortusun ultrasonografi ile kesin tanı kriterleri:

1. Embriyonun CRL (Crown-rump length) uzunluğu 5mm'den büyük iken embriyonun kalp atımının olmayışı (55).
2. Gestasyonel kesenin boyutunun 13mm olmasına rağmen yolk-sac'ın izlenmeyişi (56).
3. Ultrasonla ölçülen gestasyonel kesenin transabdominal olarak 25 mm'den transvajinal olarak 18 mm'den büyük olmasına rağmen embriyonun izlenmemesi (57).

Bu ölçüm değerleri 6 haftalık gebelik haftası ile uygunluk göstermektedir.

Potansiyel gebelik kaybının öncü bulguları olarak;

1. Yolk sac'ın gebelik haftasına göre daha büyük, düzensiz, kalsifiye olması (56).
2. 5.-6. haftalarda fetal kalp atımının 100 atım/dakika'dan az olması (58).
3. Gestasyonel kesenin boyutu ile CRL arasındaki ölçüm farkının 5mm'den daha kısa olması (59).
4. Subkoryonik hematoma izlenmesi (60).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışmanın Yeri

Çalışma Düzce Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nde yapılmıştır.

3.2 Çalışmanın Zamanı

Çalışmamız Şubat 2012 – Temmuz 2012 tarihleri arasında yapılmıştır.

3.3 Örneklem Biçimi

Çalışma için Düzce Üniversitesi girişimsel (invaziv) olmayan klinik araştırmaları etik değerlendirme komitesinden 01.12.2011 tarihinde 2011/213 numara ile onaylandı. Düzce Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran missed abortus tanısı konulmuş gebelerden ve kontrol grubu olarak benzer yaş ve gebelik haftasında sağlıklı gebe olgulardan başvuru sırasında; tam kan sayımı, karaciğer (Alanin transaminaz vb) ve böbrek fonksiyon testleri (Kan üre azotu vb) için kan alınırken daha sonra çalışmada kullanılmak üzere ayrı bir biyokimya tüpüne (4 ml) kan alındı ve serumları ayrıldı. Alınan kan serumları analiz yapılncaya kadar -80 °C'de derin dondurucuda bekletildi. Başvuru sırasında önceki gebeliklerinde preeklampsi, eklampsi , İUGR olan bebek doğum, preterm doğum, preterm prematür erken membran rüptürü,

dekolman plasenta, hipertansiyon, diabetes mellitus, otoimmün hastalık varlığı sorgulandı. Olguların mevcut gebeliklerinde sigara kullanımları, folik asit kullanma durumları not edildi. Subklinik bir karaciğer ve böbrek hastalığı öyküsü sorgulandı. Sonuç olarak missed abortus olgularında sHLA-G düzeylerinin; 0-20 hafta normal gebe kan serumu sHLA-G düzeyleri kombine edildiğinde, gebelik komplikasyonlarını belirlemedeki değeri araştırıldı.

3.4 Laboratuvar Ölçümleri

Çalışmaya dahil edilen hastalardan aynı taraf ante kubital bölgeden 4 ml kan alındı. Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)'lı tüpe alınan kan örnekleri 1500 x g'de santrifüj edilip serumları ayrıldı ve sHLA-G düzeyleri çalışılncaya kadar – 80°C'de muhafaza edildi. Serumlardaki sHLA-G(sHLA-G1/G5) düzeyleri Düzce Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı tarafından Biovendor marka kit kullanılarak ELISA yöntemi ile çalışıldı. (Bio-rad marka cihaz ile ELISA yöntemi 259 nm dalga boyunda 600 nm referans alınarak çalışıldı) .

3.5 Gruplar

Yirminci gebelik haftasından önce ultrasonografik olarak fetal kardiyak aktivite tespit edilemeyen gebelikler missed abortus olarak kabul edildi. Kontrol grubu olarak çalışma grubuna benzer yaş ve gebelik haftasında tek gebeliği olan olgular kabul edildi. Kromozomal anomali tespit edilen ya da ultrasonografik olarak yapısal anomali saptanan olgular çalışma dışı bırakıldı.

3.6 Çalışmanın Şekli

Çalışmamız prospektif kesitsel bir çalışmadır. Çalışmamızda daha önce belirtildiği gibi dışlama kriterlerini taşımayan ve onamı alınan tüm hastalar, *hasta seçimi olmaksızın* çalışmaya dahil edildi. Çalışma boyunca çalışmadaki hastaların gebelik sonuçları biyokimyasal analizini yapan çalışmacıdan, maternal kan serumlarındaki sHLA-G sonuçları ise hastaların verilerini toplayan çalışmacıdan gizli tutuldu.

3.7 İstatistik Analizi

Hastalar normal gebeler ve missed abortus olmak üzere iki gruba ayrıldı. İki grup arasında sayısal parametreler karşılaştırılırken normal dağılanlarda independent samples T test; normal dağılmayanlarda Man Whitney U testi; isimsel veriler karşılaştırılırken ise Ki kare testi kullanıldı. Normal dağılan sayısal veriler ortalama +/- standart sapma; normal dağılmayanlar ortanca (min-maks); isimsel veriler ise sıklık ve yüzde (%) olarak kaydedildi. HLA-G düzeyinin missed abortus için bir prediktif olup olmadığı lojistik regresyon analizi yapılarak tespit edilmeye çalışıldı. Missed abortusları tespit etmede HLA-G seviyeleri için kesme değeri belirlenirken ROC analizi kullanıldı.

4. BULGULAR

Kırk normal, 40 missed abortuslu olmak üzere toplam 80 gebe çalışmaya dahil edildi. Her iki grupta ortalama yaş birbirine benzer bulundu. Ortalama yaş kontrol grubunda $26,7 \pm 4,5$ yıl, missed abortus grubunda $27,7 \pm 5$ yıl olarak hesaplandı. Kontrol ve missed abortus gruplarında sırasıyla gebelik sayısı 2 (1 – 4) ye 2 (1 – 7) ($P=0,045$), doğum sayısı 1 (0 – 3) ye 1 (0 – 5) ($P=0,098$), abortus sayısı 0 (0 – 1) ye 0 (0 – 2) ($P=0,205$), yaşayan çocuk sayısı; 1 (0 – 4) ye 1 (0 – 2) ($P=0,146$) olarak saptandı. Multipar olgu sayısı kontrol grubunda 25 (% 62,5), missed abortus grubunda 28 (% 70) idi ($P=0,47$). Her iki grup arasında demografik verilerin karşılaştırılması tablo 1’de sunuldu.

Tablo 1. Kontrol ve missed abortus grubunda yaş verilerinin karşılaştırılması.

	Kontrol (n = 40)	Missed abortus (n = 40)	P
Yaş (yıl)	$26,7 \pm 4,5$	$27,7 \pm 5$	0,36
Gebelik sayısı (n)	2 (1 – 4)	2 (1 – 7)	0,045
Doğum sayısı	1 (0 – 3)	1 (0 – 5)	0,098
Düşük sayısı	0 (0 – 1)	0 (0 – 2)	0,205
Yaşayan çocuk sayısı	1 (0 – 4)	1 (0 – 2)	0,146

Kontrol grubunda toplam 8 olguda (%20) daha önce abortus öyküsü varken, missed abortus grubunda abortus öyküsü 11 olguda (%27,5) gözlemlendi ($P=0,43$). Kontrol grubunda daha önce abortus öyküsü olan bu 8 olgunun sHLA-G düzeyi $33,3$ ($10,8-135$ U/ml) olarak bulundu. Bu değer önceden missed abortusu olmayan kontrol grubu hastaları ile karşılaştırıldı anlamlı bir fark saptanmadı ($P=0,379$). Kontrol

grubunda daha önce abortus öyküsü olan 8 olgu çalışma grubundaki missed abortuslu hastalar ile karşılaştırıldığında anlamlı fark saptandı ($P=0,031$).

Gebelik sayısının sHLA-G düzeyi üzerine etkisini ölçmek amacıyla kontrol grubu olgularında 15 primigravid olgu ile, 25 multipar olgunun sHLA-G düzeyleri karşılaştırıldı. Her iki grup arasında istatistiksel fark tespit edilemedi ($P=0,761$) (Tablo 2).

Tablo 2. Kontrol grubunda primigravid ve multipar olguların serum sHLA-G düzeylerinin karşılaştırılması

	Primigravid M (min - maks)	Multipar M (min - maks)	P
sHLA-G düzeyi (U/ml)	26 (17 - 127)	26 (11 - 135)	0.76

M (min - maks): Median (minimum - maksimum),

sHLA-G: Çözünabilir HLA-G

Ortalama gestasyonel yaş son adet tarihine göre, kontrol ve missed abortus gruplarında sırası ile $9 \pm 2,5$ ve $9,3 \pm 2,6$ hafta; transvajinal ultrasonografik ölçüme göre ise $8,9 \pm 2,7$ ve $7,9 \pm 2,6$ hafta bulundu. İki grup arasında son adet tarihine ve ultrasonografik ölçümlere göre istatistik olarak anlamlı fark gözlenmedi (Tablo 3).

Tablo 3. Kontrol grubu ile missed abortus grubunda son adet tarihine ve ultrasonografik ölçüme göre gebelik haftalarının karşılaştırılması

	Kontrol (n = 40)	Missed abortus (n = 40)	P
SAT'a göre (hafta)	$9 \pm 2,5$	$9,3 \pm 2,6$	0,63
Ultrasonografiye göre (hafta)	$8,6 \pm 2,7$	$7,9 \pm 2,6$	0,12

SAT: Son adet tarihi

Her iki grup kilo, boy ve VKİ ölçümleri bakımından karşılaştırıldı. Vücut ağırlığı kontrol grubunda $61,9 \pm 8,8$ kilogram (kg), missed abortus grubunda $65,1 \pm 11$ kg olarak hesaplandı. Boy, kontrol grubunda $160 \pm 6,5$ santimetre (cm), çalışma grubunda $160 \pm 6,8$ cm idi. VKİ ise kontrol grubu ve çalışma grubunda sırasıyla 25,3

$\pm 3,6 \text{ kg/m}^2$ ve $24,2 \pm 3,7 \text{ kg/m}^2$ olarak hesaplandı. Gruplar arasında kilo, boy ve VKİ bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi (Tablo 4).

Tablo 4. Kontrol ve missed abortus grupları arasında olguların kilo, boy ve VKİ ölçümlerinin karşılaştırılması.

	Kontrol (n = 40)	Missed abortus (n = 40)	P
Kilo (kg)	61,9 $\pm$ 8,8	65,1 $\pm$ 11	0,16
Boy (cm)	160 $\pm$ 6,5	160 $\pm$ 6,8	0,96
VKİ (kg/m²)	24,2 $\pm$ 3,7	25,3 $\pm$ 3,6	0,17

VKİ: vücut kitle indeksi

Her iki grup hemogram ve biyokimyasal parametreler bakımından karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile missed abortus grubunda sırasıyla hemoglobinin seviyesi; $12,1 \pm 0,8 \text{ mg/dl}$ ve $12,8 \pm 1,5 \text{ mg/dl}$ ($P=0,027$), üre seviyesi; $17,1 \pm 3,8 \text{ mg/dl}$ ve $19,9 \pm 5,7 \text{ mg/dl}$ ($P=0,014$) ve kreatinin seviyesi; $0,53 \pm 0,08 \text{ mg/dl}$ ve $0,58 \pm 0,08 \text{ mg/dl}$ ($P=0,014$) olarak bulundu ve istatistiksel anlamlı fark izlenmedi. BUN düzeyi; $8 \pm 1,7 \text{ mg/dl}$ ve $9,4 \pm 2,5 \text{ mg/dl}$ ($P=0,005$) istatistiksel olarak anlamlı saptanırken; ALT düzeyi sırasıyla; $15 \pm 8,1 \text{ IU/L}$ ve $15 \pm 6,7 \text{ IU/L}$ ($P=0,97$), AST düzeyi; $17,8 \pm 6,0 \text{ IU/L}$ ve $17,5 \pm 5,3 \text{ IU/L}$ ($P=0,79$), açlık kan şekeri seviyesi; $93,6 \pm 16,9 \text{ mg/dl}$ ve $96,4 \pm 13,4 \text{ mg/dl}$ ($P=0,43$) olarak her iki grupta benzer bulundu (Tablo 5).

Tablo 5. Normal gebeliği olan hasta grubu ile missed abortus hasta grubunda hemogram ve biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması

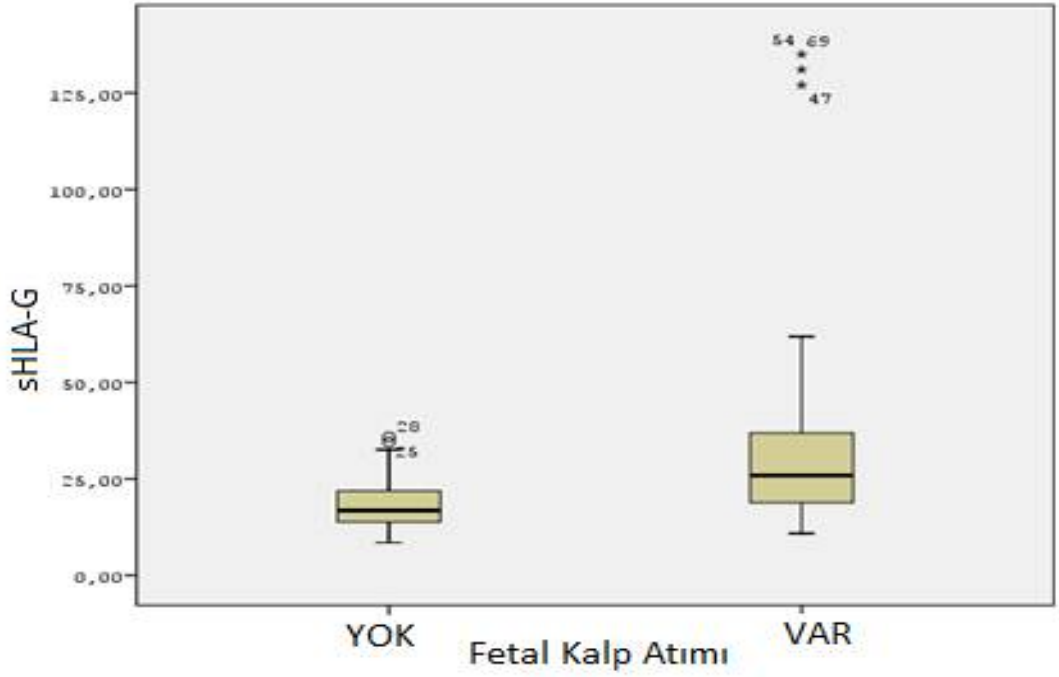
	Kontrol (n = 40)	Missed abortus (n = 40)	P
Hemoglobin (mg/dl)	12,1±0,8	12,8±1,5	0,027
ALT (SGPT) (IU/L)	15±8,1	15±6,7	0,97
AST (SGOT) (IU/L)	17,8±6,0	17,5±5,3	0,79
Glukoz (mg/dl)	93,6±16,9	96,4±13,4	0,43
ÜRE (mg/dl)	17,1±3,8	19,9±5,7	0,014
BUN (mg/dl)	8±1,7	9,4±2,5	0,005
Kreatinin (mg/dl)	0,53±0,08	0,58±0,08	0,014

Çözünebilir HLA-G seviyesi, kontrol grubunda 26 (11- 135U/ml), missed abortus grubunda ise 16,8 (8,4 - 35,8 U/ml) saptandı (P<0.001) (Tablo 6, Şekil 7).

Tablo 6. Kontrol ve missed abortus grubunda sHLA-G düzeylerinin karşılaştırılması.

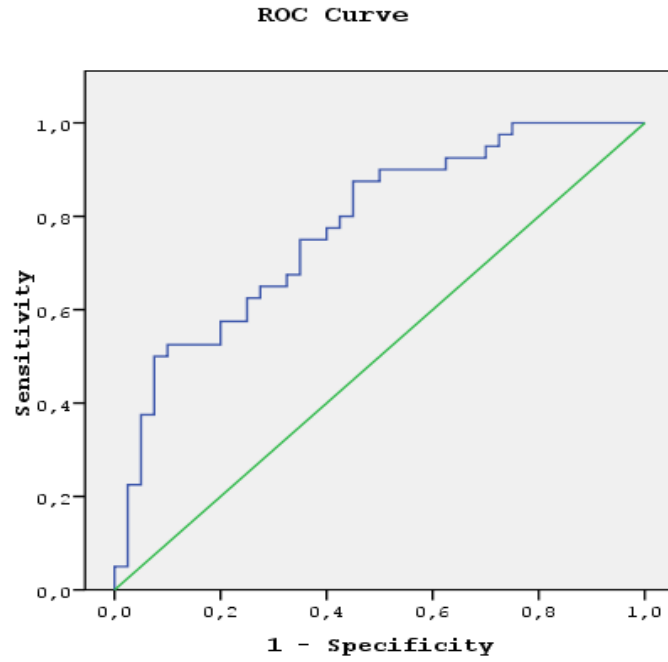
	Kontrol (n = 40)	Missed abortus (n = 40)	P
sHLA-G (U/ml)	25.9 (11 – 135)	16,8 (8.4 - 35,8) ¹	< 0,001

¹ ALT: Alanin Aminotransferaz = SGPT = Serum Glutamik-Piruvik Transaminaz,
AST: Aspartat Aminotransferaz = SGOT = Serum Glutamik-Oksaloasetik
Transaminaz, BUN: Blood Urea Nitrogen = Kan Üre Azotu = Üre nitrojeni



Şekil 7: Kontrol ve missed abortus grubunda sHLA-G seviyelerinin karşılaştırılması.

ROC analizinde sHLA-G için kesme değeri 25,9 kabul edildiğinde missed abortus tanısında spesifite %90, sensitivite %50 olarak elde edilmiştir [$P < 0.001$; AUC (area under the curve)= 0,7] (Şekil 8).



Şekil 8: Kontrol ve missed abortus grubunda sHLA-G düzeylerinin ROC eğrisi ile karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, yaş, gebelik haftaları ve önceki gebelikte gebelik kaybı bakımından benzer iki grup karşılaştırıldığında, median maternal serum sHLA-G seviyesi gebelik kaybı olan çalışma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük saptandı. Bunun yanında hastaların daha önceki düşük hikayeleri göz önüne alındığında kontrol grubundaki daha önce düşük hikayesi olan grup ile düşük hikayesi olmayan hastalar arasında median maternal serum sHLA-G seviyeleri arasında anlamlı fark saptanmadı. Benzer şekilde kontrol grubunda primipar ve multipar olgular arasında da sHLA-G düzeyleri arasında fark bulunmadı.

Anne için fetusun yarı-allograft olduğu bilinmesine rağmen fetusa karşı immün toleransın nasıl oluştuğu net değildir. Gebelikte hem lokal hem de sistemik olarak immün sistemde bir modülasyon olmakta bu modülasyonlar sayesinde de gebelik ve eklerine karşı immün-tolerans gelişmektedir. Yani maternal immün sistemin gebeliğe uygun yanıt vermesi, immün toleransın gelişmesi ve dolayısı ile sağlıklı bir gebeliğin devamı için gereklidir. Yapılan çalışmalarda preeklampsi, IUGG, plasenta dekolmanı gibi gebelik kaybı ile ilişkili plasental hastalıkların patogenezinde fetal alloantijenlere karşı annede immün sistemin uygunsuz cevabının rolü ve/veya immün-toleransın yetersiz olduğu düşünülmektedir (62).

Uygun bir implantasyon için embriyonun implantasyon kabiliyetine ve endometriyumun buna uygun cevabına ihtiyaç olduğu ifade edilmektedir (63). 6. kromozomdaki MHC kompleksinde bulunan HLA-G geni gebelikte özellikle ekstrasvillöz trofoblastların yüzeylerinde bulunmakta, buradan salınmakta ve annenin serumuna geçerek annenin immün sisteminin gebeliğe adaptasyonunda önemli bir yer tutmaktadır (61-64). HLA-G moleküllerinin membrana bağlı olan dört izoformu (HLA-G1, G2, G3, G4) ve salgılanan, serumda çözünür formda olan üç izoformu (sHLA-G5, G6, G7) olmak üzere yedi izoformu mevcuttur (16,19,21,65,66). HLA-G1 ve HLA-G2 'nin çözülebilir (soluble) isoformlarına sırasıyla sHLA-G5 ve sHLA-G6 denilmektedir. HLA-G1 ve HLA-G2 proteinleri maternal-fetal alanda çok miktarda bulunmakla birlikte gebelik boyunca anne dolaşımına da geçmektedir. Araştırmacılar ekstrasvillöz sitotrofoblast hücrelerinin membran bağımlı sHLA-G1 salınımı konusunda ve HLA-G5'in villöz sitotrofoblastlardan sekrete edildiği konusunda fikir birliğine varmışlardır (61). sHLA-G1 gebenin kanında bulunan

önemli bir moleküldür. HLA-G5'de gebelik ve gebelik komplikasyonlarında önemli yer tutar. Yeni çalışmalar sHLA-G1'in gebelik ve preeklampside önemli bağlantısı olduğunu göstermektedir (62). HLA-G5'in ise gebeliğin diğer komplikasyonlarıyla negatif ilişkili olduğu bildirilmektedir (61).

Bilinmektedir ki Th1 sitokinleri allograft reddini sağlamakta iken Th2 sitokinleri Th1'i baskılayarak fetusun reddini önler (20). In vitro çalışmalar göstermiştir ki, sHLA-G molekülü bir yandan desidua ve periferik kandaki monositler tarafından da üretilen interferon gama (IFN γ) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF α) gibi Th 1'in sitokinlerini üretimini azaltmakta ve dolayısı ile reddi önlemekte, diğer yandan da Th2 sitokini olan IL4'ün periferik kandaki monositlerde üretiminin arttırarak immün toleransa zemin hazırlamaktadır. Sonuçta CD 4 (+) ve CD 8 (+) T hücrelerin aktivasyonu baskılanıp, NK hücrelerinin indüklediği hücresel lizisi engellenlenmiş olunur. Ayrıca regülatuar T hücrelerinin inhibitör reseptörlerinin up-regülasyonunu yaparak DC aktivasyon ve olgunlaşmasını inhibe eder (20). Yani HLA-G molekülleri hem lokal olarak, hem de sHLA-G formunda anne serumuna katılarak periferik olarak immün regülasyona katkıda bulunmaktadır.

Altmışbeş invitrofertilizasyon (IVF) olgusu ile yapılan bir çalışmada, IVF sonrası gebelik oluşan olgularda erken gebelik haftalarında plasma HLA-G seviyesinin, erken haftalarda düşükle sonuçlanan ya da gebelik oluşmayan olgulara göre yüksek saptandığı bildirilmiştir. Hatta ovulasyon öncesi sHLA-G seviyesinin yüksekliğinin bile başarılı gebelik sonuçları ile ilişkili olduğu görülmüş, sHLA-G'nin anne serumundaki ovulasyon öncesi düzeylerinin büyük olasılıkla embriyonun implantasyonunu etkilediğinden, bununla birlikte muhtemelen endometriyumun cevabını da desteklediğinden bahsedilmektedir (63).

Çözünebilir HLA-G'nin gebelik komplikasyonlarındaki yerine bakmak gerekirse, bu konuda preeklampsi hastalarının verileri iyi bir örnek oluşturabilir. Preeklampsinin etyoloji ve patogeneziyle ilgili ana hipotezlerden biri normal gebeliğe göre semi allojenik fetusa karşı gebelik esnasında bir çeşit immünolojik uyumsuzluğun gelişmesidir. Plasentadan zayıf HLA-G salınımı ve düşük seviyedeki sHLA-G'in ekspresyonu normalde oluşması gereken bir immünolojik toleransın oluşumuna engel oluşturmaktadır (61). Çözünebilir HLA-G'nin sağlıklı gebelerde en yüksek seviyesi ilk trimesterde ölçülmüştür. Terme doğru sHLA-G seviyesinin

gittikçe azaldığı, ek olarak ikinci trimesterdeki sHLA-G seviyesinde belirgin düşüş görülen gebelerde IUGR ve preeklampsi gelişme riskinin arttığı bildirilmektedir (62). Steinborn ve ark. preeklampsik 55 olguyu kapsayan ilk çalışmaları (67) ve 65 preeklampsik olguyu kapsayan diğer çalışmalarında (62) normal ve preeklampsik üçüncü trimester gebeler arasında sHLA-G seviyelerinde belirgin bir fark gözlenmezken, sHLA-G seviyesindeki güçlü artış HELLP sendromu olan gebe olgularda bildirilmiştir (62). Ek olarak diğer pek çok çalışmada özellikle anne kanında sHLA-G'nin düşük konsantrasyonlarının preeklampsi olgularında, kontrollere göre daha sık gözlemlendiği bildirilmektedir (64,66,68,69). Ayrıca pek çok çalışmada yüksek sHLA-G seviyelerinin başarılı implantasyon ve greft kabulüyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (63,71).

HLA-G'nin implantasyon öncesi salınımı insan embriyosunda ilk kez Jurisicova ve ark. (72,73) tarafından izlenmiştir. HLA-G'nin salgılandığı görülen ilk dokular ise plasenta ve koryonik membrandır, ilk tümör hücresi de trofoblastik tümör hücre grubudur (71). HLA-G mRNA pek çok doku ve organda bulunmasına rağmen, protein sentezi sınırlı dokuda mevcuttur. Yardımla üreme yöntemi çalışmalarında bütün preimplantasyon embriyolarında HLA-G mRNA ve proteini bulunmaz, ama başarılı gebelik plasentalarında değişmez şekilde bulunur. Yapılan çalışmalar trofoblast hücrelerinden salgılanan değişik HLA-G moleküllerinin ilk düşünülenin aksine çok yönlü etkileri olduğunu göstermiştir (71). Embriyo kültüründeki HLA-G'nin seviyesi başarılı gebelik oranları ile pozitif ilişkilidir (64). Hunt ve ark. (66) gebe, gebe olmayan kadın ve yenidoğan serumunda sHLA-G düzeyine bakmışlar, sHLA-G molekülünün allogreftin sistemik olarak tutunmasını sağladığını düşündüklerini ifade etmişlerdir. Jurisicova ve ark. (72,73), HLA-G'nin embriyoyu T hücre aktivitesinden ve embriyonun implantasyon sürecinde immünolojik reddi koruduğunu desteklemektedir. Fuzzi ve ark. (74) 101 IVF siklusundaki embriyo kültüründe sHLA-G sekresyonuna bakmış, bunlardan 75 tanesinde sHLA-G pozitif saptanırken 26 tanesinde sHLA-G salınımı gözlenmemiştir. sHLA-G salınımı gözlenmeyen grupta gebelik gelişmezken, sHLA-G salınımı olan 75 gebeliğin 18'inde gebelik oluşmuştur. Benzer şekilde Rizzo ve ark. (61), sHLA-G salınımını, in vitro fertilizasyon tedavisi başarısıyla pozitif körele bulmuşlardır. Bu nedenlerle

sHLA-G üretiminin başarılı gebelik sonuçları için gerekli olduğu ifade edilmektedir (63,61).

Çözünebilir HLA-G moleküllerinin immun sistemi nasıl düzenlediği halen tam olarak açıklanamamıştır (61). Anne ve fetusdaki HLA-G'nin genetik değişkenliği ve salınımı gebeliğin geleceğine etkisi açısından önemlidir (70). Azalmış ve abartılı sHLA-G salınımı sadece preeklampsi değil, tekrarlayan düşükler, IUGR, prematür doğum gibi gebelik komplikasyonlarının da fetal-maternal alandaki anormal immünolojik bağlantılarla alakalı olabileceğine dair kanıtlar giderek artmaktadır (64,69,70). Ancak missed abortuslu olgularda sHLA-G düzeyi konusunda literatürde henüz bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada sHLA-G düzeyi missed abortuslu olgularda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı. Literatürde spesifik olarak missed abortuslu hastalar ile sağlıklı gebelerin sHLA-G seviyelerini direkt olarak karşılaştıran çalışma bulunmaması nedeniyle karşılaştırması yapılamadı. Steinborn ve ark. 527 gebe kadını prospektif olarak takip ettikleri çalışmalarında yalnız 11 hastada abortus izlemişler ve sHLA-G seviyelerinin abortus ile sonuçlanan grup ile sağlıklı gebelik grubu arasında anlamlı fark olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da her ne kadar abortuslu grubun tanımı yapılmassa da çalışmamızdaki sHLA-G seviyelerinin missed abortuslu grupta kontrol grubuna göre daha düşük bulunması her iki çalışma poplasyonu arasındaki genetik HLA-G ile ilgili genetik farklılıklardan kaynaklanmış olabilir. HLA-G gen polimorfizmi ve ekspresyon farklılıkları konusunda literatürdeki çalışmalarda bunu desteklemektedir (25,29,66). sHLA-G seviyesindeki kararsız değişikliklerin gebeliğin evresinden çok genetik yatkınlığa bağlı olduğu fakat bunu kanıtlamak için daha geniş çalışmalara ihtiyaç duyulduğu ifade edilmektedir (66).

Bulgularımız maternal serum sHLA-G düzeylerinin missed abortuslu olguların tesbit edilmesinde yeni bir tanısal araç olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir. Ancak bu konuda daha sağlam kanıtlar, maternal serum sHLA-G seviyelerinin annelerin prospektif takip edilip, düşükle sonuçlanan ve sonuçlanmayan gebeliklerin karşılaştırıldığı yüksek hasta sayılı çalışmalara elde edilebilir.

SONUÇLAR

1. Çözünebilir HLA-G düzeyi kontrol grubu olgularda missed abortus olgularına göre anlamlı olarak yüksek bulundu.
2. Çözünebilir HLA-G düzeyi primigravidler ile multipar olgular arasında benzer bulundu.



6. KAYNAKLAR

- 1- Bernstein HB, Weinstein M, Normal Pregnancy & Prenatal Care Ed: DeCherney AH, Nathan L et all, Current Obstetrics and Gynecology 10. Edition pg 170-171 by the McGraw-Hill Companies 2007 US.
- 2- Gökşin E, Sakıncı M, Normal Gebelik ve Prenatal Bakım Ed: Ayhan A, Durukan T. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi 2. Baskı Syf 177-178 Güneş Tıp Kitapevi, 2008.
- 3- Eroschenko V. P. Di Fiore Histoloji Atlası 9.baskıdan Çev. Demir R. 2001 Palme Yayıncılık Syf:328
- 4- Junqueira L.C. Carneiro J. Temel histoloji Çev. Aytekin Y. Solakoğlu S. 2003 Nobel Tıp Kitapevleri Syf:462
- 5- Bergh PA, Navot D: The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. Fertil Steril 1992;58(3):537-47.
- 6- Cunningham FG, Bloom SL, et all. Williams Obstetrik 23.baskı, (Ceylan Y, Yıldırım G ve ark. çev) 2010 Nobel tıp kitabevi, Syf 45-60
- 7- Lindhard A, Bentin-Ley U, Ravn V, et al: Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. Fertil Steril 2002;78(2):221-33.
- 8- Hertig AT: The placenta: Some new knowledge about an old organ. Obstet Gynecol 1962;20:859-66.
- 9- Manaster I, Mizrahi S, Goldman-Wohl D, et al: Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. J Immunol 2008;181(3):1869-76.
- 10- Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, et al: Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetalmaternal interface. Nat Med 2006;12(9):1065-74.
- 11- Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Taylor HS: The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. Semin Reprod Med 2009;27(1):62-79.
- 12- Victoria Roberts, Leslie Myatt, Placental Development and physiology, from UpToDate 2012
- 13- Abrahams VM, Immunology of the maternal-fetal interface, from UpToDate 2012

- 14- Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2010 Aug 21;376(9741):631-44. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60279-6. Epub 2010 Jul 2.
- 15- Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J*. 2005;19(7):681-93.
- 16- Roussev RG, Coulam CB. HLA-G and its role in implantation (review). *J Assist Reprod Genet* 2007;24(7):288-95.
- 17- Le Bouteiller P, Mallet V. HLA-G and pregnancy. *Rev Reprod* 1997;2(1):7-13.
- 18- Hunt JS, Langat DK, McIntire RH, Morales PJ. The role of HLA-G in human pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4 Suppl 1:S10.
- 19- Alegre E, Díaz-Lagares A, Lemaoult J, López-Moratalla N, Carosella ED, González A. Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy: longitudinal study during pregnancy. *Hum Immunol* 2007;68(8):661-7.
- 20- Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, Biagiotti R, Pellegrini S, Menicucci A, Baricordi OR. Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 2005;20(1):138-46.
- 21- Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* 2006;12(3):209-32.
- 22- Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(24):9145-9.
- 23- Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL, Hyslop T. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet* 2003;72(6):1425-35.
- 24- Puppo F, Costa M, Contini P, Brenci S, Cevasco E, Ghio M, Norelli R, Bensussan A, Capitanio GL, Indiveri F. Determination of soluble HLA-G and HLA-A, -B, and -C molecules in pregnancy. *Transplant Proc* 1999; 31(4):1841-3.

- 25- Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens*. 2002;60(2):122-32.
- 26- Pfeiffer KA, Fimmers R, Engels G, van der Ven H, van der Ven K. The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod*. 2001;7(4):373-8.
- 27- Le Bouteiller P, Blaschitz A. The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol Rev*. 1999;167:233-44.
- 28- Le Bouteiller P, Solier C, Pröll J, Aguerre-Girr M, Fournel S, Lenfant F. Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Hum Reprod Update*. 1999;5(3):223-33.
- 29- Aldrich CL, Stephenson MD, Karrison T, Odem RR, Branch DW, Scott JR, Schreiber JR, Ober C. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod*. 2001;7(12):1167-72.
- 30- Dahl M, Hviid TV. Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. *Hum Reprod Update*. 2012;18(1):92-109. doi: 10.1093/humupd/dmr043.
- 31- O'Brien M, Dausset J, Carosella ED, Moreau P. Analysis of the role of HLA-G in preeclampsia. *Hum Immunol*. 2000;61(11):1126-31.
- 32- Hara N, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S, Okai T, Taketani Y. Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody "87G" and anti-cytokeratin antibody "CAM5.2". *Am J Reprod Immunol*. 1996;36(6):349-58.
- 33- Somigliana E, Viganò P, Vignali M. Endometriosis and unexplained recurrent spontaneous abortion: pathological states resulting from aberrant modulation of natural killer cell function? *Hum Reprod Update*. 1999;5(1):40-51.
- 34- Van der Ven K, Pfeiffer K, Skrablin S. HLA-G polymorphisms and molecule function--questions and more questions--a review. *Placenta*. 2000;21 Suppl A:S86-92

- 35- Athanassakis I, Paflis M, Ranella A, Vassiliadis S. Detection of soluble HLA-G levels in maternal serum can be predictive for a successful pregnancy. *Transplant Proc.* 1999;31(4):1834-7.
- 36- Regan L, Rai R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14(5):839-54.
- 37- Harlap S, Shiono PH. Alcohol, smoking, and incidence of spontaneous abortions in the first and second trimester. *Lancet* 1980;2(8187):173-6.
- 38- Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1988;319(4):189-94.
- 39- Gibbs RS, Karlan BY et al. Danfoth's obstetrik ve jinekoloji 10. Baskı (Ayhan A, Taşkiran Ç ve ark. Çev), 2010 Güneş tıp kitabevi, Syf 60-69
- 40- Fang Y, Kong B, Yang Q, Ma D, Qu XMDM2 309 polymorphism is associated with missed abortion. *Hum Reprod.* 2009;24(6):1346-9.
- 41- Cunningham FG, Bloom SL, et al. Williams Obstetrik 23.baskı, (Ceylan Y, Yıldırım G ve ark. çev) 2010 Nobel tıp kitabevi, Syf 215-237
- 42- Deaton JL, Honoré GM, Huffman CS, Bauguess P. Early transvaginal ultrasound following an accurately dated pregnancy: the importance of finding a yolk sac or fetal heart motion. *Hum Reprod* 1997;12(12):2820-3.
- 43- Uzelac PS, Garmer HS Erly Pregnancy Risks Ed: DeCherney AH, Nathan L et al, *Current Obstetrics and Gynecology* 10. Edition pg 259-272 by the McGraw-Hill Companies 2007 US.
- 44- Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, et al. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 2000;320(7251):1708-12.
- 45- Fortner KB, Szymanski LM, et al. John Hopkins jinekoloji ve Obstetri, Oral E. ve ark. çev. Syf 393-396
- 46- Chatenoud L, Parazzini F, di Cintio E, et al. Paternal and maternal smoking habits before conception and during the first trimester: relation to spontaneous abortion. *Ann Epidemiol* 1998;8(8):520-6
- 47- Windham GC, Von Behren J, Fenster L, et al. Moderate maternal alcohol consumption and risk of spontaneous abortion. *Epidemiology* 1997;8(5):509-14.

- 48- Li DK, Liu L, Odouli R. Exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and risk of miscarriage: population based cohort study. *BMJ* 2003;327(7411):368.
- 49- Kline J, Stein Z, Susser M, Warburton D. Fever during pregnancy and spontaneous abortion. *Am J Epidemiol* 1985;121(6):832-12.
- 50- Andersen AM, Vastrup P, Wohlfahrt J, et al. Fever in pregnancy and risk of fetal death: a cohort study. *Lancet* 2002;360(9345):1552-6.
- 51- Helgstrand S, Andersen AM. Maternal underweight and the risk of spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84(12):1197-201
- 52- Landres IV, Milki AA, Lathi RB. Karyotype of miscarriages in relation to maternal weight. *Hum Reprod* 2010;25(5):1123-6.
- 53- Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340(23):1796-9.
- 54- Sawyer E, Ofuasia E, Ofili-Yebovi D, et al. The value of measuring endometrial thickness and volume on transvaginal ultrasound scan for the diagnosis of incomplete miscarriage. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007;29(2):205-9.
- 55- Goldstein SR. Significance of cardiac activity on endovaginal ultrasound in very early embryos. *Obstet Gynecol* 1992;80(4):670-2.
- 56- Tongsong T, Wanapirak C, Srisomboon J, et al. Transvaginal ultrasound in threatened abortions with empty gestational sacs. *Int J Gynaecol Obstet* 1994; 46(3):297-301.
- 57- Filly, RA. Ultrasound evaluation during the first trimester. In: *Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology*, 3rd ed, Callen, PW (Ed). W.B. Saunders Co, Philadelphia 1994. p. 63.
- 58- Küçük T, Duru NK, Yenen MC, Dede M, Ergün A, Başer I. Yolk sac size and shape as predictors of poor pregnancy outcome. *J Perinat Med*. 1999;27(4):316-20.
- 59- Bromley B, Harlow BL, Laboda LA, Benacerraf BR. Small sac size in the first trimester: a predictor of poor fetal outcome. *Radiology*. 1991 178(2):375-7.
- 60- Pearlstone M, Baxi L. Subchorionic hematoma: a review. *Obstet Gynecol Surv*. 1993;48(2):65-8.

- 61- Rizzo R, Andersen AS, Lassen MR, Sørensen HC, Bergholt T, Larsen MH, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR, Hviid TV. Soluble human leukocyte antigen-G isoforms in maternal plasma in early and late pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2009;62(5):320-38.
- 62- Steinborn A, Varkonyi T, Scharf A, Bahlmann F, Klee A, Sohn C. Early detection of decreased soluble HLA-G levels in the maternal circulation predicts the occurrence of preeclampsia and intrauterine growth retardation during further course of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2007;57(4):277-86.
- 63- Fanchin R, Gallot V, Rouas-Freiss N, Frydman R, Carosella ED. Implication of HLA-G in human embryo implantation. *Hum Immunol*. 2007;68(4): 259-63.
- 64- Van der Meer A, Lukassen HG, van Cranenbroek B, Weiss EH, Braat DD, van Lierop MJ, Joosten I. Soluble HLA-G promotes Th1-type cytokine production by cytokine-activated uterine and peripheral natural killer cells. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(2):123-33.
- 65- Rebmann V, Switala M, Eue I, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a German multi-centre study. *Hum Reprod*. 2010;25(7):1691-8.
- 66- Hunt JS, Jadhav L, Chu W, Geraghty DE, Ober C Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(3):682 -8.
- 67- Steinborn A, Rebmann V, Scharf A, Sohn C, Grosse-Wilde H Placental abruption is associated with decreased maternal plasma levels of soluble HLA-G. *J Clin Immunol*. 2003 Jul;23(4):307-14.
- 68- Yie SM, Li LH, Li YM, Librach C. HLA-G protein concentrations in maternal serum and placental tissue are decreased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(2):525-9.
- 69- Hackmon R, Koifman A, Hyodo H, Glickman H, Sheiner E, Geraghty DE. Reduced third-trimester levels of soluble human leukocyte antigen G protein in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;197(3):255.e1-5.
- 70- Cecati M, Giannubilo SR, Emanuelli M, Tranquilli AL, Saccucci F. HLA-G and pregnancy adverse outcomes. *Med Hypotheses*. 2011;76(6):782-4.

- 71- Hunt JS, Morales PJ, Pace JL, Fazleabas AT, Langat DK. A commentary on gestational programming and functions of HLA-G in pregnancy. Placenta. 2007;28 Suppl A:S57-63.
- 72- Jurisicova A, Casper RF, MacLusky NJ, Mills GB, Librach CL. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(1):161-5.
- 73- Jurisicova A, Casper RF, MacLusky NJ, Librach CL. Embryonic human leukocyte antigen-G expression: possible implications for human preimplantation development. Fertil Steril 1996;65(5):997-1002.
- 74- Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, Bencini E, Menicucci A, Baricordi OR. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. Eur J Immunol. 2002;32(2):311-5.