

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTESİ OLAN HASTALARIN
ENDOMETRİYUMLARINDA DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRE
YOĞUNLUĞUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Sertan AKSU

Kadın Hastalıkları ve Doğum AD
Bilim Uzmanlığı

2010

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTESİ OLAN HASTALARIN
ENDOMETRİYUMLARINDA DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRE
YOĞUNLUĞUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Sertan AKSU

Doç.Dr. Eray ÇALIŞKAN
Tez Danışmanı

Prof.Dr İzzet YÜCESOY
Anabilim Dalı Başkanı

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
PROJE NO:2009/26, ÖN ONAY: 3/14

ÖNSÖZ

Gelişen tıp teknolojileri içinde yardımcı üreme tekniklerinin ne kadar hızlı bir ilerleme kaydettiği ve gün geçtikçe daha çok infertil çifte umut olduğu görülmektedir.

Teknolojik gelişmelerdeki ivmenin tıp alanına da yansması hekim ve hastaların geleceğe daha umutla bakmasına ve infertil çiftlerin giderek daha da artan oranda bebek sahibi olabilmelerine yol açmaktadır.

Gelişen teknolojiye paralel olarak endometriyumun bağışıklık durumunun flowsitometrik incelenbilmesi infertilitenin sebeplerinin araştırılmasında daha çok çiftin infertilite tedavisine olanak sağlamak açısından önemlidir.

Gerek tez çalışmam boyunca gerekse uzmanlık eğitimim süresince bana daima yardımcı olan bilgi birikimi ve tecrübeleriyle çalışmalarına ışık tutan tez danışmanım Sayın Hocam Doç.Dr.Eray ÇALIŞKAN başta olmak üzere Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. İzzet YÜCESOY ve değerli öğretim üyeleri Prof.Dr. Semih ÖZEREN, Prof.Dr. Aydın ÇORAKÇI, Doç.Dr. Gülseren YÜCESOY, Doç.Dr. Sebiha ÖZDEMİR ÖZKAN, Yard. Doç.Dr. Emek DOĞER 'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmalarımda emeği geçen değerli hocalarım Prof.Dr. Erdal KARAÖZ ve Yrd. Doç.Dr. Gülçin GACAR'a ve tüm KÖGEM çalışanlarına, ayrıca bu yola beraber başladığım değerli kardeşlerim Dr. Nagihan YILMAZ ve Dr. Öner AYNIOĞLU'na ve tüm asistan-çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

En zor günlerimde hep yanımda olup tüm zorlukları göğüslememde bana yardımcı olan biricik eşim Dr. Gülden AKSU'ya, hissettirdikleri manevi destek için anneme, babama ve ablama en derin sevgi ve saygılarımı sunarım.

Dr.Sertan Aksu

MAYIS-2010

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	3
İÇİNDEKİLER	4
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	6
ŞEKİLLER DİZİNİ	7
TABLO DİZİNİ	8
1- AMAÇ VE KAPSAM	9
2- GENEL BİLGİ.....	11
2-1 İNFERTİLİTE	11
2-1-1 TANIM.....	11
2-1-2 İNFERTİLİTE NEDENLERİ.....	12
2-2 TEMEL İNFERTİLİTE DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ.....	12
2-2-1 ERKEK FAKTÖRÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ VE SPERM ANALİZİ.....	12
2-2-2 OVULASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ	14
2-2-3 OVER REZERVİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	15
2-2-4 UTERUS KAVİTESİ VE TUBAL GEÇİSİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	15
2-3 NEDENİ AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE.....	16
2-4 BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ.....	16
2-4-1 BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	17
2-4-2 BAĞIŞIKLIK YANITININ GENEL ÖZELLİKLERİ	17
2-4-3 BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNİN ELEMANLARI	22
2-5 İMPLANTASYON GEBELİK VE BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ	26
2-6 DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRELER.....	30
2-7 DENDRİTİK HÜCRELER.....	32
2-7-1 MATÜR VE İMMATÜR DENDRİTİK HÜCRELERİN ÖZELLİKLERİ.....	34
2-7-2 DENDRİTİK HÜCRELERİN İŞLEVLERİ	35
2-8 HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİ	39
2-8-1 HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİNİN YAPI VE İŞLEVLERİ	40
3- GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3-1 GEREKLİ MALZEMELER	47

3-1-1 REAKTİFLER	47
3-1-2 DİĞER MALZEMELER	47
3-2 VAKA SEÇİMİ	48
3-3 DENEYİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ.....	49
3-3-1 İNSAN ENDOMETRİYUMUNDAN HÜCRE İZOLASYONU	49
3-3-2 İNSAN ENDOMETRİYUMUNDAN ELDE EDİLEN HÜCRELERİN FLOW SİTOMETRİ AYGITINDA İNCELENMESİ	49
3-5 İSTATİKSEL ANALİZ.....	51
4- BULGULAR	52
5- TARTIŞMA.....	63
6- SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
7- ÖZET	70
8- ABSTRACT	72
9- KAYNAKLAR.....	74
10- EKLER	85

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- FSH-** Folikül Stimüle Edici Hormon
LH- Luteinize Edici Hormon
TSH- Tiroid Stimüle Edici Hormon
E2- Östradiol
PRL- Prolaktin
MHC- Major Histokompatibilite Kompleksi
IL- İnterlökin
IFN γ - İnterferon gamma
TGF β - Dönüştürücü Büyüme Faktörü β
CD- Clusters Of Differentiation
RES- Retiküloendotelyal Sistem
LAK- Lenfokin Aktive Edici Killer
TNF α - Tümör Nekroze Edici Faktör α
HLA- İnsan Lökosit Antijeni
KIR- Killer İnhibitor Reseptörü
PIBF- Progesteronla İndüklenen Blokan Faktör
G-CSF- Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör
GM-CSF- Granülosit Monosit Koloni Stimüle Edici Faktör
LIF- Lösemi İnhibe Edici Faktör
DH- Dendritik Hücre
LPS- Lipopolisakkarit
PGE2- Prostoglandin E2
EGF- Epidermal Büyüme Faktörü
LT- Lökotrien
VLA- Çok Geç Aktive Olan Antijen

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1- Açıklanamayan infertilite grubunun ve kontrol grubunun yaş dağılımı.

Şekil 4.2- Açıklanamayan infertilite ve kontrol grubunun endometriyum CD4+ hücre yüzdesi median değerleri.

Şekil 4.3- Açıklanamayan infertilite grubunun CD4+ hücre akım sitometri analiz örneği.

Şekil 4.4- Kontrol grubunun CD4+ hücre akım sitometri analiz örneği.

Şekil 4.5- Açıklanamayan infertilite ve kontrol grubunun endometriyum CD4/CD8 median değerleri.

Şekil 4.6- Açıklanamayan infertilite ve kontrol grubunun CD103+ endometriyum hücre yüzdesi ortanca değerleri.

Şekil 4.7- Açıklanamayan infertilite grubunun CD103+ hücre akım sitometri analiz örneği.

Şekil 4.8- Kontrol grubunun CD103+ hücre akım sitometri analiz örneği.

Şekil 4.9- Açıklanamayan infertilite ve kontrol grubunun endometriyum CD16+ hücre yüzdesi ortanca değerleri.

Şekil 4.10- Açıklanamayan infertilite grubunun CD16+ hücre akım sitometri analiz örneği.

Şekil 4.11- Kontrol grubunun CD16+ hücre akım sitometri analiz örneği

TABLO DİZİNİ

Tablo 4.1- Açıklanamayan infertilite ve kontrol grubunun yaş, vücut kitle indeksi, FSH, LH, E2, PRL, TSH, antral folikül sayıları ve progesteron düzeyleri ortalaması.

Tablo 4.2- Serum progesteron seviyeleri ve endometriyal histolojik günleme sonuçları.

Tablo 4.3- Endometriyal lenfositlerin yüzey işaretçilerine göre median değerleri.

1- AMAÇ VE KAPSAM

Nedeni açıklanamayan infertilite tanısı, infertilite araştırmasındaki tüm standart testlerin normal çıkması sonrası konulmaktadır. İnfertil populasyonda insidansı, tanı kriterlerine bağlı olarak %10-30 arasında değişmektedir (1).

Nedeni açıklanamayan infertilite, normal üreme etkinlik dağılımının alt sınırını veya standart değerlendirme metodlarıyla tanısı konulamayan sperm veya oosit fonksiyon anormallikleri, fertilizasyon, implantasyon veya embriyo gelişim bozukluklarını içermektedir (1).

İnfertilite değerlendirilmesinde yapılan temel tetkikler erkek faktörü değerlendirmesinde kullanılan semen incelemesi, ovulasyon olduğunun tespiti ve endometriyal kaviteyle tubal pasajın değerlendirildiği histerosalpingografiyi içermektedir.

Bu standart incelemeler sonrası infertilite sebebi bulunamayan hastalar açıklanamayan infertilite tanısı almaktadır. Elbette yapılan standart incelemelerin tüm infertilite nedenlerini ortaya koyması beklenemez. Bu noktadan yola çıkan birçok çalışma endometriyal yerel çevrenin infertilite sürecine etkisini araştırmayı amaçlamıştır.

Kadın infertilitesinin sebeplerinden biri olan endometriyal nedenler luteal faz yetmezliğinden embryotoksik faktörlerin salınımı, anormal integrin/adezyon molekülleri, anormal T hücre ve doğal öldürücü aktivitelere kadar geniş bir yelpazede dağılmıştır (2).

Endometriyum lenfosit topluluğunun anne immun sistemine yabancı olan fetusa karşı geliştirdiği tolerans mekanizmasında doğal öldürücü hücrelerinin rolü dikkate değerdir. Doğal öldürücü hücrelerin implantasyon aşamasındaki etkileri hastalar arasında farklılık gösterebilir ve bu farklılığın ortaya konması da farklı tedavi seçeneklerini beraberinde getirebilir.

Trofoblastik invazyon ve implantasyon gebeliğın sağlıklı devam edebilmesi açısından önemlidir.

Endometriyal bağışıklık durumunda özellikle de implantasyon döneminde fetal toleransın gösterilebilmesi açısından birtakım değişiklikler olmaktadır. Fetal toleransın gösterilemediği ve implantasyonun oluşamadığı durumlar klinik olarak başarısız gebelikler ve tekrarlayan dşklerle karşımıza çıkmaktadır. Özellikle endometrial doğal öldürücü hücre durumunun implantasyon başarısızlığı ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (3).

Fetusun anne tarafından yabancı olarak algılanmaması için bağışıklık durumundaki değişiklikler implantasyonun önemli bir ayağını oluşurmaktadır.

Bu çalışmada açıklanamayan infertilite olgularındaki standart değerlendirme yöntemleriyle ortaya konamayan ve infertiliteye sebep olması muhtemel endometriyal bağışıklık durumunun ve doğal öldürücü hücre yoğunluğunun açıklanamayan infertilite hastalarına etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

2- GENEL BİLGİLER

2.1 İNFERTİLİTE

2.1.1 TANIM

İnfertilite, korunmasız cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebe kalınmaması olarak tanımlanmaktadır. Bu durum, üreme yaş grubundaki çiftlerin % 10-15'ini etkilemektedir.

İnfertilite araştırmalarına korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen 1 yıl gebe kalınmaması sonrası başlanır. Ancak 35 yaş ve üzerindeki kadınlarda 6 ay gebe kalamama araştırmalara başlamak için yeterli görülmektedir (4).

Primer infertilite daha önce hiç gebelik elde edilemeyen durumu tanımlarken, sekonder infertilite daha önce gebelik elde edildiği halde sonrasında korunmasız ilişkiye rağmen gebelik sağlanamaması durumunu tanımlar.

Fekundite ise gebe kalmak için girişimde bulunulan menstrual siklustaki gebe kalınabilme olasılığıdır (5). Genel popülasyondaki fekundabilite hızı %30 düzeyindeyken infertil popülasyonda ise %1-3 düzeyindedir (6).

Üreme yeteneği erkek ve dişi üreme sistemi organlarının mükemmel fonksiyonları ve ilişkisinin bir sonucudur. Bu ilişki erkekte normal sperm durumunu, kadında normal preovulatuvar oosit üretimini, döllenmenin gerçekleşeceği tubal ampulla bölgesine gametlerin taşınmasını, döllenmenin ve embriyonun oluşumunu ve nihayet embriyonun tutunup gelişeceği normal bir endometriyal kavitenin varlığını içermektedir (2).

2.1.2 İNFERTİLİTE NEDENLERİ

İnfertilite sebepleri genel olarak erkek partnere ait sebepler (%19), dişi partnere ait sebepler (%46,7) ya da her iki partnerin de sebep olduğu infertilite (% 18,2) ve nedeni açıklanamayan infertilite (%16,1) olarak tanımlanabilir (2). İnfertilite sebeplerini sıralayacak olursak bunlar;

- 1- Tuboperitoneal sebepler (pelvik inflamatuvar hastalık, endometriozis vb.)
- 2- Overe ait sebepler (over rezervinde azalma, ovulatuvar bozukluklar)
- 3- Uterusa ait sebepler
- 4- Servikal sebepler
- 5- Endometriuma ait sebepler
- 6- Nedeni açıklanamayan infertilite
- 7- İmmunolojik sebepler
- 8- Erkek partnere ait sebepler

olarak sayılabilir.

2.2 TEMEL İNFERTİLİTE DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

Temel olarak infertilite değerlendirmesinde kullanılan testler sperm değerlendirmesini, ovulasyonun objektif olarak gösterilmesini, overyen rezerv testlerini ve histerosaalpingografi değerlendirilmesini kapsar.

2.2.1 ERKEK FAKTÖRÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ VE SPERM ANALİZİ

İnfertil çiftin ortak değerlendirilmesi erkeğin tıbbi hikayesi ve sperm analizi ile başlamaktadır. Tıbbi hikaye alınırken daha önce evlenip evlenmediği eğer

evlenmiş ise çocuğu olup olmadığı, kriptorşidizm öyküsü, geçirilmiş genitoüriner cerrahi, tütün, alkol, ilaç kullanımı detaylı olarak sorgulanmalıdır.

Sperm morfolojisi sperm parametreleri arasında en önemlilerinden biridir. Morfoloji bozukluğu teratospermi olarak adlandırılır. Günümüzde morfoloji değerlendirilmesinde Dünya Sağlık Örgütünün de desteklediği Kruger' in kesin kriterleri de kullanılmaktadır. Spermilerin baş, akrozom, stoplazma ve kuyruklarının değerlendirildiği bu incelemede normal morfolojik indeksin %14'ün üstünde olması beklenir.

Motilite analizinde spermilerin hızlı doğrusal ileri hareketinin olması ve bu gruptaki spermilerin %25'in üzerinde olması gerekmektedir. Toplam hareketli sperm yüzdesi ise incelenenlerin %50'sinden fazla olmalıdır. Motilite bozuklukları astenospermi olarak adlandırılmaktadır.

Sperm sayısı bozuklukları ise hafif-orta oligospermiden ejakulatta hiç sperm olmaması durumu olan azospermiye kadar değişmektedir. Sperm analizi anormal olan erkeklerin testleri Dünya Sağlık Örgütü önerilerine göre bir ay sonra tekrarlanmalıdır. Dünya sağlık örgütü sperm analizinde sayı, morfoloji ve motilite araştırılması için kestirim değerleri belirlemiştir (7).

Dünya Sağlık Örgütü normal sperm parametreleri

Hacim	2-5 ml
Ph	>7.2
Sperm Konsantrasyonu	>20 milyon/ml
Total Sperm Sayısı	>40milyon/ejekulat
Motilite Yüzdesi	>%50
İleri Hareketli Sperm Sayısı	>%25
Normal Morfoloji	>%30
Lokosit	≤1milyon/ml
Fruktoz	≥13 mol/ejekulat

2.2.2 OVULASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ

İnfertil kadınların %40'ına varan kısmında altta yatan neden ovulasyon kusurlarına bağlıdır. İnfertil çiftler ele alındığında ise bu oran %15 lik bir bölümü oluşturmaktadır (4). Bu kadınların adet döngüleri sorgulandığında çoğunlukla ovulasyon kusurlarına ait ipuçları elde edilebilir.

Hastaların öykülerinde over yetmezliği yapabilecek otoimmün hastalık, radyoterapi ve kemoterapi varlığı sorgulanmalıdır. Ayrıca hiperprolaktinemi, troid disfonksiyonu ve polikistik over sendromu semptomları dikkatlice değerlendirilmelidir.

Kilo değişiklikleri, stres ve egzersiz durumu da ovulasyonu etkileyebileceklerinden öyküde sorulması gereken önemli noktalardır.

Anovulatuvar olgular hormon değerlendirme sonuçlarına göre 4 grupta incelenirler.

- 1- Hipogonadotropik hipogonadizmli anovulasyon olguları
- 2- Hipergonadotropik hipogonadizmli anovulasyon olguları
- 3- Normogonadotropik anovulasyon olguları
- 4- Hiperprolaktinematik anovulasyon olguları

Hipogonadotropik hipogonadizmli anovulasyon olgularında neden çoğu kez idiopattiktir. Diğer nedenler arasında kilo değişiklikleri, aşırı egzersiz ve kilo kaybı sayılabilir.

Hipergonadotropik hipogonadizmli anovulasyon ise rezistan over sendromu, prematür over yetmezliği ve menapoz gibi nedenlere bağlı gelişmektedir.

Polikistik over sendromu olgularının büyük kısmını oluşturduğu normogonadotropik olgularda ise nadiren adrenal disfonksiyon da altta yatan sebeplerden biri olabilmektedir.

Hiperprolaktinemi ve prolaktin hormonu değerlendirmesi infertilite pratiğinde önemli bir diğer konudur. Hastalar, galaktore ve ilaç kullanımı açısından dikkatle sorgulanmalı ve muayene edilmelidir. Hiperprolaktinemisi olan %3-5 olguda ise altta

yatan bir hipotroidi olabileceği akılda tutulmalı ve troid fonksiyonları da değerlendirilmelidir.

Normal adet döngüsü, ovulasyonun olduğunu yüksek oranda gösterir. Çünkü normal adet döngüsüne sahip kadınların sadece çok az bir kısmında serum progesteron seviyeleri anaovulatur düzeylerdedir (8).

Bununla birlikte günlük bazal vücut ısı kaydı, idrar luteinizan hormon ölçümü, midluteal serum progesteron ölçümü ve endometriyal biopsi ile histolojik günleme ovulasyon tespitinde kullanılan diğer testlerdir.

2.2.3 OVER REZERVİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İnfertilite araştırmasında kullanılan diğer bir inceleme de over rezervinin değerlendirilmesidir. İleri kadın yaşı ve geçirilmiş over cerrahisi azalmış over rezervi açısından risk teşkil etmektedir. Over rezerv testleri invaziv olmamaları nedeniyle çoğu klinisyen tarafından infertilite değerlendirmesinde başvurulan ilk testlerdir.

Over rezerv testleri, 3. gün serum FSH ve E2 düzeyleri, klomifen sitrat sataşma testi ve ultrasonografi ile antral folikül sayısının tespitini kapsamaktadır (4). Bu testler infertilitenin kesin belirteçleri olarak kabul edilmeseler de, ovulasyon indüksiyonuna kötü over yanıtını ve başarısız tüp bebek sonuçlarını öngörmeye değerlidirler.

2.2.4 UTERUS KAVİTESİ VE TUBAL GEÇİŞİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tubal geçiş ve uterus kavitesi değerlendirilmesi temel infertilite araştırmasının vazgeçilmez bir parçasıdır (4). Bu değerlendime histerosalpingografi ile yapılabilir. Histerosalpingografi işlemi servikal kanaldan bir kanül yardımıyla uterus kavitesine radyoopak madde vermeye ve bu maddenin tüplerden geçerek peritona dağılmasını X ışınları aracılığıyla gösterme esasına dayanır.

Histerosalpingografi ile yapılan tubal değerlendirme ile laparoskopi ile yapılan kromopertubasyon karşılaştırıldığında %90'a varan benzer sonuçlar bildirilmiştir (9).

Uterus kavitesinin değerlendirmesinde özellikle erken folikuler fazda yapılan ultrasonografi, sonohisterografi ve intrakaviter direkt gözleme olanak veren histeroskopi kullanılmaktadır.

Histerosalpingografi, sonohisterografi uterus kavitesini değerlendirmede ayaktan uygulama yöntemleri olmakla beraber günümüzde tanısal ofis histeroskopi kavite değerlendirmesinde "altın standart" yöntemdir (10).

2.3 NEDENİ AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE

Nedeni açıklanamayan infertilite tanısı, infertilite araştırmasındaki tüm standart elemanların normal çıkması sonrası konulmaktadır. İnsidansı, infertil popülasyondaki tanı kriterlerine bağlı olarak %10-30 arasında değişmektedir. Neden olan kusur veya fonksiyon bozukluğu tam olarak bilinemediği için günümüzde yapılan tedavi yöntemleri de genellikle empiriktir (4).

Açıklanamayan infertilite tedavisinde kullanılan yöntemler empirik olup ilişki zamanlaması, yaşam şekli değişikliği, klomifen sitrat veya gonodotropinlerle ovulasyon induksiyonu ve intrauterin inseminasyondan tüp bebek uygulamasına kadar değişmektedir.

2.4 BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ

Bağışıklık sistemi vücuda giren hertürlü yabancı maddeye karşı geliştirilmiş olan yanıtların bir bütünüdür.

2.4.1 BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Bağışıklık, organizmanın başta mikroorganizmalar olmak üzere her türlü yabancı maddeye karşı verdiği yanıtı tanımlamak üzere kullanılır. Bağışıklıktan sorumlu hücre ve moleküller bağışıklık sistemini oluşturur. Yabancı madde ile karşılaştığında bağışıklık sisteminin değişik kompartmanlarının karşılıklı ve düzenli etkileşimleriyle ortaya çıkan cevaba bağışıklık yanıtı, bağışık yanıtı yol açan yabancı maddelere de “immünojen” denir.

“Antijen” ise lenfositler üzerinde bulunan, T ve B hücre reseptörlerince tanınan moleküllere verilen isimdir.

İmmünojen ve antijen sıklıkla birbirlerinin yerine kullanılmakla beraber aralarında hafif bir anlam farklılığı vardır, immünojen bir bağışıklık yanıtı uyandırabilen antijenlere verilen isimdir. Antijen terimi ağırlıklı olarak bir molekülün özgün bağışıklığın ürünleri ile etkileşime girebilme yeteneğini tanımlar. Bir yabancı ajan ne kadar karmaşık ise o kadar immünojeniktir. Antijenler ufak kimyasal yapılar olabildikleri gibi ileri derecede karmaşık moleküller de olabilirler. İmmünojenler çoğunlukla protein (lipoprotein, glikoprotein, nükleoprotein gibi) yapıdadır. Bağlandıkları antijenleri daha immünojenik hale getiren ve antijene özgü bağışıklığı antijenden bağımsız olarak daha da arttıran maddelere “adjuvan” denir (11,12).

2.4.2 BAĞIŞIKLIK YANITININ GENEL ÖZELLİKLERİ

Özgünlük: Antijenlerin lenfositler tarafından özgün olarak tanınan kısımlarına antijenik tanımlayıcı ya da “epitop” denir.

Alt soy seçimi hipotezine göre daha bağışıklanmamış yani özgün antijeni ile karşılaşmamış, uyarılmamış bir insanda her türlü yabancı antijeni tanıyıp tepki verebilecek antijene özgün lenfosit alt soyları mevcuttur.

Ana lenfoid organlar sürekli lenfosit üretir ve son organlara yollar. Bir lenfosit alt soyundaki bütün hücrelerin antijeni tanıyan reseptörleri (B lenfositlerde yüzey immunglobulinleri, T lenfositlerde T hücre reseptörü) birbirinin aynıdır, dolayısıyla da tek bir antijene özgündürler.

Yabancı antijen organizmaya girdiğinde kendine özgü yüzey reseptörünü taşıyan lenfosit alt soyu uyarılır. O alt soy çoğalmaya başlar ve efektör ya da hafıza hücrelerine farklılaşır. Bu olaya birincil bağışıklık yanıtı denir.

O antijenle bir kez daha karşılaşıldığında bağışıklık yanıtı daha çabuk ve daha güçlü şekilde gelişir. Buna ikincil bağışıklık yanıtı denir. Bu güçlenme antijenle ilk karşılaşmada gerçekleşen bağışıklıklığın sonucu antijene özgü lenfositlerin alt soylarının genişlemesine bağlıdır.

Çeşitlilik: Memeli bağışıklık sisteminin yaklaşık 1015 değişik antijenik yapıyı tanıyabilecek kapasitede olduğu sanılmaktadır. Buna "lenfosit repertuarı" denir.

Hafıza: Bağışıklık sisteminin yabancı bir antijenle karşılaşması o antijenle daha sonraki temaslarda oluşacak bağışıklık yanıtını hızlandırır ve kuvvetlendirir. Bu özelliğe bağışıklık sistemi hafızası denir.

Kendini Yabancıdan Ayırt Etmek: Bağışıklık sistemi kendine ait (self) antijenlerini yabancı antijenlerden ayırt eder. Kendine ait ve potansiyel olarak antijenik yapılara bağışıklık yanıtı vermez. Bu duruma kendine tolerans gösterme denir. Kendine tolerans göstermenin gelişmesinde ya da devamında bir bozukluk olduğunda otoimmün hastalıklar gelişir.

Kendini Sınırlama (Oto-Regülasyon): Antijenik uyarımı takiben bütün normal bağışıklık yanıtları kendi kendini sınırlar. Bağışıklık yanıtı antijeni yok etmeye yöneliktir. Bu amaca ulaşıldığında lenfosit uyarılmasından sorumlu antijen ortadan kalkmış olacağından bağışıklık yanıtının da zamanla sönmesi ve yeni antijenlerle savaşmaya hazır durumda beklemesi gerekir.

Uzmanlaşma: Değişik mikroorganizmalara karşı savunmada en iyi yanıtları sağlayabilmektir (13).

Özgün bağışıklık yanıtının başlıca 3 özelliği mevcuttur: tanıma, uyarılma ve etkin faz.

Tanıma, bütün immün yanıtlar yabancı antijenin tanınmasıyla başlar. B lenfositler çözünebilir formdaki yabancı protein, polisakkarit ya da lipit antijenleri yüzeylerinde bulunan o antijene özgün zar immünoglobülin molekülü ile tanır. T lenfositler ancak başka bir hücrenin yüzeyinde ve kendine ait MHC (Major histocompatibilite kompleksi) molekülleriyle birlikte sunulan kısa peptid halinde işlenmiş protein antijenleri tanır. T lenfositte bağımlı olmayan antijenler hariç özgün bağışıklık yanıtının oluşturulabilmesi için önce antijenin antijen sunan hücre tarafından işlenmesi gerekir. Antijen vücuda girdikten sonra antijenin antijen sunan hücreler tarafından yakalanıp işlenir ve sınıf II MHC molekülleri ile birlikte T yardımcı hücrelere sunulur.

B lenfositler de yüzey immünoglobülin reseptörleri aracılığıyla özgün antijenlerini yakalayıp sınıf II MHC molekülleriyle birlikte T lenfositlere sunabilir. Lipopolisakkarit ya da polisakkarit yapıdaki timustan ya da T lenfositten bağımsız antijenler denen bu antijenlere karşı antikor yapımı için T yardımcı yardımı şart değildir. Bu tür antijenler yüksek yoğunlukta birçok alt soya dönüşme potansiyelli B hücre uyarımı yaparlar. Düşük yoğunlukta ise özgün B hücre uyarımı yaparlar. Yapılan antikorlar başlıca IgM ve IgG3 yapısında olup sınıf değişikliğine uğramazlar ve affinite olgunluğu gösteremezler. Bellek B hücreleri de gelişmez (13).

Uyarılma, bütün lenfositler antijenik uyarıya cevap olarak sitokinler, sitokin reseptörleri, gen transkripsiyonu ve hücre bölünmesinde rolü olan çeşitli proteinler gibi yeni bazı proteinler yaparlar, çoğalırlar ve dolayısıyla alt soy genişlemesi ile yabancı antijeni ortadan kaldırmaya yönelik etkileme fonksiyonlarını yapacak yetenekte hücrelere farklılaşırlar (diferansiyasyon). Böylece, antijenini tanıyan B lenfosit, antikor oluşturan ‘plazma hücresi’ne dönüşür ve antikor üretir. Bu antikor hücre dışındaki çözünebilir antijeni bağlar ve onu ortadan kaldıracak mekanizmaları harekete geçirir.

Benzer şekilde kimi T lenfositler de fagositleri aktive ederek ve onların hücre içi mikroorganizmaları öldürmelerini kuvvetlendirecek yardımcı T hücrelerine dönüşürken, diğer bazı T lenfositler, yabancı antijen taşıyan virüsle enfekte hücre veya tümör hücresi gibi hücreleri öldürebilme kapasitesi taşıyan sitotoksik T lenfositlere farklılaşırlar.

Lenfosit uyarılmasının genel bir özelliği sıklıkla iki sinyal gerektirmesidir. Bu sinyallerden bir tanesi antijenle temas sonucunda oluşturulurken, diğeri yardımcı ya da aksesuar hücreler dediğimiz diğere hücreler tarafından sağlanır.

Aksesuar hücreler olarak adlandırılan mononükleer fagositler, dendritik hücreler ve diğere bazı hücreler değışik antijenler için özgünlük göstermezler ancak antijen sunumu ve antijene özgün lenfositlerin aktivasyonunda önemli rolleri vardır. Aksesuar hücrelerin sağladığı ikinci sinyal mikroorganizma veya doğal bağışıklık yanıtlar tarafından uyarılır. Böylece gerektiğinde bağışıklık yanıtının sadece mikroorganizmalar ve diğere zararlı maddelere karşı geliştirilmesi sağlanır (13).

Etkin dönem, antijenleriyle özgün olarak uyarılmış lenfositlerin o antijeni yok etmeye yönelik işlevlerini gösterdikleri evredir.

Bağışıklık yanıtının bu safhasında rol alan hücrelere ‘‘Etkin hücreler’’ denir. Pek çok etkin fonksiyona diğere lenf dışı hücreler ve doğal bağışıklıkta rol alan savunma mekanizmaları da katkıda bulunur, örneğin antikorlar hem yabancı antijenlere bağlanarak bunların kan nötrofil ve mononükleer fagositler tarafından fagosite edilmelerini sağlar hem de kompleman sistemini aktive ederek mikroorganizmaların parçalanma ve fagositozunu mümkün kılar. Yardımcı T lenfositler sitokinler salgılayarak fagosit fonksiyonlarını güçlendirir ve enflamatuvar cevabı uyarırken, T sitotoksik hücreler sitotoksik fonksiyonlarını yürütürler. Bağışıklık yanıtının başlıca düzenleyicisi T yardımcı hücrelerdir. T sitotoksik hücreler ve B lenfositlerin aktivasyonu için T yardımcı hücreler gereklidir. T yardımcı 1 tipi lenfositlerin ürettiği sitokinler makrofaj aktivasyonu ve T sitotoksik hücreleri aracılı fonksiyonlara yani hücreselel immüniteye yardım ederken, T yardımcı 2 tipi lenfositler ürettikleri IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-10 ile B lenfositlerin antikor yapmalarını sağlarlar (13).

Bir antijene karşı oluşacak yanıtın yeri, antijenin vücuda giriş yoluna bağlıdır. Kan dolaşımıyla giren antijenlere karşı bağışıklık yanıtı dalakta başlar. Dokulardaki mikroorganizmalara karşı yanıtlar yerel lenf bezlerinde oluşur. Solunum yolları ya da gastrointestinal kanal mukozasından giren antijenler ise submukozal lenfoid dokularla karşılaşır ki burası hem yerel hem de antijenin girdiği lümen içine yönelen bağışıklık yanıtı oluşturur. Bağışıklık yanıtı nerede başlarsa başlasın daima kan ya da lenf yoluyla başka bölgelere lenfosit trafiğı olur. Bazı antijen sunan hücrelerin kan ve

lenf yoluyla göç ederek antijenleri uzak lenfoid dokulara taşıyabilme kapasitesi vardır (14).

Bağışıklık yanıtının şiddetini etkileyen pek çok faktör vardır. Antijenin yapısı, miktarı, immünojenik gücü ve organizmaya giriş yolu bağışıklık yanıtının gücü ve süresinde etkili faktörlerdir.

Bağışıklık yanıtında kişinin genetik yapısı önemlidir. Herhangi bir antijene verilen bağışıklık yanıtında kişiler arası farklılıklar olabilir. Genetik kontrolde hem MHC bağlantılı hem de MHC bağlantısız genlerin rolü vardır. Bağışıklık yanıtı bir kez başladıktan sonra birbirleriyle sıkı ilişki içinde bağışıklık yanıtını kontrol eden ve düzgün bir şekilde sönmelerini sağlayan bazı mekanizmalar sırasıyla özetlenmiştir.

Antikor yapımı negatif geri bildirim etkisiyle aynı antikordan daha fazla yapılmasını inhibe eder çünkü antikor antijeni ortadan kaldırarak immünojenik uyarıyı bitirmiş olacaktır.

Antikor moleküllerinin antijen bağlayan bölgelerindeki antijenik belirleyicilere "idiotip" denir. Bunlar kişinin kendi antijeni olmakla beraber bağışıklık yanıtı sırasında miktarları arttığı zaman immünojenik olurlar ve bunlara karşı anti – idiotipik antikorlar gelişir. Bağışıklık yanıtın sonlanmasında bu idiotip - antiidiotip antikor etkileşimlerinin rolü olduğu düşünülmektedir.

T yardımcı 1 hücreler tarafından salgılanan $IFN\gamma$, T yardımcı 2 hücrelerini dolayısıyla da antikor oluşumunu baskılayarak T yardımcı 2 hücrelerce salgılanan IL-10, T yardımcı 1 lenfositleri ve hücresel bağışıklığın çeşitli fonksiyonlarını baskılayarak. Aktif T lenfositler, mononükleer fagositler ve diğer bazı hücreler tarafından yapılan dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) T hücrelerinin çoğalma ve farklılaşmalarını, makrofajların aktivasyonunu baskılayarak, enflamasyon uyarıcı sitokinlerin etkilerini azaltır.

Ayrıca santral sinir sisteminde gelişen bazı olaylar bağışıklık fonksiyonlarını etkileyebilir. Stres yaratan durumlarda bağışıklık yanıtında baskılanma olabileceği bilinir. Lenfoid organların çoğundaki kan damarlarında ve de bizzat lenfositlerde sempatik uyarı vardır. Lenfositler üzerinde de pek çok hormon, nörotransmitter ve nöropeptid için reseptörler vardır. Kortikosteroidler, endorfinler ve enkefalinler stres sırasında salınan ve vucutta bağışıklık baskılayıcı olan maddelerdir. Kortikosteroidler özellikle T yardımcı 1 yanıtını ve makrofaj uyarılmasını aşağı

çekerlerken TGF β yapımını uyararak dolaylı yoldan da bağışıklık yanıtını baskılayabilirler (15).

2.4.3 BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNİN ELEMANLARI

İntrauterin hayatın henüz ilk haftalarında vücuttaki diğer tüm hücrelere dönüşme yeteneği olan çoklu farklılaşma yeteneği olan kan kökenli kök hücrelerden kokenini alan lenfoid serinin öncü hücrelerinin bir kısmı timik dokuda T lenfositlere, bir kısmı da kemik iliğinde B lenfositlere ve doğal öldürücü hücrelere farklılaşırlar. Timus, kemik iliği dalak, lenf düğümleri, tonsiller, peyer plakları gibi vücut yapıları B, T ve doğal öldürücü hücrelerinin farklılaşma bölgeleri olarak görev yapmaktadır.

Bu hücrelerin farklılaşması onların üzerlerindeki yüzey antijenleri sayesinde olmaktadır. Yüzey antijenleri farklılaşma grupları (Clusters of Differentiation, CD) olarak adlandırılır. CD1, CD2, CD3, CD4 gibi yüzey antijenleri T veya doğal öldürücü hücrelerinde bulunabilirken, CD16 ve CD56 yüzey antijeni ise natural killer hücrelerine özgüdür.

Dolaşımda T ve B hücrelerinin oranları sırasıyla %75 ve %15' tir. Diğer %10 oranındaki lenfosit grubu doğal öldürücü hücreler denen diğer lenfositlerden birçok yönden değişik özelliklerle ayrılan hücrelerce oluşturulur.

Bağışıklık sistemi genel olarak 2 başlık altında incelenmektedir.

- 1- Doğal bağışıklık yanıt
- 2- Kazanılmış bağışıklık yanıt

Doğal Bağışıklık Yanıtı:

Bağışıklık sistemine yabancı olan hücrelere karşı daha önce onlarla hiç karşılaşmadan savunma yapabilen yapılardan oluşmaktadır. Doğal bağışıklık elemanları vücudun farklı yerlerinde farklı yapılarda olabilirler. Kan ve dokularda bulunan makrofajlar, monositler, nötrofiller, bazofiller, eozinofiller, doğal öldürücü hücreler, kompleman sistemi, epiteldeki defansinler ve hatta deri ve mukoz membranların kendileri doğal immüitenin bir parçasıdır.

Doğal immunité sayesinde oluşan yerel yangı yanıtı sonucu lokositler enfeksiyon ajanının bulunduğu yere ulaşıp enfeksiyonu sınırlamaya çalışırlar. Yangı oluşmasının bir diğer etkisi de bazı sistemik yanıtla ra sebep olarak doğal bağışıklık sistemin güçlenmesine katkıda bulunmaktır (16,17).

Makrofajlar 10-15 mikron büyüklüğünde, tek çekirdekli, geniş sitoplazmalı, sitoplazmalarında içi sindirim enzimi dolu çok sayıda lizozomları bulunan, sitoplazma zarları dalgalı olan hücrelerdir. Makrofajlar kemik iliğinde yapılı r. Kana geçer ve monosit adını alırlar. Vücudumuzda doku ve organlarda yaygın olarak bulunurlar. Bu hücreler buldukları yere göre farklı olarak adlandırılırlar, kandaki monositler, akciğerlerdeki alveoler makrofajlar, kemik dokudaki osteoklastlar, sinir dokusundaki mikroglia hücreleri, dalak ve lenf düğümlerindeki makrofajlar, bağ dokusu histiositleri, karaciğerdeki kupffer hücreleri, böbrekte mezangial makrofajlar. Tüm bu hücrelerin oluşturduğu topluluk mononukleer fagositik sistem veya retikuloendotelial sistem (RES) olarak da adlandırılı r.

Makrofajlar, organizmada bulunan ve temizlenmesi gereken madde, mikroorganizma ve tümör hücrelerini fagositoz yaparak ortadan kaldırırlar. Ayrıca B lenfosit, damar endotel hücresi, derideki Langerhans hücresi gibi antijenleri lenfositlere sunarak bağışık yanıtı baslatırlar.

Güçlü fagositoz yetenekleri olan nötrofillerin %90'lık bölümü gerektiğinde kana geçmek üzere kemik iliğinde bulunur. Yabancı dokuları mikroorganizmaları hızla fagosite ederler.

Eosinofillerin ise allerjik olaylarda ve parazitlere karşı savunmada önemli görevleri vardır. Fagositoz yetenekleri sınırlıdır. Ancak; uyarı sonucu granüllerini hücre dışına boşaltırlar.

Bazofiller ve mast hücreleri de, allerjik olaylarda salgıladıkları histamin gibi maddeler sonucu damar geçirgenliğini ve genişliğini artırarak bölgeye diğer savunma elemanlarının gelmesine katkıda bulunurlar.

Periferik kandaki lenfositlerinin %10-15'ini dalaktakilerin %1-2'sini oluşturan doğal öldürücü hücreler ise CD16 ve CD56 yüzey molekülleri taşırlar. Yüzeyinde CD57 (%30-40), CD7, CD2 (%70-90) ve CD8 (%30- 40) gibi diğer antijenler de bulunur. En önemli fonksiyonları tümör hücrelerini ve virüs taşıyan hücreleri ldrmeleridir. Doğal ldrc hücrelerinin sitotoksik etkinliği ve özellikle

virüslü hücrelerin üzerindeki etkinliği gama interferonla artar. Bu şekildeki lenfositlerle aktive olmuş doğal öldürücü hücrelerinin fonksiyonuna LAK (lymphokine activated killer) aktivitesi adı verilir. Doğal öldürücü hücrelerinin bu bilinen işlevlerinin yanında antikorlara bağımlı hücre sel sitotoksikite diye adlandırılan ve ortamdaki hedef hücre antijenlerine karşı öldürücü etki gösteren işlevleri de vardır. Doğal öldürücü hücreler immunglobuline benzer molekülleri kullanmadan hücreleri parçalama yeteneğine sahiptirler. Morfolojik olarak azurofilik granüller içeren büyük sitoplazmalarıyla benzersiz olup; bazen Büyük Granüler Lenfosit adını alırlar (18).

Periferdeki ve uterustaki doğal öldürücü hücrelerinin karakteristik özellikleri CD56 antijenine sahip olmalarıdır (19).

Doğal öldürücü hücreler iki şekilde gösterilir:

- 1- CD16 negatif CD56 pozitif NK hücreleri (CD56 parlak şeklinde de gösterilir)
 - 2- CD16 pozitif CD56 pozitif NK hücreleri (CD56 sönük şeklinde de gösterilir)
- (20).

Kazanılmış Bağışıklık Yanıtı:

Vücuda giren yabancı maddelerle karşılaşıldığında sadece o yapıya özgü yanıt geliştiren ve doğal bağışıklıktan farklı olarak sonraki karşılaşmalarda daha güçlü cevap oluşturan bağışıklık yanıtıdır. Kazanılmış bağışıklık yanıtı oluşturan elemanlar T, B lenfositler, antikorlar, antijen sunan hücreler ve bazı lenfokinlerdir. Kazanılmış bağışıklık yanıt lenf nodları, dalak ve mukozal lenfoid organların oluşturduğu yapılardan kaynaklanırlar.

Kazanılmış bağışıklık T veya B lenfositlerle oluşturdukları bağışıklık cevaba göre Humoral ve Hücre sel bağışıklık olmak üzere ikiye ayrılır.

Hücre sel bağışıklık antijen sunan hücreler tarafından T lenfositlere antijen sunulması sonucu oluşan bağışıklık yanıtıdır. Burada T yardımcı ve T sitotoksik lenfositler mevcuttur.

Kazanılmış bağışıklık yanıtın önemli bir parçası olan T lenfositlerin çok önemli işlevleri bulunmaktadır. Hücre sel bağışıklık cevabla görevli T lenfositler anti-viral ve anti- fungal aktivite, gecikmiş (Tip 4) hipersensitivite, graft versus host

hastalığı ve primer doku reddinde başroldeyirler. Ayrıca birçok hücre ve doku üzerinde uyarıcı, baskılayıcı ve düzenleyici görevleri olan sitokinler de bu hücrelerce salınabilmektedirler. T lenfositler CD4+ T yardımcı ve CD8+ T Sitotoksik olmak üzere başlıca iki alt gruba ayrılır.

T yardımcı 1 hücreler İnterferon gama (IFN- γ), IL-2, Tümör Nekroze edici Faktor- alfa (TNF α) üretirler. Temel olarak bakteri ve parazitlerin opsoninlenmesi, komplemanla fiksasyonu ve makrofajların aktivasyonu sonucu antijenlerin yok edilmesi işlevlerini yürütürler. T yardımcı 1 tipi hücreler fagosit bağımlı yangıda ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunda çok önemli role sahiptirler.

T yardımcı 2 hücreler ise IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 üretirler. İmmunoglobulinler yoluyla uyarılırlar. Eozinofil uyarılması ve farklılaşmasını sağlarlar. Alerjik yangı ve parazitlere karşı bağışıklıkta önemli rol oynamaktadırlar. T yardımcı 1'den farklı olarak fagositten bağımsız yangıda rol alır ve fagositozu engellerler.

CD8+ T lenfositler (Tsitotoksik), periferik T lenfositlerin %20-40'ını oluşturur. Viral ajanlarla enfekte olmuş hücrelerin ve tümör hücrelerinin öldürülmesinde rol oynarlar. CD8+ T lenfositler MHC-sınıf-I molekülü ile bir arada bulunan antijenleri tanırlar. Konak hücre virüsle enfekte olduğunda virüs yüzeyindeki peptidleri belirleyip bu hücreleri MHC bağımlı olarak öldürürler.

T yardımcı hücreleri yüzeylerinde CD4 molekülü taşımakta ve kendilerine MHC sınıf 2 tarafından antijen sunulmaktadır. T sitotoksik hücreler ise yüzeylerinde CD8 molekülü taşıyıp MHC sınıf 1 tarafından sunulan antijenleri tanımaktadırlar. MHC sınıf 1 molekülleri tüm somatik hücrelerde bulunurlar, MHC sınıf 2' ler ise dendritik hücreler, aktive makrofajlar, karaciğer kuppfer hücreleri, mikroglialar, derideki langerhans hücreleri ve B lenfositler olmak üzere antijen sunan hücrelerde bulunurlar (12,21).

Hümmoral bağışıklığı oluşturan başlıca yapı ise B lenfositlerdir. B lenfosit kaynaklı plazma hücreleri tarafından oluşturulan antikorlar bu savunmanın temel yapı taşıdır. Antikorlar hücre içinde yerleşim gösteren mikroorganizmalara karşı savunma yapamazken, periferik dolaşımdaki yabancı yapılara bağlanarak onları etkisiz hale getirirler. Hücre içi savunma mekanizmaları hücrenel bağışıklık ile sağlanır. B lenfositlerin yüzeyinde bulunan belirleyicilerden CD19 ve CD20, B

lenfositlere özgü olup, bu hücrelerin tanımlanması ve işlevlerinde önemli rol oynarlar. Ayrıca, yüzeylerinde CD72, CD23, CD5, CD22, CD40, LFA-1, ICAM-1 moleküllerini taşımaktadırlar.

Humoral bağışıklık aynı antijenle bir kez daha karşılaşıldığında ilkinden daha abartılı ve daha kısa sürede oluşan bir dizi savunmayı başlatır. Buna ikincil bağışıklık yanıtı denmektedir (12,21).

2.5 İMPLANTASYON GEBELİK VE BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ

Tubal fimbria tarafından tutularak tubal kanal içinde yolculuğuna başlayan ovum tubal silier hücreler sayesinde yolculuğunu tamamlayıp ampullaya yerleşir. O sırada vajene ulaşan milyonlarca sperminden zona pellucidayı delerek döllenmeyi yapacak spermi bekler. Döllenme tamamlandıktan sonra oluşan zigot uterus kavitesine doğru ilerlemektedir. Bu arada zigot 2, 4, 8 ve 16 hücreye bölünür. Morula adını alan onaltı hücreli kitle fertilizasyonu takip eden 4. günde uterus kavitesine ulaşır. Onaltı hücreli kitle içinde bir kavite belirmeye başlar ki buna blastokist adı verilir. Blastokistteki hücre gruplarından iç kısımda olanlardan embriyo dokuları, dış kısımdan ise uterus duvarına invazyon gösterecek olan trofoblastlar gelişir. Blastokist uterus boşluğunda 3-4 gün boyunca serbestçe dolaşır. Bu sırada endometriyum sekresyonları tarafından beslenir. Blastokistin trofoblastik hücreleri desidüayı invaze eder. İmplantasyon 2/3 olguda üst uterus segmentinin arka duvarına, 1/3 olguda ise ön duvarında gerçekleşir (2).

İmplantasyon süreci embriyonun endometriyum epiteline yanaşması (apposition) ve tutunması (attachment), epitel katmanını geçerek, endometriyumun stromal matriksinde yayılım ve gelişimini sürdürmesi (invazyon) basamaklarını içermektedir. Yanaşma blastokist ile alıcı endometriyumunun karşı karşıya gelmesidir. Schlafke ve Enders tarafından tanımlanmıştır (22).

Hem endometriyumun epitel hücreleri hem de trofoblastlarda mikrovilluslar vardır ve bu villuslar birbirlerine uyacak şekilde temas ederler. Bunlara eklem oluşumları denir. Bu oluşumların formasyonundan sonra endometriyumda yıkama

yapılsa bile blastokist yerinden ayrılamaz. Fibronektin, hücreler ile hücre dışı matriks arasındaki tutunmada rol oynar. Hücreler üzerindeki reseptörlere kollajen gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin yapışmasına yardım eder. Ayrıca, fibronektin hücre göçünü düzenler, hücre farklılaşmasını sağlar.

İnvazyon aşamasında ise trofoblastlar epiteli geçtikten sonra desidualize olmuş endometriyumun bazal laminasına yapışır ve alttaki bağ dokusuna penetre olur. Bu mekanizma kanser metastazlarına benzer; metastaz dokuları üzerinde deneysel çalışma yapmak implantasyondan daha kolay olduğu için implantasyona ait bilgilerimizin çoğu kanser araştırmalarından kaynaklanmaktadır.

Blastokist ve bir miktar sıvı endometriyum kıvrımlardan birine yerleşir. Sıvının absorbe edilmesiyle endometriyum epitelyal hücreleri ve blastokist yakın temasa gelir, endometriyum blastokisti çevreleyerek bir implantasyon odası oluşur. Yine bu aşamada, trofoblast hücreleri dev hücreler haline gelir ve yapışıcı bir özellik kazanırlar. İmplantasyon, endokrin, parakrin, otokrin, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri sonucunda ortaya çıkan, çok sayıda molekülün fonksiyon gösterdiği karmaşık bir süreçtir. İmplantasyon sürecinde açıklanamayan infertiliteye ışık tutabilecek ve araştırılması gereken birçok bilinmeyen durum bulunmaktadır.

İmplantasyonun gerçekleşeceği ve endometriyumda hazırlıkların yapıldığı döneme implantasyon penceresi denmektedir. İmplantasyon penceresi her menstrüel siklusun midluteal dönemi denen siklusun 20-24. günlerini kapsar. Uterus stromal ve epitel hücreleri denen 2 ayrı hücre topluluğunu içerir.

İmplantasyon penceresindeki hücresel değişikliklerden birisi, fibroblast benzeri endometrial stromal hücrelerin daha büyük ve yuvarlak desidua hücrelerine dönüşümü ve luminal epitelde sekretuar bez yapıların büyümesi, yüzeysel çıkıntıların oluşması (pinopodlar) ve mikrovillusların görülmesidir (23,24).

Bu pencere dönemi boyunca endometrial pinopodlar steroid hormonlarının etkisi ile endositoz ve pinositoz yapması sayesinde blastokist implantasyonunu kolaylaştıracak yüzey oluşturmaktadır. Buna paralel olarak farklı büyüme faktörleri, kemokin ve adezyon moleküllerde çeşitli değişiklikler olur (24,25). Bu değişiklikler overin steroid hormonları, 17 beta-östradiol ve progesteron tarafından düzenlenir (23,26). İmplantasyon penceresinde blastokistin tutunma ve invazyonu ile ilgili

olarak gözlenen bu farklılıklar implantasyon gerçekleşmediği takdirde kısa süre sonunda ortadan kalkar (27).

Ayrıca microarray analizi çalışmaları implantasyon penceresindeki insan endometriyumunda implantasyon işaretlerinin çok sayıda gen tarafından kontrol edildiğini ortaya çıkarmıştır (28,29).

Ayrıca luminal glikokaliks yapımı ve negatif yüklü bir ortam sağlanması, endometriyumdaki müsin ve integrin yoğunluğu, trofinin ve tastin, kalsitonin, siklooksijenaz 2, hoxa geni, steroid hormonlarla, sitokinler implantasyona etki eden çok çeşitli endometriyum nedenleri arasındadır.

İmplantasyon anne bağışıklık sistemine yabancı semiallojenik bir embriyonun endometriuma tutunmasını ve invazyonunu gerektirdiği için buna karşı geliştirilen bağışıklık toleransı gebeliğin devamı için oldukça önemlidir (30).

Plasenta anne ve fetusa ait yapılardan meydana gelmekte ve anne fetus arasında yoğun alışverişe imkan vermektedir. Gebeliğin seyrine etki edebilecek pek çok olay plasental düzeyde oluşmakta ve plasentasyon aşamasındaki olumsuzluklar fetusu doğrudan etkilemektedir. Gebelikte fetomaternal bağışıklık toleransı, lenfositlere fetal antijen sunumunun olmaması veya maternal lenfosit işlevlerinin baskılanmış olmasından kaynaklanabilir. Gebelikte kazanılmış bağışıklık sisteminin genel olarak baskılanmış olduğu bilinse de bu baskılanma süreci artmış maternal doğal bağışıklık yanıtı ile dengelenmektedir. Gebelerde CD4 T lenfosit sayılarının azaldığı CD8 T sitotoksik hücre sayılarının arttığı ve B hücre bağışıklığının değişmediği bildirilmiştir (31,32). Gebelikte makrofajların, granülositlerin sayı ve işlevleri artmışken, doğal öldürücü hücrelerin sayısı sitotoksik kapasiteleri ve IFN γ sentezleri azalmıştır. Kompleman sistem faaliyetleri de gebelik boyunca artmıştır.

Gebeliğin oluşması ve güvenle devam edebilmesi aslında fetopaternal antijenlere karşı immun yanıtı değil tam tersine bir immun tepkinin sonucudur. Anne ve babanın MHC benzerliği ne kadar fazlaysa implantasyon şansının o kadar azalması bu durumu açıklayabilmektedir (33).

Plasental trofoblastlar embriyoyu desidüaya bağlamakta ve embriyonun gelişimini sağlamaktadırlar. Trofoblastlar iç sitotrofoblast ve dış sinsityotrofoblast tabakalarından oluşur. Trofoblastlar klasik MHC moleküllerini eksprese etmezler.

Bundan dolayı T hücrelerine antijen sunamazlar. Maternal T hücrelerden korunmanın bir nedeni bu mekanizma olabilir.

Trofoblastlar sadece klasik olmayan MHC moleküllerinden HLA-G eksprese ederler. HLA-G özellikle ilk trimesterde yüksek düzeydeyken gebelik ilerledikçe miktarı azalır. Desiduada doğal öldürücü hücrelerde bulunan KIR (killer inhibitör reseptör) reseptörleri ve CD94/NK62 reseptörleri trofoblastlardaki HLA-G yi tanırlar. Bu şekilde doğal öldürücü hücreleri trofoblastların HLA-G molekülü sayesinde etkisiz hale gelmektedirler. Aslında doğal öldürücü hücreleri MHC sınıf 1 buldurmuyan bütün hücreleri yabancı olarak algılayıp onları yok ederler. Ancak, trofoblastlardaki HLA-G molekülü sayesinde doğal öldürücü hücrelerinin bu fonksiyonlarının baskılandığı düşünülmektedir (34,35,36).

Uteroplasental yatakta bulunan steroid hormonlarının T yardımcı 2 hücre gelişimini artırdığı, lenfosit proliferasyonunu, doğal öldürücü hücre uyarılmasını ve TNF α yapımını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, yine bu hormonların B hücre fonksiyonlarını, T hücrelerinin antikor bağımlı hücre sel sitotoksitelerini ve graft rejeksiyonunu baskıladıkları gösterilmiştir (37). Maternal dolaşımda fetusa ait hücreler bulunmasına rağmen reaksiyon oluşmamasının nedenlerinden biri progesteron hormonudur (38).

Lenfositlerde yüksek miktarda progesteron reseptörü bulunmaktadır. Progesteronun lenfositlere bağlanması progesteron tarafından uyarılan blokan faktörlerin (PIBF) salınmasına sebep olmaktadır. PIBF doğal öldürücü hücre aktivitelerini baskılamaktadır. Bu olay başıklık toleransında progesteronun önemli bir yeri olduğunu göstermektedir (39,40).

Uterus doğal öldürücü hücreleri menstrüel döngünün proliferatif fazında nispeten düşük seviyede yken implantasyon penceresindeki endometriyumda ve gebelik desiduasında miktarları artmaktadır (41,42).

Bu yükselme asıl olarak uterus doğal öldürücü olarak adlandırılan CD56CD16 natural killer gurubunda olmaktadır. Uterus doğal öldürücü hücrelerinin yapı ve fonksiyonları diğer doğal öldürücü hücrelerden farklıdır (43,44,45,46,47).

Uterus doğal öldürücü hücrelerinin desiduada çoğalması dolaşımdan desiduya gelmeleri ve desidual stromal hücrelerce sentezlenen sitokinler sayesinde desiduada varolanların çoğalmaları sonucudur (48,49).

Uterus doğal öldürücü hücrelerinin implantasyon ve plasentasyona etki ettikleri düşünülmektedir (50,51).

Ayrıca, bu hücreler çeşitli sitokin üretiminde de görev alırlar. Uterus doğal öldürücü hücreleri Granulosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), Granulosit-monosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), Lösemi inhibitör faktör (LIF) salgırlar. Literatürde LIF salgısının implantasyonu stimüle ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (52,53,54,55).

Dendritik hücreler, doğuştan ve edinilmiş bağışıklık sistemlerinin cevabını başlatabilen ve uyumunlarını denetleyen heterojen hücrelerden oluşmaktadır. Dendritik hücrelerin sorumluluk alanı sadece birincil immun yanıtta ibaret değildir. Ayrıca, bağışıklık toleransında da önemli rolleri olan hücrelerdir (56). Bu hücrelerin işlevleri ve farklılaşma dereceleri mikro çevrelerindeki kemokin ve sitokinlerle düzenlenir (57).

Literatürdeki çalışmalar gebe ve gebe olmayan insan uterusunda dendritik hücrelerin bulunabildiğini göstermektedir (58). Dendritik hücreler implantasyon döneminde birikmeye başlayıp gebeliğin sonuna kadar desiduada bulunmaya devam ederler (58,59).

Ancak uterus dendritik hücrelerinin anatomik yerleşimi, fenotipi ve en önemlisi de gebelik ve implantasyon üzerindeki etkileri açısından hala sınırlı miktarda bilgi mevcuttur.

2.6 DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRELER

Son dönemlerde yapılan araştırmalar embriyo implantasyonu üzerine uterus ortamının etkisini inceleme üzerinde yoğunlaşmıştır. Uterus ortamı içinde bağışıklık sisteminin en önemli ve dinamik komponenti de doğal öldürücü hücrelerdir.

Uterus doğal öldürücü hücreleri dolaşımdaki doğal öldürücü hücrelerden yapı ve fonksiyon olarak farklılık gösterirler. Periferik doğal öldürücü hücreleri dolaşımdaki lökositlerin %10-15' ini oluştururlar. Doğal öldürücü hücrelerinin yüzey antijenleri CD56 ve CD16' dır. Doğal öldürücü hücreleri yüzey CD56 ekspresyonuna

göre ikiye ayrılırlar. Periferik kan doğal öldürücü hücrelerinin %90 lık bir kısmı CD56mat 'tır ve yüksek oranda CD16 eksprese ederler. %10'luk kısmı ise CD56parlak'tır ve düşük oranda CD16 eksprese ederler (60). CD56mat hücrelerin sitotoksik etkinliği fazlayken CD56parlak doğal öldürücü hücreler daha çok sitokin üretiminde görevlidir (60).

Periferik doğal öldürücü hücrelerinin hormonlarla düzenlenmesine bakacak olursak; kandaki sayılarında menstrüel siklusun folliküler ve luteal fazları arasında anlamlı değişiklikler yoktur (61). Bunun yanında normal gebelik sırasında periferik doğal öldürücü hücreleri başta CD16pozitifCD56mat olanlar olmak üzere sayıca azalır (62).

Gebelik süresince doğal öldürücü hücrelerinin sayısında, fenotipinde ve aktivitesindeki değişiklikler hormonal kontrolü düşündürür. Bu hormonlar östrojen, progesteron ve prolaktindir. Östrojen doğal öldürücü hücre çoğalmasını ve etkinliğini artırıyor gibi görünmektedir (63). Progesteron ile periferik doğal öldürücü hücre etkinliğinde doza bağımlı bir azalma mevcuttur (64). Prolaktin ise fizyolojik konsantrasyonda periferik doğal öldürücü hücre çoğalmasını uyarır (65).

Gebelikte periferik kan doğal öldürücü hücreleri sayı olarak düşer. Bu düşüş CD16+ alt grubundaki düşüş nedeniyledir (62,66). Ek olarak gebe kadındaki periferik kan doğal öldürücü hücreleri düşük litik aktivite gösterirler (67). Ayrıca gebeliğin ilk haftalarında T hücreleri ve doğal öldürücü hücrelerinde artmış inhibitör reseptör ekspresyonu (çesitli KIR ve CD94/NKG2A) görülür. Gebeliğin üçüncü ayında maksimuma çıkar ve gebeliğin sonuna kadar aşamalı olarak bazal seviyelere döner (68).

Gebelik olmazsa uterus doğal öldürücü hücreleri apoptozise benzeyen nükleer değişiklikler gösterirler (69). Bu nedenle bu hücrelerinin ölümünün mensteki endometriyum dökülmesinin erken safhasında rol aldığı ileri sürülmüştür.

Gebelikte implantasyon alanını yakınlarında olan ve ekstrasvillöz trofoblastla yakın temasta bulunan doğal öldürücü hücrelerin erken gebelikte sayılarının artması ve hormonal düzenlemesinin olması ayrıca infiltre olan trofoblastlara yakın komsuluğu fetal allografta maternal bağışıklık cevabın düzenlenmesinde ve trofoblast invazyonunda önemli rol oynadıklarını düşündürmektedir.

2.7 DENDRİTİK HÜCRELER

Dendritik hücreler (DH) immün cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynayan beyin, testis ve göz haricinde tüm dokularda bulunan antijen sunan hücrelerdir. Dendritik hücrelerin öncelikli fonksiyonu antijen sunmak olduğundan bu hücrelere profesyonel antijen sunan hücreler de denilmekte ve özellikle henüz farklılaşmamış T lenfositleri uyararak birincil bağışıklık yanıtının oluşmasına yol açmaktadırlar.

Bu fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için antijeni yakalama, işleme tabi tutma ve uygun eş uyarıcı moleküllerle hücre yüzeyinde sunma yeteneğine sahiptirler. Aynı zamanda dendritik hücreler B hücre işlevlerinin oluşumunda etkili olduklarından humoral bağışıklığın gelişiminde de önemli rol oynamaktadırlar.

Dendritik hücreler ilk olarak 1868 yılında Langerhans tarafından cilt epitelinde gözlemlenmiştir. Takiben 1973 yılında Ralph Steinman tarafından dalakta dendritik şekilli hücre grubu olarak tanımlanmışlardır. Bu tespitten kısa bir süre sonra da bu hücrelerin sadece dalakta değil birçok lenfoid ve lenfoid olmayan dokuda buldukları saptanmıştır.

Dendritik hücreleri sadece morfolojik görünümüleriyle tanımlamak yeterli olmayıp, yapısal görünümünün yanında yüzeylerindeki çeşitli moleküllerin varlığının veya yokluğunun ve işlevsel yeteneklerinin tanımlanması gerekmektedir. Dendritik hücrelerin ana yapısal görünümü hücre yüzeyinden dışarı doğru çok miktarda hücre zarı uzantılarının varlığıdır. Ancak, bunun yanında antijeni işleme tabi tutma fonksiyonlarını yapabilmek için endosom, lisosom ve epidermisteki langerhans hücrelerinin Birbeck granülleri gibi bol miktarda intrasellüler yapılar da mevcuttur. Dendritik hücrelerin saptanmasındaki başlıca zorluk henüz dendritik hücreyi özgün olarak tanımlayan hücre yüzey belirleyicisinin tespit edilememiş olmasıdır. Bundan dolayı da dendritik hücreyi tanımlamak için çeşitli yüzey belirleyicilerinin varlığı veya yokluğunun birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.

- 1- CD3 (T lenfosit), CD14 (monosit), CD19 (B lenfosit), CD56 (doğal öldürücü hücre), CD66b (granülosit) gibi çeşitli spesifik yüzey belirleyicilerinin yokluğunda, bol miktarda MHC sınıf I-II, CD1a gibi antijen sunan moleküllerin varlığı

- 2- CD11a (LFA-1), CD11c, CD50 (ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2) ve CD58 (LFA-3)'yi içeren adezyon moleküllerinin varlığı
- 3- Eş uyarıcı moleküllerden aktivasyon belirleyici olarak CD40, CD80, CD83 ve CD86 ekspresyonu
- 4- Reseptör aracılı antijen alımı için Fc reseptörleri CD32, CD64 ve bağışıklık yapısı endositosisi için C3bi kompleman reseptörleri CD11b gibi reseptörleri içerirler.

Aynı zamanda, bakteri karbonhidratlarına bağlanan DEC-205 ve makrofaj mannoz reseptörleri gibi C-tip lektin reseptörleride mevcuttur.

Bu konuya basit bir özet yapıldığında, özgün yüzey belirleyicileri (CD3, CD14, CD19, CD56, CD66b) negatifliğiyle birlikte, HLA-DR, CD 80 veya CD83 pozitifliği matür DH için, HLA-DR, CD86 pozitifliğinin ise immatür dendritik hücreleri tanımlamakta kullanılan temel yüzey molekülleri olduğu görülmektedir.

DH'ler ilk olarak hematopoetik kök hücrelerden kaynaklanır ve takiben kemik iliğinde miyeloid ve lenfoid seriden köken alan farklı iki tipte DH oluşmaktadır. Bu farklılaşmayı sağlayan ana sitokinin ise Flt-3L olduğu saptanmıştır. İki DH hücre arasındaki en belirgin fark ise lenfoid DH'lerde CD8 α yüzey belirleyicisi mevcutken miyeloid DH'lerde bu belirleyici yoktur. Periferik dokuda DH immatür karakterde iken matür formları timus ve ikincil lenfoid organlarda bulunur.

Miyeloid DH' ler başlıca iki tiptir:

- 1- Epitelyal yüzeylerde langerhans hücreleri
- 2- Cildin dermisinde veya solid organların interstisyumunda dermal veya interstisyel DH

Langerhans hücreleri antijenik uyarı aldığı anda lenfoid yapılarda T hücrelerinden zengin parafoliküler alanlara gider ve burada interdigital DH olarak adlandırılır. İnterstisyel veya dermal DH ise germinal merkeze göç ederler ve orada germinal merkez DH olarak adlandırılırlar. İnsanda miyeloid DH'lerin klasik DH olduğu düşünülmektedir. Bu hücreler CD34+ myeloid kök hücreden ve monositlerden başlıca GM-CSF, IL-4 ve TNF- α varlığında oluşmaktadır. Oluşan DH matür hale geldiğinde interstisyel DH olarak bilinir. Bu hücrelerde başlangıçta CD14+, DR+, CD1a+ iken matür hale gelince CD14 negatifleşirken DR ekspresyonu artar ve

CD11c ile CD83 pozitifleşir. Bu hücrelerin henüz farklılaşmamış CD4 ve CD8 T lenfositleri aktive etme yetenekleri olduğu gibi, aynı zamanda B lenfositleri de antikor sekrete eden plazma hücrelerine doğru farklılaşabilmektedirler. Monositlerden köken alan CD11c+ DH'ler özellikle IL-12 varlığında T yardımcı 1 yanıtına neden olduğu gözlenir.

İnterstisyel DH'ler lenfoid folliküllere göç edip orada folliküler DH'leri oluşturmaktadırlar. CD14 negatif olan CD34+ myeloid kök hücreler GM-CSF, TNF α ve TGF- β 'nin varlığında Langerhans DH olarak adlandırılan DH'ye dönebilmektedir.

Bu hücrelerde CD14- iken DR+, CD1a+ ve langerin+ olup maturasyonla birlikte CD83+ gözlenir. Langerhans DH ise farklılaşmamış T lenfositleri aktive ederken, B lenfositlere karşı etkisizdir. Langerhans DH'ler antijeni yakalayıp lenfoid dokuya gider ve orada antijeni T lenfositlere sunarlar. Lenfoid DH'ler ise CD34+ hücrelerden köken alıp lenfoid hücre yapısına yönelen ve IL-3, CD40L ile oluşumu gerçekleştiren CD11c-, CD1a-, CD8/ CD4 ve CD83+ hücrelerdir. Bunlar plasmasitoid DH olarak da adlandırılırlar ve lenfoid dokulardaki T lenfosit bölgesinde bulunup IFN- α salgırlar. CD 123+ olan bu hücreler ise T yardımcı 2 bağışıklık yanıtına yol açarlar (70).

2.7.1 MATÜR VE İMMATÜR DENDRİTİK HÜCRELERİN ÖZELLİKLERİ

Periferde bulunan DH'ler immatür karakterde olup antijenle karşılaşp antijeni yakalayınca bağışıklık yanıtı başlatmak için lenfoid organlara göç ederler. Bu işlem yaklaşık 48 saat içinde gerçekleşmekte ve bu zaman sürecinde DH'lerde bir takım morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler gözlenmektedir. Bunun sonucunda matür DH denilen, bağışıklık yanıtın oluşmasını sağlayan aktif hücreler oluşmaktadır. İmmatür DH antijeni yakalar, maturasyon sürecinde dokudan drene olduğu lenf noduna gelir, burada matür DH'ye döner ve henüz farklılaşmamış T lenfositleri uyarır. Kemokinler bu olayda önemli rol oynarlar. İmmatür DH'ler CC ve CXC kemokinlerce (MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-5, MCP-3,4, RANTES, TECK

ve SDF-1) uyarılırlar. DH matür hale geldiğinde birçok inflamatuvar kemokine cevabını kaybeder. CCR7 reseptörlerindeki upregülasyona bağlı olarak MIP-3 β (ECL) ve 6CKine (SCL) cevabı oluşur. Bu reseptörleri etkileyen kemokinler (6CKine ve MIP-3 β) öncelikle lenf nodunun T hücreden zengin parafoliküler alanlarında üretilir. Matür ve immatür DH'lerin yapısal ve işlevsel olarak farklı özelliklere sahip olduğu saptanmıştır.

2.7.2 DENDRİTİK HÜCRELERİN İŞLEVLERİ

DH'nin işlevleri başlıca 3 grupta toplanır:

- 1- Antijen sunumu ve T lenfosit uyarılması
- 2- Bağışıklık toleransının oluşumu ve devamı
- 3- Özellikle folliküler DH'de olmak üzere B lenfositler üzerinden humoral (bellek) bağışıklığın oluşturulması.

Antijen Sunumu ve T Lenfosit Aktivasyonu

DH'ler CD4+ ve CD8+ T lenfositleri aktive etmek için antijeni yakalar, onları işleme tabi tutup T lenfositlere sunarlar. İmmatür DH'ler kemik iliğinde yapıлып tüm vücuda dağılırlar. Bu esnada DH'ler henüz herhangi bir patojen veya yabancı bir yapıyla karşılaşmadığından immatür halde vücutta hazır olarak beklemektedirler. İmmatür halde dolaşımda bulunan DH'ler monosit'lerden farklı fenotip, morfolojik ve fonksiyonel özelliklere sahiptirler. Antijenik uyarı geldiğinde lenfoid yapıda olmayan dokulara yönelirler. Bu işlevi gerçekleştirebilmek için adezyon molekülleri ve kemoatraktanlar yoluyla vasküler endotelyum ve hücre dışı ortamla etkileşimleri gerekmektedir. Aynı zamanda immatür DH'ler yabancı antijenleri daha kolay yakalamak için organların yüzeyine yerleşmiş olarak bulunurlar.

E.Coli, C. Albicans, mycobakteriler gibi bakterilerin hücre duvarında bulunan lipopolisakaritleri Toll like reseptörler (TLR) 2 ve 4'ü etkileyerek DH'yi aktive

ederler. Enfeksiyon veya doku hasarı sonucu ölü veya hasarlı hücrelerden salınan faktörler DH'yi aktive ederler.

Ayrıca, apoptotik tümör hücreleriyle karşılaşan DH'ler maturasyona giderler. Bu maturasyonda otokrin veya parakrin tarzda IL-1 β ve TNF- α etkilidir ve CD36, $\alpha\beta$ 5 integrin ile oluştuğu belirtilmektedir. Sonuç olarak, vücut içi LPS, dsRNA, apoptotik hücre, bağışıklık yapıları, CpG DNA, TNF- α ve prostaglandin E2 gibi eksojen uyarılarla DH maturasyonunun geliştiği gözlenmektedir. Periferde bulunan DH'ler fagositoz, makropinositoz ve reseptör aracılı endositoz ile antijenleri alırlar. Makropinositoz yoluyla alınan hücre dışı sıvı su kanallarının bir üyesi olan akuaporinler aracılığıyla konsantre hale getirilir. DH'deki en bol antijen reseptörü glikosile antijenleri tanıyan c-tip lektin ailesinden olanlardır. Ayrıca immün kompleksleri almak için Fc reseptörleri ve gp96, hsp70 gibi ısı şok proteinlerini için özgün reseptörler de içerirler.

Gerek makropinositoz gerekse reseptör aracılı endositoz ile oldukça düşük konsantrasyonda antijen alımı gerçekleşebilmektedir. Bunun yanında DH maturasyonundan sonra birçok reseptör azalırken, reseptör aracılı endositosizde azalma olmadığı gözlenmiştir. Maturasyon safhasında DH periferik dokudan sekonder lenfoid yapılara doğru harekete başlar ve orada T hücreleri uyaran matür DH'lere dönüşür. Maturasyon sürecinde MHC molekülleri endositik kompartmandan hücre yüzeyine doğru çıkmaya başlarlar; antijenlerin ve patojenlerin hücre içine alımında selektif bir azalma ve T hücreleri için hücre yüzeyindeki eş uyarıcı moleküllerde bir artış izlenir. Antijen veya yabancı cisim yakalandığında ya eksojen ve endosomal yolla ya da endojen ve proteosomal yolla işleme tabi tutulurlar.

Bu işlemlerin nasıl gerçekleştiğine baktığımızda:

- 1- DH'ler diğer antijen sunan hücreler gibi eksojen ve ekstrasellüler antijenleri fagositoz veya reseptör aracılı endositoz yolu ile içine aldıktan sonra bu antijenleri endozomlar içinde parçalarlar. Takiben yeni sentezlenen MHC sınıf II molekülleri ile membranda eksprese ederek CD4+ T lenfositlere sunarlar.
- 2- Antijen sunan hücreler endojen ve intrasellüler antijenleri kendi sitozollerinde parçaladıktan sonra yeni sentezledikleri MHC sınıf I molekülleri ile hücre membranından CD8+ T lenfositlere sunarlar,

DH'ler bu hücrelerden farklı olarak eksojen ve ekstrasellüler antijenleride bu yolla CD8+ T lenfositlere sunabilmektedirler. Bu da eksojen ve ekstrasellüler antijenlere karşı direkt CD8 sitotoksik yanıtı neden olmaktadır. Dolayısıyla DH'lerin bu fonksiyonu, eksojen antijenlere karşı klasik antijen sunumundan farklı olarak CD4+ T lenfosit yardımı olmaksızın direkt CD8+ T lenfosit uyarımı yapabildiği anlamına gelmektedir. Bir tane DH fazla miktarda eş uyarıcı moleküller taşıdığından 100-3000 kadar T lenfosit uyarabilir, bundan dolayı diğer antijen sunan hücrelere göre 100 kat daha fazla antijen sunumu sağlayabilmektedir.

DH'lerin yüzeylerinde bulunan CD58 (LFA-3), CD54 (ICAM-1), CD50 (ICAM-3), CD102 (ICAM-2), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) gibi adezyon ve eş uyarıcı moleküller ile T lenfositlerde bulunan CD2 ve CD28 gibi moleküller ilişkiye girerek birincil bağışıklık yanıtının başlaması için gerekli ikincil sinyalleri oluştururlar. DH'ler aynı zamanda interferon-alfa, IL-1, IL-6, IL-7, IL-12 ve IL-15 salgılayarak birincil bağışıklık cevabına etkili olmaktadır. Monositlerden gelişen DH'lerin IL-12 ile T yardımcı 1 ve IL-10 ile T yardımcı 2 sitokin yanıtı oluşturduğu gözlenmiştir. IL-12 INF- γ salgısını artırıp T lenfositleri T yardımcı 1 fenotipine yönlendirerek T ve doğal öldürücü lenfositlerin sitotoksik etkilerini artırır. IL-12 üretiminin tümörlerden salınan çeşitli maddelerle, PGE2, IL-10, INF- α , nitrik oksit, TGF- β gibi sitokinlerle baskılandığı görülmektedir. IL-10 ise eş uyarıcı moleküllerin ekspresyonunu azaltıp IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α ve GM-CSF gibi enflamatuar sitokinleri baskılayarak T yardımcı yanıtı T yardımcı 2'ye yönlendirmekte böylece DH maturasyonunu baskılamaktadır (71).

Bağışıklık Toleransının Oluşumu ve Devamı

Özgün bir antijene karşı bağışıklık sistemin yanıt oluşturamamasına tolerans denilmektedir.

Santral tolerans T lenfositlerde timusta, B lenfositlerde ise kemik iliğinde oluşmaktadır. T lenfositlerinde santral toleransı oluşturan birincil mekanizma T hücre ölümünün gerçekleşmesidir. Matür DH'ler timusta bol miktarda bulunup,

burada yeni üretilmiş T lenfositleri işlevsel CD8+ ve CD4+ hücreler olarak eğitirken aynı zamanda kendi vücuduna karşı geliştirebilecekleri bağışıklığı engellemek için onları seçilime tabi tutarlar. Dolayısıyla da kendi antijenlerine karşı düşük ilgiye sahip T lenfositleri seçip, perifere çıkmasına ve yaşamasına olanak sağlarlar. DH'nin taşıdığı proteinlerle (self antijen) etkileşime giren T lenfositler timusta negatif seçimle ortadan kaldırılır. Bu işlemlerin sonunda MHC peptitlerini çok iyi tanıyan ancak kendi antijenlere duyarısız T lenfositler oluşmaktadır. Bu negatif seçim işlemi timusta mevcut olan epitelyal hücreler rol oynamaktadır.

T lenfositlerindeki periferik tolerans T lenfosit ölümü, enerji ve düzenleyici T lenfositlerin supresyonuyla gerçekleşir. T yardımcı 2 tipi DH IL-10 üreterek T lenfositlerde apoptosis'e yol açarken aynı zamanda bu sitokin düzenleyici T yardımcı 2-T yardımcı 3 T lenfositlerin oluşumunda neden olmaktadır. Ayrıca, DH'ler T lenfositlerde enerjiye yol açarak da toleransı etkilerler. Periferik toleransta eş uyarıcı molekülleri eksik olan immatür karakterdeki DH'ler etkili olmaktadır.

B Lenfosit Uyarımı

DH'ler lenf nodunun T lenfosit alanlarında ve germinal merkezde B lenfositlerin uyarımını sağlayabilirler. DH'ler B lenfositlerin uyarılmasını ve farklılaşmasında önemli rol oynayan çeşitli sitokin ve faktörler salgılayabilmektedirler. Lenf nodunun germinal merkezinde bulunan folliküler DH'ler B lenfositlerin belleğinin gelişiminde önemli rol oynarlar. Folliküler DH'ler yabancı cisme karşı başlangıç antikor cevapta etkili olmayıp, antikor cevabı geliştikten sonra çok sayıda antijen antikor yapıları oluşturmaktadırlar. Folliküler DH'lerin antikorlar için depo ve B lenfosit uyarımının devamını sağlayan kaynak olarak görev yaptığına inanılır. Bu B lenfositler antijeni folliküler DH'den alıp T lenfositlere sunabilirler. Folliküler DH'lerdeki antijen antikor kompleks deposunun aylar hatta yıllarca sürebilen uzun bir süreçte tüketilebileceği sanılmaktadır (72).

2.8 HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİ

Organizmayı oluşturan hücrelerin çevresinde çözünebilir moleküllerden oluşan karmaşık bir karışım, diğer hücreler ve çözünebilir olmayan doku matriksi yer alır. Hücrenin bulunduğu bu çevreyi oluşturan ekstraselüler sıvının bileşimi, diğer hücrelerin davranışları, şekilleri ve kimyasal yapıları sürekli değişir.

Doku ve hücrelerin bütünlüğünün ve fonksiyonunun korunabilmesi için hücrenin çevresindeki değişimleri algılaması ve uygun cevaplar vermesi gerekir. Hücre bunu, yüzeyinde eksprese edilen hücre adezyon molekülleri aracılığı ile gerçekleştirir. Adezyon moleküllerinin birbirleri ile veya ekstraselüler sıvıdaki moleküllerle etkileşimleri hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks bağlantısını sağlar. Adezyon molekülleri ilk olarak enflamasyon bölgesinde lökositlerin kandan dokuya geçişi ve embriyogenezde hücre göçü gibi birbirinden farklı görünen ancak, temelde aynı mekanizmalara dayalı iki ayrı alanda yapılan çalışmalarla araştırılmaya başlanmıştır (73).

Hücre adezyon molekülleri hücre aktivasyonu, göçü, büyümesi, farklılaşması ve ölümü gibi birçok olayın düzenlenmesinde yer alırlar (74). Bu durum adezyon moleküllerinin, farklı sitokin ve büyüme faktörlerinin de etkisiyle sinyal iletilme ve sinyal mekanizmalarını düzenleyebilme özelliğine bağlıdır (75).

Hücre adezyonu lenfositlerin belli bölgelerde tutulması (homing) ve tekrar dolaşıma salınmaları, bağışıklık cevabı, kanın pıhtılaşması gibi fizyolojik; enflamatuvar, neoplastik ve vasküler/ trombotik hastalıklar gibi pek çok patolojik olayın temelini oluşturur (76,77).

Son zamanlarda adezyon moleküllerinin yapı ve fonksiyonlarına yönelik yapılan çalışmalarda bu moleküllerin ekspresyonu veya aktivitelerinin farmakolojik ajanlarla değiştirilebildiği gözlenmiştir. Bu durum enflamasyon ve otoimmün hastalıkların tedavisinde adezyon moleküllerini temel alan alternatif stratejilerin geliştirilmesine yönelik çalışmaları artırmıştır (78,79,80). Ayrıca patojen mikroorganizmalardan *Leishmania* türleri, *Plasmodium Falciparum*, *Histoplasma capsulatum*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Adenovirus*, *Coxsackie virus*, *Human Immunodeficiency Virus-1*, *Cytomegalo virus*

adezyon moleküllerini kullanarak hücreye tutunmakta, bazıları ise bu yolla hücre içine girmektedirler (81).

Adezyon moleküllerine tutunarak hücre içine alınan intraselüler patojenler normal endositozdan farklı bir yol kullanıldığı için lizozomal kompleks oluşumundan kurtulurlar. Böylece hücre içinde canlı kalarak çoğalır ve enfeksiyon oluşturabilirler. Hücre içine bu yolla 100 nm' den 2 µm' ye kadar değişen boyutlarda yapılar alınabilir. Bu özellikler ve bazı adezyon molekülü alt gruplarının tek tip hücreler tarafından eksprese ediliyor olması adezyon moleküllerinin gen transferinde ve belli hedeflere ilaç salınımında, kanser tedavisinde özgül reseptörler olarak kullanılacakları fikrini doğurmuştur (82,83).

2.8.1 HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİNİN YAPI VE İŞLEVLERİ

Adezyon molekülleri üç karakteristik özellik taşır:

- 1- Transmembran glukoproteinlerdir. Hücre içini dış ortama bağlarlar. En büyük olan ekstraselüler kısım, membranöz kısım ve hücre içine doğru ilerleyen sitoplazmik işlevsel kısımdan oluşurlar.
- 2- Dışarıdan gelen bir uyarının (bu bir hücre veya matrikse bağlı bir molekül olabilir) ekstraselüler kısımda üç boyutlu şekil değişimine yol açması ile uyarılırlar. Hücre adezyon molekülüne bağlanan molekül, adezyon molekülünün ligandı olarak isimlendirilir, özgül olması şarttır.
- 3- Hücre içinde bağlı buldukları diğer moleküller sayesinde hücre işlevini etkileyebilirler. Bazıları hücre iskeleti ile bazıları da hücresel enzimlerle bağlantılıdır. Reseptör ligand birleşmesi hücrede yapısal veya kimyasal bir değişime yol açar. Yapısal benzerliklerine dayanılarak hücre adezyon molekülleri farklı aileler halinde gruplandırılır:
 - a- Selektinler
 - b- İntegrinler
 - c- İmmünglobülin benzeri süper aile
 - d- Kaderinler

Adezyon moleküllerinin çoğu hücre-hücre adezyonunda, integrinler ise aynı zamanda hücre matriks etkileşiminde yer alır. Ligand, hücre adezyon molekülü ile aynı gruptan ise homofilik ligand (kaderinlerin ligandları yine kaderinlerdir) farklı adezyon molekülü grubundan ise heterofilik ligand olarak isimlendirilir (selektinler immünglobülin süper ailesi ile bağlantı kurarlar dolayısıyla birbirlerinin heterofilik ligandıdır). Bazen hücre adezyon molekülü olmayan bir molekül ligand olabilir (integrinlerin bir kısmı matriksteki kısa peptid zincirlerine bağlanırlar) (73).

Selektinler

Lökosit-lökosit ve lökosit-endotel hücre ilişkisinde yer alırlar. Bu moleküller ekstraselüler kısımlarında; kalsiyuma bağımlı lektin benzeri karbonhidrat bağlayan bir bölge, epidermal büyüme faktörü (EGF) ile benzerlik gösteren bir kısım, 2-9 adet kompleman düzenleyici protein tekrarları içerir. Ayrıca bir hücre zarı kısmı ve 17-35 aminoasitlik sinyal iletiminden sorumlu sitoplazmik bölgeden oluşur (75,84). Selektinler özgün karbonhidrat yapıdaki moleküllerle bağlanırlar. Farklı moleküller, taşıdıkları siyalillenmemiş ve siyalillenmiş Lewis_x (sLe_x) ve onun izomeri Lewis_a (sLe_a) karbonhidratı aracılığıyla selektinlerle iletişim kurar (84,85).

Selektinler temel olarak enflamatuvar olaylar sırasında endotel hücrelere lökositlerin ve trombositlerin tutulmalarında rol alırlar. Lökosit yüzeyindeki ligandları ile etkileşimleri lökosit integrinleri olarak bilinen β_2 integrinlerin aktivasyonunu sağlar. Selektinlerin hücre iskeleti ile olan bağlantıları hakkında veriler oldukça azdır. L-selektin'in hücre içinde α -aktinin ile bağlantısı tanımlanmıştır. Ancak, başka proteinlerle etkileşiminin de olabileceği düşünülmektedir (75).

Selektinler üç ana gruptan oluşur:

L- Selektin: Granülosit, lenfosit ve monositlerde bulunur. L- selektin, lökositlerin adezyonda rol alan kısımları olan mikrovilluslarında yoğun olarak bulunur. Lökosit damar dışına göçü ve hücre uyarılması sırasında membran yüzeyinde sunulur (86,87,88). Kompleman komponenti C5a ve lökotrien B₄ (LTB₄) gibi kemotaktik faktörlerle ekspresyonu artar. Farklı nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar ve kriptokokal polisakkarit glukuronoksilomannan yapısı L- selektin yapımını azaltarak enflamasyonu baskılar (89,90).

L- selektin lenf nodu venüllerine lenfosit bağlanmasını sağlayarak lenfoid dokulara lenfosit giriş çıkışını düzenler. Lenf nodu endotel yüzeyinde yer alan glukoprotein yapısındaki CD34, glukolizasyona bağımlı hücre adezyon molekülü (GlyCAM-1) ve mukozal endotelde yer alan mukozal adesin hücre adezyon molekülü (MAdCAM-1) L- selektin ligandlarıdır. Müsin benzeri bu ligandlar vasküler adesinler olarak isimlendirilirler. Bu bağlantılar lökositlerin lenf nodları, Peyer plakları gibi belli bölgelerde tutulmasını (homing) sağlar (91)

E- Selektin: Aktive endotel hücrelerde eksprese edilir. E- selektin yapımı tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin- 1 (IL- 1) ve lipopolisakkarit ile uyarılır. Uyarılmadan yaklaşık iki saat sonra de novo protein sentezi ile E-selektin oluşumu görülür (80). Enflamasyonda gözlenen lökositlerin endotele adezyonu ve yuvarlanmasında (rolling) birincil rolü E- selektin oynar. Bu nedenle lökosit yüzeyindeki L- selektin en önemli ligandıdır. Bir diğer E- selektin ligandı E selektin ligandı- 1 (ESL 1) olup miyeloid hücreler tarafından eksprese edilir (86).

P-Selektin: Trombositlerde α granüllerde, endotel hücrelerde ise Wiebel-Palade cisimciklerinde bulunur. Sürekli eksprese edilmezler. TNF, histamin, trombin, kompleman, oksijen radikalleri ve lökotrienlerin varlığında trombosit ve aktive endotel hücre yüzeyine hızla dağılırlar. Uyarılmadan 20 dk sonra ekspresyon maksimal düzeye ulaşır. Sonrasında hızlı internalizasyonla tekrar stoklara gönderilir. Lökositlerin, trombositler ve endotel hücre ile etkileşimini sağlayarak enflamasyon ve trombogenezde rol oynar (80).

Uzamış doku hasarında makrofaj göçünden de sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca, aktive endotel hücre yüzeyinde lökosit yuvarlanmasında yardımcı moleküldür. Nitrik oksid (NO) ve bradikinin P-selektin ekspresyonunu azaltır. Enflamatuvar barsak hastalığı olan kişilerde hasarlı bölgede normal dokuya oranla artmış P- selektin miktarı tespit edilmiştir (86).

P- selektin ligandı olan P- selektin glukoprotein ligand 1(PSGL- 1), sLex ve siyalik asit gibi P selektinle bağlanabilecek kısımları içerir. PSGL-1 monosit, nötrofil, doğal öldürücü hücrelerde ve hafıza T lenfositlerinde bulunur. L- selektin ve temelde B lenfositler tarafından eksprese edilen CD24 diğer ligandlarıdır (80).

İntegrinler

İntegrinler birbirine kovalan olmayan bağlarla bağlı α ve β zincirlerinden oluşan heterodimer bir yapıya sahiptir. Ligand bağlanmasında her iki zincir de görev alır. Etkileşimin özgünlüğünden α alt ünitesi sorumludur, β alt ünitesi hücre içinde sinyal iletiminden sorumlu proteinler veya hücre iskeleti ile irtibat halindedir (92). Adezyon için kalsiyum, magnezyum gibi iki değerlikli iyonlar gereklidir (73). İntegrinler hücre-hücre ve hücre-matriks adezyon molekülleridir (93). İntegrinler dışardan hücre içine ve hücre içinden dışarıya iki yönlü sinyal iletebilme yeteneğine sahiptirler (94). Bugüne kadar 24 α , 9 β zinciri tanımlanmıştır (92). Farklı α , β kombinasyonları ile farklı integrin molekülleri oluşur ve β alt ünitelerine göre sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırmaya göre aynı grupta β alt üniteleri aynıdır ancak α alt üniteleri değişkendir (73).

β_1 integrinler: De novo sentez nedeniyle geç eksprese edildiklerinden "very late activation antigen" VLA integrinleri olarak da bilinirler. VLA 1-6 olarak isimlendirilen 6 üyesi vardır. Endotel hücreleri, santral sinir sistemindeki gliyal ve menenjiyal hücreler, lökosit, trombosit, monosit, bazofil ve eozinofillerde bulunurlar (95). Hücre matriks etkileşiminde rol oynarlar. Fibronektin, laminin, kollajen gibi bağ dokuda yer alan makromoleküllere bağlanırlar. Yara iyileşmesinde ve embriyogenezde hücre göçünde işlev görürler (78). En çok çalışılmış olan VLA-4 (CD49d) molekülü istirahat halindeki nötrofillerde bulunmaz. In vivo olarak damar dışında nötrofil yüzeyinde VLA-4 ekspresyonunun gösterilmiş olması dokuya lökosit göçünde rolü olduğunu desteklemektedir (96). VLA-4 ligandı vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) immünglobülin benzeri süperaille içindedir ve aktive endotel hücrede eksprese edilir.

β_2 integrinler: Bu grup lökosit integrinleri olarak da isimlendirilir. Kemik iliğinden köken alan miyeloid hücrelerin hemen hemen tamamında bulunurlar. Hücre- hücre adezyonunda rol oynarlar (86).

Bu grupta yer alan lökosit fonksiyon antijeni (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$ integrin, CD11a/CD18) tüm lökositlerin yüzeyinde eksprese edilir. Antijen sunumu sırasında T hücre yüzeyindeki LFA-1, antijen sunan hücre yüzeyindeki intrasellüler adezyon molekülleri (ICAM) ICAM-1 ve 2 ile, antijen sunan hücre yüzeyindeki LFA-1

molekölü ise T hücredeki ICAM-3 ile bağlanır. Bu bağlantı antijen sunumunda T hücre reseptörü (TCR) ve antijen sunan hücre yüzeyindeki MHC birleşmesinden sonra olur ve enflamatuvar sitokinlerin (IL-12, interferon- γ : IFN γ) salınımı gerçekleşir.

Enflamasyon ve otoimmün hastalıkların kontrolünde kullanmak ve enflamatuvar sitokin salınımını engellemek üzere LFA-1 antagonistleri (antikor ya da peptid olarak) geliştirilmeye çalışılmaktadır (78). İmmünglobülin benzeri süper aile içinde yer alan ICAM-1 ve ICAM-2 aynı zamanda endotel hücre yüzeyinde de bulunur ve LFA-1'in bu moleküllerle etkileşimi dolaşımdaki lökositlerin hasarlı bölgeye göçünde rol oynar (91). Makrofaj integrinleri olarak isimlendirilen Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$ integrin, CD11b/ CD18) ve p150, 95 ($\alpha_x\beta_2$ integrin, CD11c/ CD18) heterodimerleri de bu grupta yer alırlar ve monosit, nötrofil, NK hücrelerinde eksprese edilirler. Mac- 1 ve p150, 95 hücre içindeki granüllerde depolanır ve aktivasyonla hücre yüzeyine gönderilirler. C5a, LTB₄, TNF α , bakteriyel peptidler ile ekspresyonları uyarılır (86)

β_3 integrinler: Hücre- matriks etkileşiminde rol oynarlar. Bu gruptaki adezyon moleküllerinden $\alpha_{2b}\beta_3$ integrin (CD41/CD61) trombositler ve megakaryositler tarafından eksprese edilir. Fibrinojen, von Willebrand faktör, trombospondin ve vitronektin gibi çözünebilir vasküler ligandları ile bağlanır. Trombositlerin agregasyonunda görev alırlar. $\alpha_v\beta_3$ integrin aktive endotel hücresi, aktive lökositler, makrofaj ve osteoklastlarda bulunur ve matriks proteinleri ile bağlanmayı sağlar. Neovaskülarizasyonda ve apoptotik hücrelerin tanınmasında rol oynarlar (86).

β_7 integrinler: Bu grubun iki üyesi $\alpha_4\beta_7$ ve $\alpha_E\beta_7$ (CD 103), bazı lökosit alt grupları tarafından eksprese edilirler. Mukozal immün sistemde yer alan lenfositlerin yüzeyinde bulunurlar. Böylece lenfositlerin fizyolojik koşullarda Peyer plaklarında ve intraepitelial tutulumu sağlar. $\alpha_4\beta_7$ integrin Peyer plaklarında ve mezenterik lenf nodlarında eksprese edilen MAdCAM- 1 ile etkileşime girer. Bu grup integrinlerin ekspresyonu barsak (örn. Crohn hastalığı) veya sinoviyal membranı etkileyen (örn. romatoid artrit) enflamasyon varlığında artar (86). $\alpha_E\beta_7$ (CD 103)

integrin ise epitelyal yüzeylerde bulunan T lenfositler ve dendritik hücreler için E-Kaderin bağlanma noktasını oluşturmaktadır.

İmmünglobülin Benzeri Süperaile

Ekstraselüler kısımda bir veya daha fazla sayıda immünglobülin tekrarları içerdikleri için bu şekilde isimlendirilmişlerdir. Kalsiyumdan bağımsız olarak fonksiyon görürler (97).

Sitoplazmik kısım hücre iskeletine ezrin gibi hücre içi proteinler aracılığı ile bağlanır. Hücre- hücre adezyonundan sorumludurlar. Özellikle endotel hücre- lökosit adezyonunda ve antijen sunumunda antijen sunan hücre ile lökosit bağlanmasında rol oynarlar. IL-1 ,TNF ve IFN γ ' ya cevap olarak ekspresyonları artar (73,75).

ICAM- 1 (intraselüler adezyon molekülü): Endotel hücresi, epitel hücreleri, lenfosit ve makrofajlarda eksprese edilir. β_2 integrinlerin ligandıdır. Lökosit-lökosit ve lökosit-endotel hücre adezyonunda yer alır (86). Özgün olarak lökositlerin yüzeyinde bulunan LFA- 1'e, monosit ve nötrofillerdeki Mac- 1'e bağlanırlar. Nötrofillerin hasarlı dokuya göçü sırasında aktive lökosit yüzeyindeki β_2 integrin ile birleşerek aktive endotelle lökosit arasında sıkı bağlantı kurulmasını sağlarlar (80).

ICAM- 2: Dinlenme halindeki lökosit ve aktive olmamış endotel hücresinde bulunur. Hücre uyarısı ile ekspresyonu artmaz. Lökosit-lökosit ve lökosit-endotel hücre bağlanmasında rol oynar. β_2 integrinlerin ligandıdır (80).

ICAM- 3: Sadece Langerhans hücreleri ve kemik iliği kökenli hücrelerde bulunur. Lökosit-lökosit bağlantılarında önem taşır (80). Dinlenme halinde lökositlerde ICAM-1 ekspresyonu çok düşüktür. Bu durumda ICAM- 3, LFA-1 ile adezyonun sağlanmasında ve bağışıklık cevabının başlatılmasında görev alır (91).

PECAM- 1 (trombosit- endotel hücre adezyon molekülü- 1): Endotel hücrelerinin birbirleri ile ilişkili olan yüzlerinde bulunur. Ayrıca trombositler ve birçok lökositte az miktarda eksprese edilirler. Lökosit ve endotel hücre yüzeyindeki PECAM- 1'ler arasındaki homotipik bağlanma ile endotel hücreleri arasından nötrofil göçü gerçekleşir (80).

VCAM- 1 (vasküler hücre adezyon molekülü- 1): ICAM-1'e benzer şekilde aktive endotel hücre yüzeyinde bulunurlar. Lökositlerin damar dışına göçünde ligandı olan VLA- 4 ile bağlantı kurarak işlev görür (78).

NCAM (nöral hücre adezyon molekülü): Bu moleküller kendi aralarında oluşturdukları homotipik adezyonla sinir sisteminin gelişiminde; özellikle akson uzaması ve nöral bağlantıların sağlanmasında rol oynarlar (75).

Kaderinler

Epiteldeki hücre-hücre bağlantılarında yer alırlar. Kalsiyuma bağımlı adezyon molekülleridir (73).

Sitoplazmik işlevsel kısımları α , β ve γ olarak alt sınıflara ayrılan kateninlerden oluşur. Kaderinler kateninler aracılığı ile hücre iskeletindeki ara filamanlara bağlanırlar. Bu yapı içinde bulunan ve membran kısmına tutunan p120-katenin hücrede bulunan Rho proteinleri aracılığı ile sinyal iletimini sağlar. Embriyonik dokuları bir arada tutan temel adezyon molekülleri kaderinlerdir (97).

E- Kaderin: İnsanda eksprese edilen ilk adezyon molekülüdür. Bu grubun en iyi tanımlanan üyesidir. E-kaderin embriyonun erken organizasyonunda önem taşır. Hücreler arası bağlantılardan biri olan sıkı bağlantılarda yer alır ve kateninlerle aktin filamentlerine bağlanır. Birçok epitel hücresinde bulunur (97).

Tanımlanmış diğer kaderinler sinir, kas ve lens dokusunda bulunan N-kaderin ve plasenta ve epidermiste bulunan P-kaderindir (97).

Ayrıca desmozom yapısına katılan desmoglein ve desmokolün isimli kaderinler kateninler aracılığıyla sitokeratinlere bağlanırlar. Osteoblastlarda yeni tanımlanan kaderin-11' in embriyogenezin farklı aşamalarında eksprese edildiği ve mezenkim kaynaklı dokuların organizasyonunda önemli olduğu rapor edilmiştir (73).

3- GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gerekli Malzemeler

3.1.1 Reaktifler

Kullanılacak Monoklonal Antikorlar

- CD45/14
- İzotipik kontrol
- CD4/CD8/CD3
- CD3/CD16+56
- CD5/CD10/CD19
- CD57/CD16/CD3
- CD103/CD22/CD20
- CD68
- HLA-G
- IgG₁-kappa

3.1.2 Diğer Malzemeler

- Flowsitometri cihazı (BD FACS Calibur 4-color, Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Soğutmalı Santrifüj (Sigma 2-16)
- Ayarlanabilir Otomatik Pipetler (10µl ,100µl, 1000µl Eppendorf AG / Almanya)
- Uygun Pipet uçları (Greiner Bio One, Almanya)
- Deneysel Tüpleri (Round Bottom Tubes 12*75 mm, PS, BD Falcon, ABD)
- Soğuk PBS (Phosphate Buffered Saline) Ph:7.4 (BD, ABD)
- Spin Vortex (Biosan FV-2400, Rusya)
- Steril Distile Su (Eczacıbaşı, Türkiye)
- Masa Üstü Santrifüj (Sigma)
- Karanlık inkübasyon Ortamı
- % 5 CO₂ İçeren 37 °C ısıklı inkübatör

- Laminar Airflow
- %0,2'lik tip II Kollejenaz (Sigma Corp, St. Louis MO)
- HBSS (Hank's solusyonu)
- %0.025'lik Tripsin EDTA

3.2 Vaka Seçimi

Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar fonu tarafından desteklenen 2009/26 proje no'lu araştırmamız üniversitemiz yerel etik kurulu tarafından onaylandı. 01/02/2009-05/03/2010 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Anabilim Dalı'na başvuran 34 kadın çalışmaya dahil edildi.

Çalışma gurubundaki 22 kadın açıklanamayan infertilitesi olan ve en az üç kez gonadotropinlerle ovulasyon indüksiyonu yapılmasına rağmen gebe kalamamış hastalardan seçildi. Kontrol gurubundaki 12 kadın ise en az 3 yaşayan çocuğu olan, özgeçmişlerinde kötü obstetrik öyküsü, kendiliğinden düşük ve başarısız implantasyonu düşündüren gebelik geçmişi olmayan, hastanemize rahim içi araç uygulaması için başvuran gönüllüler arasından seçildi.

Açıklanamayan infertilite tanımı en az 1 yıllık düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebe kalamamış ve yapılan temel infertilite değerlendirme testlerinde bir sorun saptanmamış hastalar olarak kabul edildi.

Açıklanamayan infertilitesi olan grup olarak yapılan temel infertilite değerlendirme testlerinde ovulasyonun normal olduğunu gösteren laboratuvar testleri, tubal pasajın ve endometriyum kavitesinin düzenli olduğunu gösteren histerosalpingografi ve normal sperm parametreleri olan erkek faktörü dışlanmış hastalardan seçildi. Hastaların hepsinde en az 3 kez gonadotropinlerle ovulasyon indüksiyonu ve ardından intra uterin inseminasyon uygulanmasına rağmen gebelik elde edilememişti. Hastaların adet dönemlerinin üçüncü günü bakılan antral folikül sayıları ortalaması sol over için 6, sağ over için 7 olarak tespit edildi. Ayrıca, hastaların bakılan bazal hormon düzeylerinden FSH, LH, E2 ve prolaktin seviyelerinde anormallik saptanmadı.

Endometriyum örnekleme steril karman kanül ve şırınga ile siklusun 20-24 günlerine denk gelen midluteal dönemde, ultrasonografi ile saptanan ovulasyondan

sonraki 7. günde yapıldı. Her iki gruptaki hastalardan alınan endometriyum örnekleri akım sitometrisi ile inceleme ve histolojik günleme için ayrıldı.

Histolojik inceleme ve günleme için Noyes klasifikasyonu esas alındı (98). Bu dönemde örnekleme yapılmasındaki temel amaç implantasyon olması muhtemel dönemde endometriyumdaki doğal öldürücü hücre yoğunluğunun belirlenmesiydi.

Tüm hastalar çalışma konusunda bilgilendirildikten sonra aydınlatılmış onamları alındı.

3.3. DENEYİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

3.3.1 İnsan Endometriyumundan Hücre İzolasyonu

Hastalardan alınan endometriyum doku biyopsisi %5 Penisillin/Streptomisin içeren HBSS içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. Pens yardımıyla boş bir petriye aktarılan endometriyum dokusu steril cerrahi makas ile 1cm³'lük parçalara ayrıldı. HBSS içerisinde çözdürülmüş %0,2'lik Kollajenaz Tip II solüsyonundan eklenerek 37°C su banyosunda 30 dakika enzimatik sindirim için enkübasyona bırakıldı. Üzerine HBSS eklenerek 1300 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra, pelet HBSS ile sulandırılarak 100 µm'lik hücre süzgecinden geçirildi. 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmesinin ardından süpernatant atıldı ve %0.025'lik Tripsin EDTA solüsyonunda 3 dakika 37°C su banyosunda inkübe edildi. Üzerine HBSS eklenerek 1300 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak, pelet 1 ml HBSS ile sulandırılıp flow sitometri analizine geçildi.

3.3.2 İnsan Endometriyumundan Elde Edilen Hücrelerin Flow Sitometri Aygıtında İncelenmesi

Antikor işaretleme: Desidual lenfositler (1x10⁶ hücre/100µl) 20µl FITC (fluorescein isothiocyanate)-konjuge anti-CD16 MoAb (Pharmingen, SanDiego, CA), PE-(phycoerythrin) konjuge anti-CD56 antikor (Pharmingen, SanDiego, CA) ve PerCPkonjuge anti-CD3 antikor (Becton Dickinson, SanJose, CA) ile işaretlendi.

Akım sitometri: Akım sitometrisindeki analizler için hücrelerin sıvı içersinde süspansiyon halinde bulunması gerektiğinden kan hücreleri, akım sitometride en çok incelenen hücreler olmuşlardır. Solid dokularda ise hücreler ayrıştırılıp edilip hücre süspansiyonu hazırlanarak akım sitometrik analizlerde kullanılmaktadır.

Hücreler yüzeylerindeki veya hücre içindeki proteinlere özgün antikorlarla enkübe edilerek antijenlere bağlanmaları sağlanır. Her spesifik antikor FITC, PE, PerCP gibi floresan boya ile işaretlenmiştir. Böylece, belirli antijene sahip hücrelerin lazer ışını ile karşılaştığında verdiği floresan sinyalleri değerlendirilerek o hücrelerin hangi özgün antijeni taşıdığı belirlenebilir. Hücrelerin taşıdıkları antijenlerin yanı sıra hücre içi enzimlerin, DNA, RNA miktarlarının da uygun florokromlar ile işaretlenerek belirlenmesi mümkündür. Akım sitometrik incelemede farklı florokrom ile işaretlenen hücreler basınç altında “flow cell” denilen kısımdan geçerler ve buradan lazer ışınına maruz kalırlar.

Hücrelerin üzerine bağlanan monoklonal antikorlar lazer ışını emerek üzerlerindeki florokromun özelliğine göre farklı dalga boylarında ışın saçarlar; her hücreden saçılan ışınlar çoklu dedektörler yardımı ile her hücre için ayrı ayrı belirlenir ve bu bilgiler bilgisayar ortamına aktarılır. Florokromların saçtığı ışınların yanı sıra, hücreye çarpıp ileri doğru saçılan ve hücrenin büyüklüğü ile ilgili olan lazer ışınları (FSC), hücreden 90 derece açıyla yana saçılan ve hücrenin granülaritesi ve kompleks yapısı ile ilgili olan ışınlarla (SSC) ilgili veriler de aktarılmaktadır. Her hücre ile ilgili depolanan tüm bilgiler, analiz için hazırlanmış programlar yardımı ile birçok parametreyi bir arada değerlendirecek şekilde analiz edildi. Antikor işaretli hücreler FACS Caliber (Becton Dickinson) akım sitometri ile analiz edildi. Üç renkli akım sitometride 488nm de 15mW argon lazer kullanıldı. İlk kapı FS (forward scattered) ve SS (side scattered) nokta grafiklerdeki lenfositlere göre alınarak diğer hücreler dışlanır. Sonra çakışan FITC-, PE(fitokeratin) -, PerCP-konjuge antikorlar kullanılarak, (konjuge monoklonal antikor) CD45/14, CD4/CD8/CD3, CD3/CD16+56, CD5/CD10/CD19, CD57/CD16/CD3, CD103/CD22/CD20, CD68, HLA-G, IgG_{1-kappa} ve uygun izotip kontrollerinden (IgG1, IgG1/G2a) 10µl eklenerek inkübe edilmiştir (oda ısısında karanlıkta-45 dak.).

FL1, FL2, FL3 sinyalleri alınmıştır. İkinci kapı CD3 lenfositlere göre alınmıştır. Diğer tüm antikor hücrelerinin sonuçları bu lenfositlerin yüzdesi olarak hesaplandı. Antikor pozitif hücrelerin inkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azid içeren PBS) eklenmiş ve santrifüj edilerek (5dk. 1780rpm) artefaktlardan temizlenmiş ve 400µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akım sitometri cihazında okutulmuş ve analizi *BD Cell Quest TM software* programı ile gerçekleştirilmiştir

3.5 İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde SPSS 13.0 programı (IL, ABD) kullanıldı. Kategorik değişkenler sayı (n) ve yüzde (%) şeklinde sunuldu ve iki grup arasında kategorik değişkenlerin dağılımı ki-kare testi ile sınıandı. Devamlı değişkenler eğer normal dağılıma uyuyorlarsa ortalama ve standart sapma, uymuyorlarsa en az en çok değer ve ortanca şeklinde sunuldu. Devamlı değişkenlerin iki grup arasındaki dağılımı normal dağılıma uyanlarda t-testi, uymayanlarda Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Olasılığın (p) 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

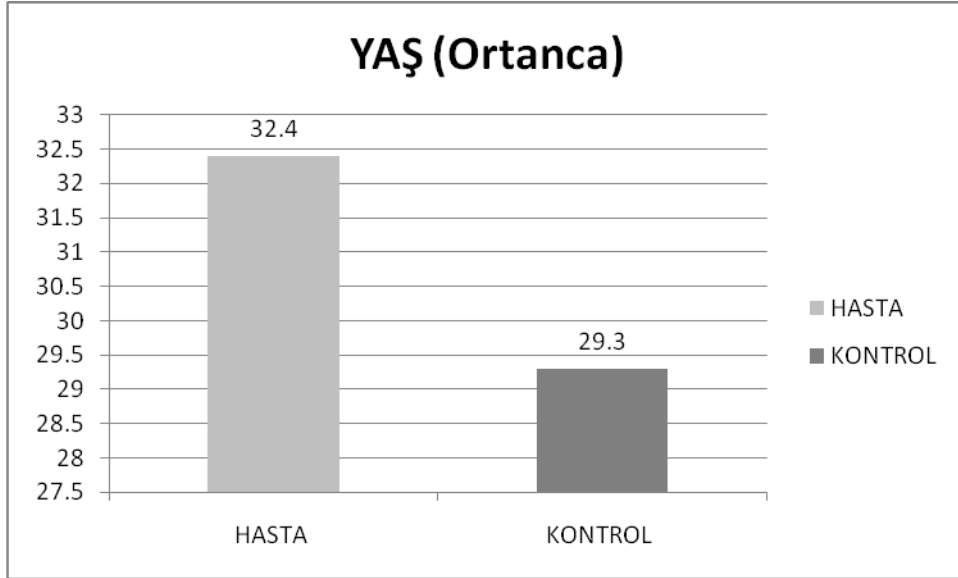
Açıklanamayan infertilitesi olan 22 kadın ve infertilite sorunu olmayan 12 kadın çalışmaya dahil edildi. Açıklanamayan infertilite grubundaki hastaların 11 tanesi primer, 11 tanesi sekonder infertildi ancak hiçbirinin yaşayan çocuğu veya tekrarlayan düşüğü yoktu. İncelenen 34 hastanın hiçbirinin tıbbi öykülerinde diabetes mellitus, hipertansiyon ve tiroid fonksiyon bozukluğu mevcut değildi. Ayrıca açıklanamayan infertilite grubundaki 22 hastanın hepsinin histerosalpingografisi incelenmiş ve tubal faktör dışlanmıştı. 2 gruptaki hastaların tümü transvajinal ultrasonografi ile değerlendirilmiş ve hiçbirinde infertilite sebebi olması muhtemel myoma uteri, endometrioma, hidrosalpenks saptanmamıştı.

Hastaların ortalama infertilite süresi 73.09 ay (minimum: 18 ay; maksimum: 216 ay) olarak tespit edilmiştir. Açıklanamayan infertilitesi olan hastaların tümünün eşlerinin sperm parametreleri normal olarak değerlendirilmiştir.

Çalışma öncesi açıklanamayan infertilite grubundaki 3 hastaya ofis histeroskopi, 2 hastaya tanısal laparoskopi yapılmıştı. Histeroskopi yapılan hastalardan birinde endometrial polip saptanıp aynı seansta polipektomi uygulandı. Örneklemenin yapıldığı gün ayrıca ovulasyonun dolaylı göstergesi olması açısından hastaların serum progesteron düzeylerine de bakıldı.

Açıklanamayan infertilite grubundaki hastaların ortalama yaşı 32.4 (25-38) iken kontrol grubundaki hastaların 29.3 (24-39) idi. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0.865$).

Şekil 4.1- Açıklanamayan infertilite grubunun (n=22) ve kontrol grubunun (n=12) yaş dağılımı (ortanca)



Bu çalışmada her iki grup over rezervi açısından bazal (menstruasyonun 2, 3 veya 4. günü) FSH, LH, E2 düzeyleri ve antral folikül sayıları yönünden değerlendirildi.

Açıklanamayan infertilite grubunda ortalama FSH değeri 5.96 m IU/ml (2.21-11.2) iken kontrol grubunda 4.36 m IU/ml (1.50-11.50) olarak bulunmuştur ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (p=0.065)

Ortalama E2 değerleri açıklanamayan infertilite grubunda 50.01 pg/ml (17.7-115.2) iken kontrol grubunda 76.33 pg/ml (30.51-287) olarak tespit edilmiştir. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (p=0.167)

Ayrıca her iki grup tiroid fonksiyon testleri açısından da karşılaştırılmıştır. Ortalama TSH düzeyi açıklanamayan infertilitesi olan grupta 1.96 µIU/ml (0.6-4.8) iken kontrol grubunda 1.81 µIU/ml (0.5-3.01) olarak bulunmuştur ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (p=0.654)

Olguların siklus 2 veya 3. günü antral folikül sayıları her iki over için incelenmiştir. Antral folikül sayıları sol over için açıklanamayan infertilite grubunda ortalama 5.59 (3-10) adet iken kontrol grubunda 5.40 (2-10) adet, sağ over için açıklanamayan infertilite grubunda ortalama 5.91 (3-9) adet iken kontrol grubunda

5.40 (2-10) adet olarak tespit edilmiştir. Antral folikül sayısı açısından da her iki grupta istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır. (Sırasıyla p=0.346 ve p=0.852)

Tablo 4.1- Açıklanamayan infertilite ve kontrol grubunun yaş, vücut kitle indeksi, FSH, LH, E2, PRL, TSH, antral folikül sayıları ve progesteron düzeyleri ortalaması.

	Açıklanamayan İnfertilite	Kontrol	P değeri
Yaş	32.4 (25-38)	29.3 (24-39)	0.865
VücutKitle İndeksi	25.0 (22-32)	24.5 (21-31)	0.77
FSH (IU/ml)	5.96 (2.2-11.2)	4.36 (1.5-11.5)	0.065
LH (IU/ml)	4.62 (0.98-8.8)	5.05 (1.18-10)	0.087
E2 (pg/ml)	50.01 (17.7-115.2)	76.3 (30.5-287)	0.167
PRL	13.9 (7.97-23.9)	14.2 (6.97-35.9)	0.434
TSH (µIU/ml)	1.96 (0.60-4.80)	1.81 (0.5-3.01)	0.654
Sol Antral Folikül Sayısı	5.59 (3-10)	5.40 (2-10)	0.346
SağAntral Folikül Sayısı	5.91 (3-9)	5.40 (2-10)	0.852
Progesteron (ng/ml)	9.58 (5.04-29.8)	9.97 (6.01-18.43)	0.114

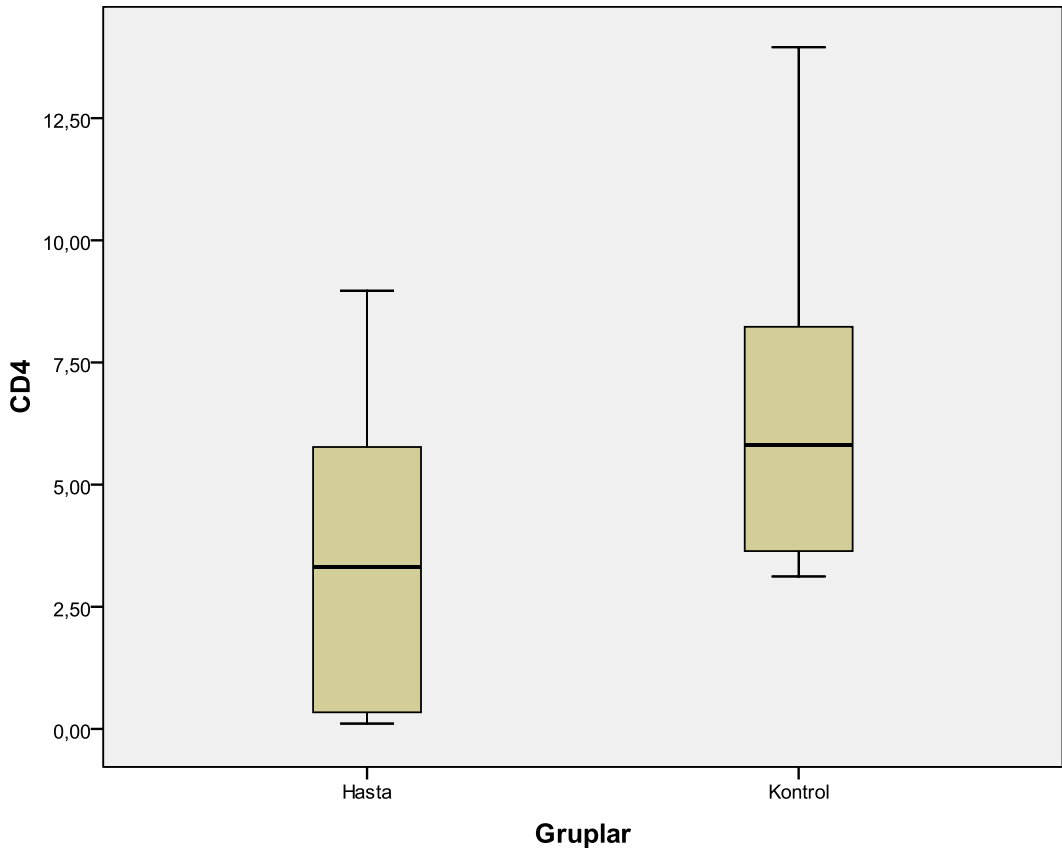
Tablo 4.2- Serum progesteron seviyeleri ve endometriyal histolojik günleme sonuçları.

	Serum progesteron seviyesi (ng/ml)	Histolojik Noyes gnlemesi
Hasta 1	7.74	Sekretuar faz
Hasta 2	1.29	Sekretuar faz
Hasta 3	6.34	Sekretuar faz
Hasta 4	17.40	Sekretuar faz
Hasta 5	15.80	Sekretuar faz
Hasta 6	11.90	Sekretuar faz
Hasta 7	0.73	Proliferatif faz
Hasta 8	10.80	Sekretuar faz
Hasta 9	11.96	Sekretuar faz
Hasta 10	1.27	Sekretuar faz
Hasta 11	12.80	Sekretuar faz
Hasta 12	5.51	Sekretuar faz
Hasta 13	0.50	Sekretuar faz
Hasta 14	0.40	Sekretuar faz
Hasta 15	27.70	Sekretuar faz
Hasta 16	29.80	Sekretuar faz
Hasta 17	0.80	Proliferatif faz
Hasta 18	0.40	Sekretuar faz
Hasta 19	1.14	Sekretuar faz
Hasta 20	4.45	Sekretuar faz
Hasta 21	8.31	Sekretuar faz
Hasta 22	11.74	Sekretuar faz
Kontrol 1	18.43	Sekretuar faz
Kontrol 2	3.60	Sekretuar faz
Kontrol 3	13.70	Sekretuar faz
Kontrol 4	11	Sekretuar faz
Kontrol 5	11.30	Sekretuar faz
Kontrol 6	2.43	Sekretuar faz
Kontrol 7	6.80	Sekretuar faz
Kontrol 8	7.04	Sekretuar faz
Kontrol 9	1.04	Sekretuar faz
Kontrol 10	12.10	Sekretuar faz
Kontrol 11	11.06	Sekretuar faz
Kontrol 12	9.20	Sekretuar faz

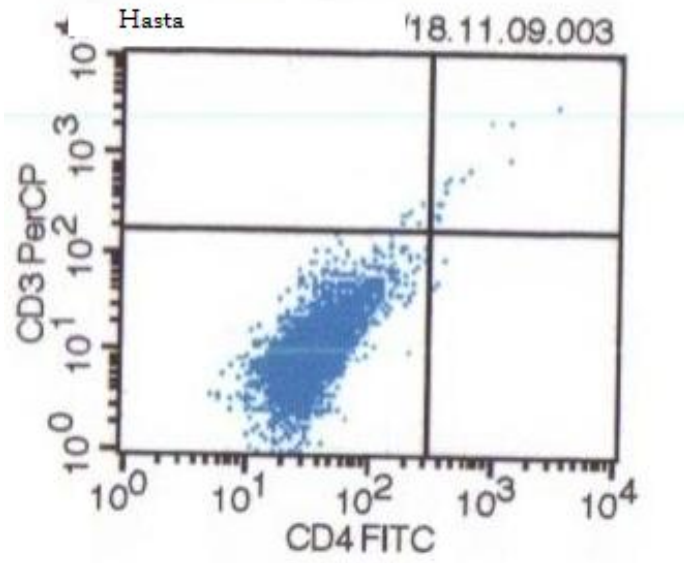
Endometriyum örnekleri CD45, CD14, CD45+14,SCD3, CD4, CD8, CD16+56, CD3+16+56, CD8+3, CD5, CD10, CD19, CD103, CD22, CD20, CD57, CD16, CD68, ve CD4/CD8 oranına göre akım sitometri ile analiz edilmiştir.

Endometriyum CD4+ hücre yüzdesinin açıklanamayan infertilite grubunda ortanca değeri 3.31 (0.11-8.97) iken kontrol grubunda 5.81 (3.12-13.95) olarak tespit edilmiştir. Açıklanamayan infertilite grubunda endometriyum CD4+ hücre yüzdesi istatistiksel açıdan kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.(p=0.02)

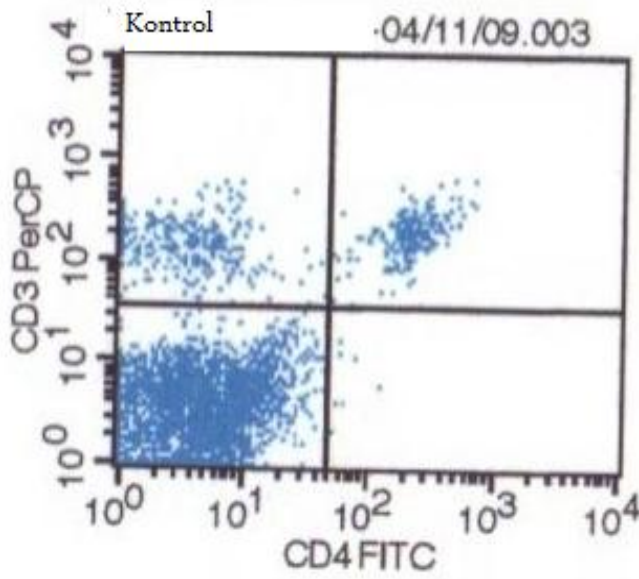
Şekil 4.2- Açıklanamayan infertilite ve kontrol grubunun endometriyum CD4+ hücre yüzdesi median değerleri.



Şekil 4.3- Açıklanamayan infertilite grubunun CD4+ hücre akım sitometri analiz örneği.

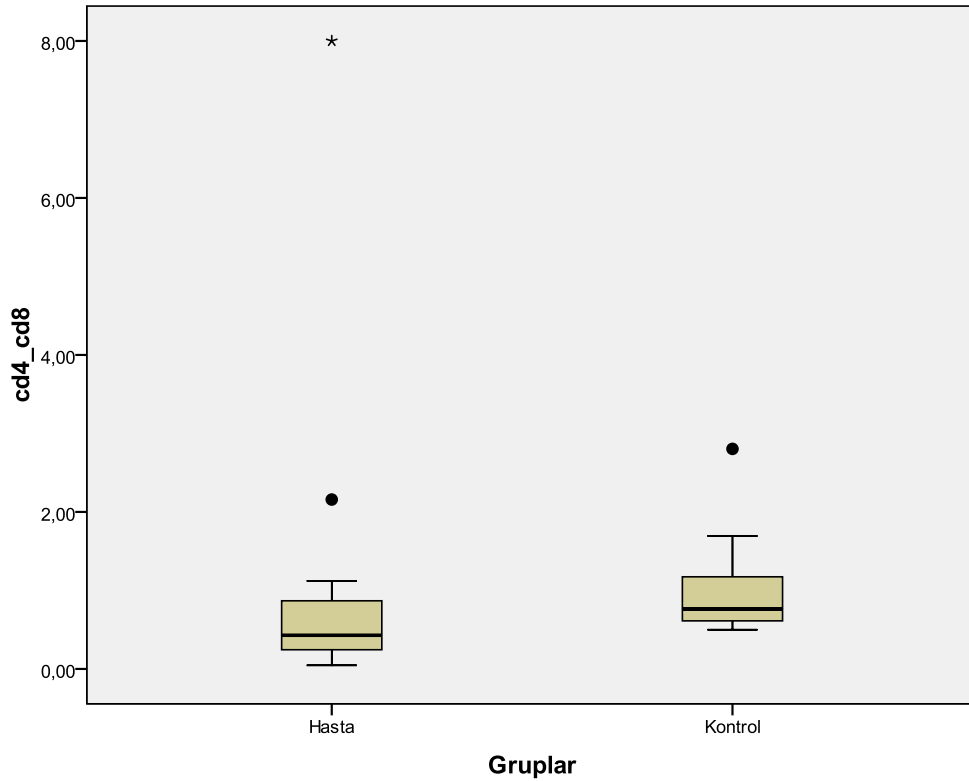


Şekil 4.4- Kontrol grubunun CD4+ hücre akım sitometri analiz örneği



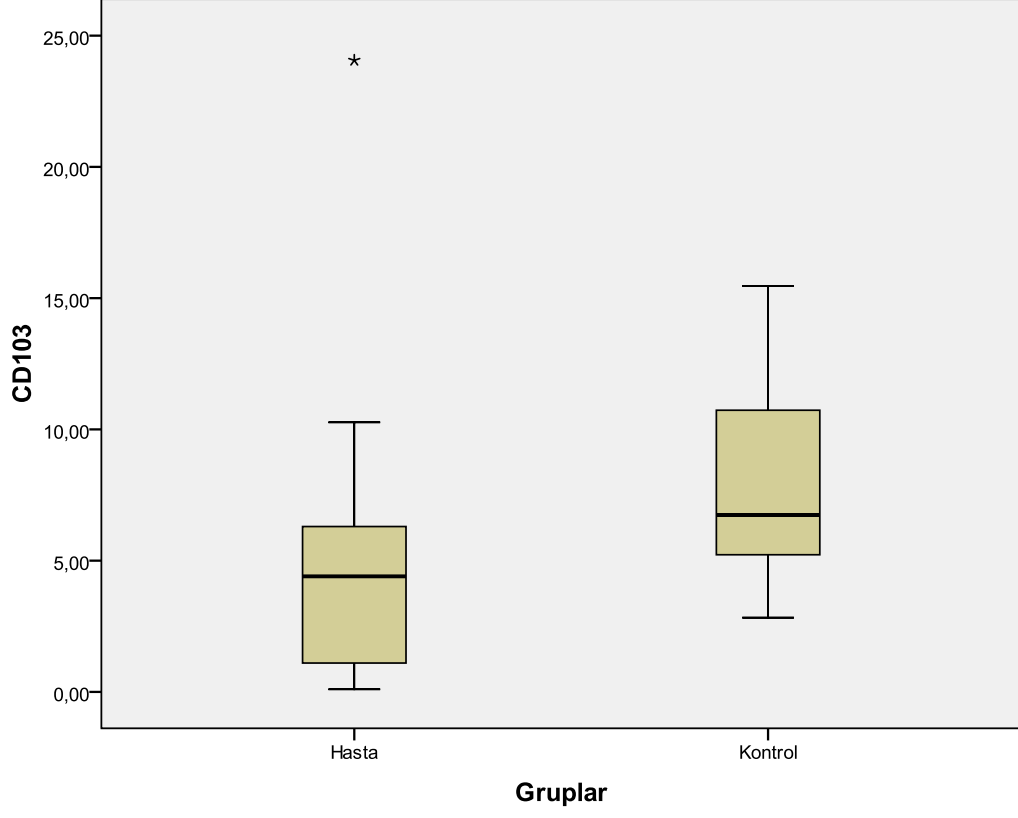
İki grup CD4/CD8 oranları karşılaştırıldığında ise açıklanamayan infertilite grubunda CD4/CD8 oranı median değeri 0.42 (0.05-8.00) iken, kontrol grubunda 0.76 (0.5-2.80). olarak tespit edilmiştir. CD4/CD8 oranının median değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kontrol grubunda daha yüksek saptanmıştır (p=0.016).

Şekil 4.5- Açıklanamayan infertilite ve kontrol grubunun endometriyum CD4/CD8 median değerleri.

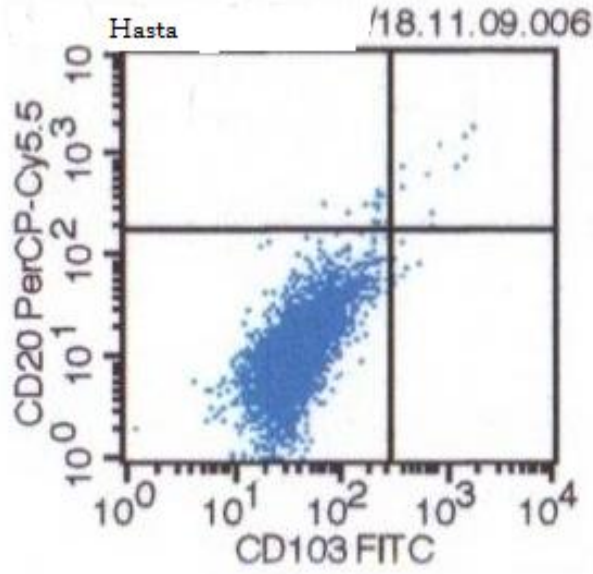


İki grup endometriyum CD103+ hücre yüzdeleri açısından karşılaştırıldığında açıklanamayan infertilite grubunda ortanca değeri 4.40 (0.10-24.06) bulunurken kontrol grubunda 6.73 (2.83-15.46) olarak tespit edilmiştir. CD103+ ortanca değeri kontrol grubunda, açıklanamayan infertilite grubundan istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. (p=0.02)

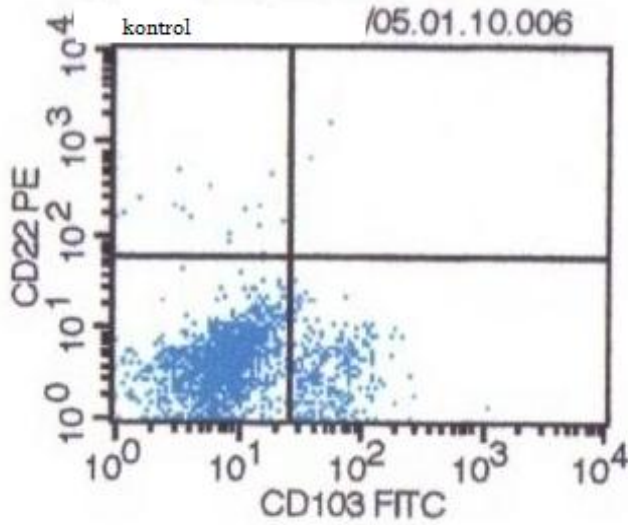
Şekil 4.6- Açıklanamayan infertilite ve kontrol grubunun CD103+ endometriyum hücre yüzdesi ortanca değerleri.



Şekil 4.7- Açıklanamayan infertilite grubunun CD103+ hücre akım sitometri analiz örneği.



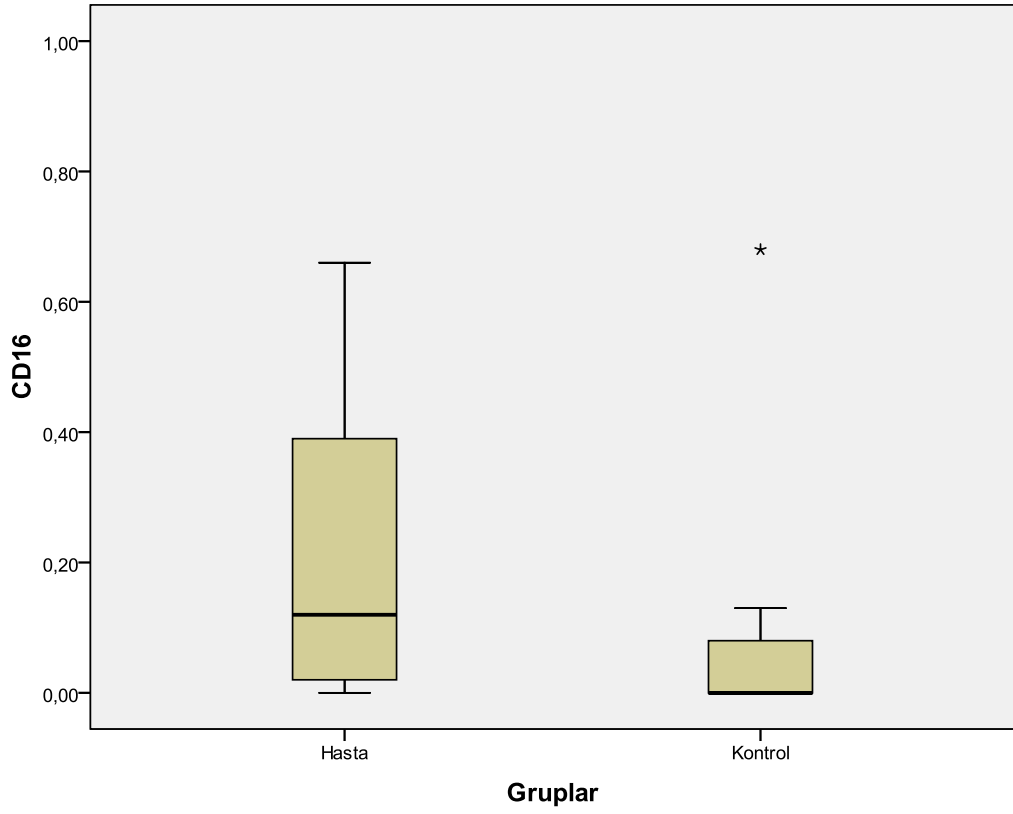
Şekil 4.8- Kontrol grubunun CD103+ hücre akım sitometri analiz örneği



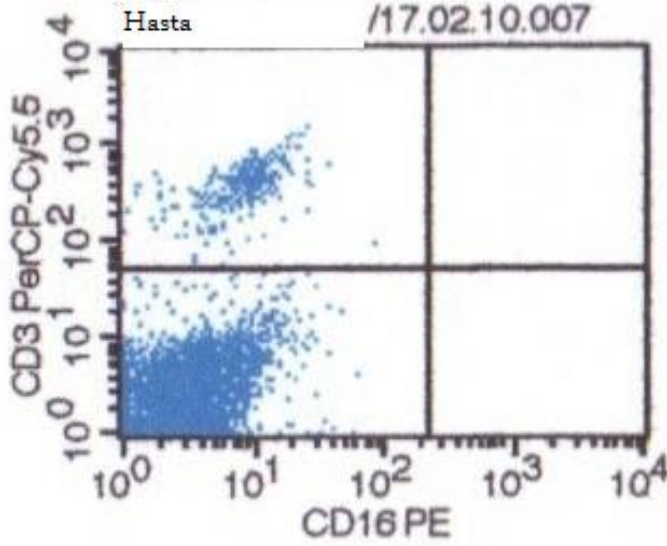
Endometriyum CD16+ hücre yüzdesi açısından açıklanamayan infertilite grubunun ortanca değeri 0.12 (0.001-4.64) iken kontrol grubunda 0.001 (0.001-0.68) olarak saptanmıştır. Bu değerler açısından kontrol grubunun ortanca değeri

açıklanamayan infertilite grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur ($p=0.01$).

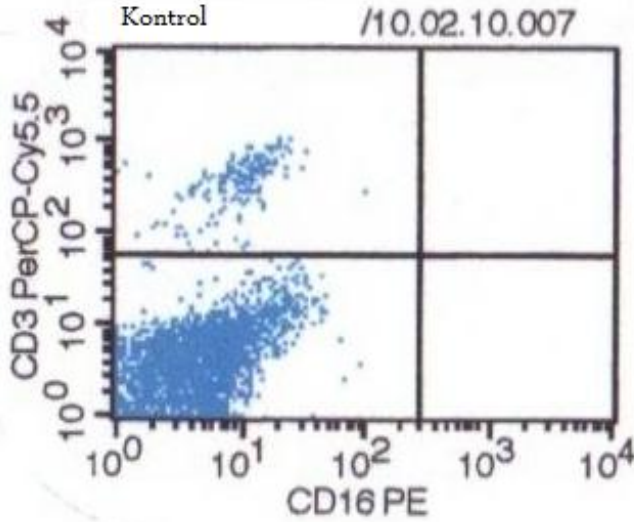
Şekil 4.9- Açıklanamayan infertilite ve kontrol grubunun endometriyum CD16+ hücre yüzdesi ortanca değerleri.



Şekil 4.10- Açıklanamayan infertilite grubunun CD16+ hücre akım sitometri analiz örneği.



Şekil 4.11- Kontrol grubunun CD16+ hücre akım sitometri analiz örneği



İki grup endometriyum CD8+ hücre yüzdesi açısından karşılaştırıldığında açıklanamayan infertilite grubunda CD8+ hücre yüzdesi ortanca değeri 5.14 (0.02-26.69) iken kontrol grubunda 6.40 (2.09-22.35) olarak saptanmıştır. İki grup arasında

endometriyum CD8+ hücre yüzdeleri açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. (p=0.296)

Diğer endometriyum lenfosit yüzey işaretçilerinden CD14, CD45+14, SCD3, CD16+56, CD8+3, CD3+16+56, CD5, CD10, CD19, CD22, CD20, CD57, CD68 düzeyleri açısından kontrol grubu ile hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3- Endometriyal lenfositlerin yüzey işaretçilerine göre median değerleri

Lenfosit median değeri	Açıklanamayan infertilite	Kontrol	p değeri
CD45+	23.9 (0.13-66.09)	27.22 (8.37-65.27)	0.54
CD14+	0.10 (0.001-0.26)	0.95 (0.001-0.93)	0.98
CD45+14+	0.61 (0.05-19.86)	0.62 (0.12-1.28)	0.46
SCD3+	10.32 (0.001-40.87)	14.81 (4.58-36.71)	0.39
CD16+56+	4.22 (0.001-46.68)	3.81 (0.32-12.16)	0.74
CD4+	3.31 (0.11-8.97)	5.81 (3.12-13.95)	0.02 *
CD8+	5.14 (0.02-26.69)	6.40 (2.09-22.35)	0.29
CD8+3+	4.67 (0.14-19.10)	2.13 (0.81-21.74)	0.90
CD3+16+56+	0.15 (0.001-4.85)	0.09 (0.001-0.63)	0.48
CD5+	10.88 (0.04-34.43)	15.82 (5.43-44.07)	0.17
CD10+	43.10 (6.41-92.03)	23.77 (4.04-69.16)	0.13
CD19+	0.40 (0.001-4.99)	0.85 (0.001-6.10)	0.29
CD103+	4.40 (0.10-24.06)	6.73 (2.83-15.46)	0.02 *
CD22+	0.41 (0.02-4.89)	0.39 (0.001-5.11)	0.56
CD20+	0.40 (0.001-5.83)	0.68 (0.14-4.41)	0.70
CD57+	1.40 (0.12-16.27)	1.39 (0.001-5.09)	0.55
CD16+	0.12 (0.001-4.64)	0.001 (0.0001-0.68)	0.01 *
CD68+	2.55 (0.001-28.65)	1.03 (0.02-62.11)	0.38
CD4+/CD8+	0.42 (0.05-8.00)	0.76 (0.5-2.80)	0.01

*p < 0.05

5. TARTIŞMA

İnsan embriyosunun endometriyuma implantasyonu ve trofoblastik invazyon sağlıklı bir gebeliğin oluşması ve devamı için son derece önemlidir. İmplantasyon ve plasental oluşumun ilk dönemleri belki de gebeliğin sonuna kadar olan sürede karşılaşılabilecek bir takım sorunlara ışık tutabilmek açısından önemlidir. İmplantasyon başarısızlığı, tekrarlayan düşükler ve preeklampsi gibi gebeliğin gerek erken gerekse geç döneminde görülen sorunların implantasyon süreci ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

İnsan endometriyumu menstrüel siklusun çeşitli fazlarında ve gebelikte değişen oranlarda bağışıklık hücreleri içermektedir (99). Bu hücrel değişiklikler sayesinde oluşan endometriyal yangı implantasyon için son derece değerlidir (100).

Endometriyal yangıda görevli hücreler endometriyum yerel mikro çevresinin implantasyona hazır hale getirilmesine ve allojenik olarak anneye yabancı olan fetusun zarar görmeden kabulüne sebep olmaktadır.

Literatürdeki birçok çalışma infertilite tedavisi gören birçok infertil kadının dolaşımında yüksek doğal öldürücü hücre aktivitesi olduğunu göstermiştir (101)

Koopman ve arkadaşlarının uterus doğal öldürücü hücreleri ile dolaşımdaki doğal öldürücü hücreleri karşılaştırdığı çalışmada 10.000 genin microarray analizi yapılmış, 278 genin uterus doğal öldürücü hücrelerinde üç kat daha fazla eksprese edildiğini göstermiştir. Bu farklılık nedeniyle uterus doğal öldürücü hücrelerinin dolaşımdaki doğal öldürücü hücrelerden farklı olduğu düşünülmüştür (102). Bu farklılıklar uterus doğal öldürücü hücrelerinin implantasyon ile ilişkisine işaret edebilir.

Ayrıca Lobo ve arkadaşlarının yaptığı araştırma özellikle luteal faz endometriyumunda, doğal öldürücü hücre sayısının artmasına neden olan genlerin arttığını göstermiştir (103).

Coulam ve arkadaşları infertil kadınların dolaşımındaki doğal öldürücü hücre işlevlerinin ve sitotoksitelerinin doğurgan kadınlara göre daha yüksek düzeyde olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada normal gebelik elde edilen hastaların hiçbirinde doğal öldürücü hücre işlevleri yüksek seyretmezken kimyasal gebelik kaybı yaşayan ya da gebelik oluşmayan hastaların %50 sinde yüksek doğal öldürücü hücre sitotoksitesi saptamışlar ayrıca bağışıklık mekanizmalarının implantasyonda etkili olduğu ve bunda da başrolün doğal öldürücü hücrelerine ait olduğunu öne sürmüşlerdir (101).

Fukui ve arkadaşları infertilitesi olan ve tüp bebek uygulanan kadınların kan dolaşımı ve endometriyumunda doğal öldürücü hücre sayılarını değerlendirdikleri çalışmalarında CD16+, CD16+CD56+ doğal öldürücü hücrelerinin embriyo implantasyonu olan grupta, implantasyonun başarısız olduğu gruba göre anlamlı şekilde düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca yine aynı çalışmada alınan endometriyal örneklerin akım sitometriyle incelemesinde implantasyon başarısızlığı olan grupta endometriyumda CD16+CD56mat oranlarının yüksek, CD16-CD56parlak oranlarının ise düşük olduğunu bulmuşlar ve kan dolaşımı ve endometriyumdaki yüksek sitotoksik doğal öldürücü hücre işlevinin tüp bebek tedavisinde gebelik oluşumunu etkileyebileceği sonucuna varmışlardır (3).

Thum ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise doğal öldürücü hücrelerindeki CD69 ekspresyonunun tekrarlayan gebelik kaybı ve infertilite ile ilişkisi araştırılmış ve ekspresyon artışının doğal öldürücü hücre işlevlerini arttırdığını ifade etmişlerdir (104). Yine bu çalışmada implantasyon başarısızlığı ile yüksek CD56matCD16+ doğal öldürücü hücre oranlarının ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Doğal öldürücü hücreler kan dolaşımındaki lenfositlerin %10-20lik bir kısmını oluşturmaktadır. Doğal öldürücü hücreler T hücreleri gibi yüzey antijeni taşımalarına rağmen bu antijenleri T hücrelerinden farklıdır. Kan dolaşımında bulunan doğal öldürücü hücrelerinin %90 lık bir kısmını yüksek sitotoksik işleve sahip CD56mat olanlar oluştururken endometriyumda bulunan doğal öldürücü hücreleri CD56parlakCD16mat yapısındadırlar. Doğal öldürücü hücreler IL2, CD16 ligand ile uyarılabilirler. Bunun sonucunda IFN γ , TNF α , GMCSF sentezleyip makrofajları aktive ederler. Bu yetenekleri sayesinde vücuda giren antijenik olarak yabancı virus ve bakteri gibi yapıları doğrudan saf dışı edebilirler. Ayrıca kemik iliği hücrelerinde çoğalma, farklılaşma gibi olaylara da IFN γ , TNF α , IL 2 gibi sitokinleri sentezleyerek katkıda bulunurlar. Dolayısıyla doğal öldürücü hücre serisinde oluşan

bozukluklar insan başışıklık sistemini doğrudan etkilemektedir. Doğal öldürücü hücreleri hedef hücreleri önceden duyarlılaşma göstermeden öldürebilme yeteneğine sahiptir. IgG için Fc reseptörü taşıdıkları için antikor bağımlı sitotoksitede de görev alırlar. Doğal öldürücü hücrelerinin hedef hücreyi parçalamakta görevli perforin ve granzim denen 2 adet enzimleri bulunmaktadır. Bu enzimler hedef hücrede öncelikle porlar oluşturup daha sonra proteaz işlevleri ile hücreyi parçalarlar. Doğal öldürücü hücreler allojenik olmayan hücrelere karşı etkin değildirler. Ancak allojenik veya semiallojenik hücreleri kolaylıkla parçalayabilirler.

Organ ve doku nakillerindeki bağışıklık yanıtta ve organ reddinin erken döneminde doğal öldürücü hücreler önemli görevler almaktadır. Özellikle bağışıklık sistemini baskılayan tedavi planlarının ilk hedefleri genellikle doğal öldürücü hücreler olmaktadır. Doğal öldürücü hücrelerin organ nakillerindeki etkisi üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır. Doğal öldürücü hücrelerin sayısındaki azalmanın organ reddi kinetiğini bozduğundan, aslında allograft dokusu tarafından eksprese edilen stres ligandlarının doğal öldürücü hücreleri dolayısıyla reddi ilk başlatan neden olduğuna kadar çeşitli çalışmalar yapılmıştır (105).

İnsan uteroplasental ünitesindeki kemik iliğı kaynaklı hücreler kan dolaşımındakinden farklı olarak %65-70 oranında doğal öldürücü hücrelerinden oluşmaktadır (106). Doğal öldürücü hücrelerin özellikle gebelik öncesi endometriyumda ve gebelik süresince desiduada yoğun olarak bulunması implantasyon ve gebeliğın devamı konusunda doğal öldürücü hücrelerinin yadsınamaz bir yeri olduğunu göstermektedir. İmplantasyon başarısızlıkları, tekrarlayan gebelik kabı olan hastalarda doğal öldürücü hücre sayı ve işlevlerinin farklılıklar göstermesi bize açıklanamayan infertilitede endometriyum doğal öldürücü hücre durumunun doğurgan hastalara göre farklı olabileceğini düşündürmektedir. İnsan blastokist implantasyonlarının yaklaşık yarısı gebelik kaybı ile sonuçlanır. Bir çok farklı sebep örneğın embriyonun genetik veya metabolik anormallikleri dahil olmak üzere bu kayıba katkıda bulunabilir (107).

Ayrıca bu erken gebelik kaybı ve implantasyon başarısızlığına kötü endometriyal reseptivite ve semiallojenik fetusa bağışıklık toleransında bozulmanın sebep olduğu düşünülebilir.

Normal devam eden gebeliklerde kazanılmış ve doğal bağışıklık yanıtının embriyo tarafından baskılandığını gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur (108).

Bu bağışıklık toleransının sebebi desidual lökosit popülasyonundaki değişiklikler olabilir. İnsan desiduasında %60-70 oranında desidual doğal öldürücü hücreleri bulunurken, bunun yanında %10-20 oranında MHC sınıf 2 antijen sunan hücreler ve az oranda da T hücreleri bulunmaktadır (58). Antijen sunan hücrelerin önemli bir kısmını dendritik hücreler oluşturmaktadır.

Dendritik hücreler doğuştan ve edinilmiş bağışıklık sistemi cevabını başlatabilen ve uyumunu denetleyen heterojen hücrelerden oluşmaktadır. Dendritik hücrelerin sorumluluk alanı sadece birincil bağışıklık yanıtı ile sınırlıdır. Ayrıca bağışıklık toleransında da önemli rolleri olan hücrelerdir (56). Bu hücrelerin işlevleri ve farklılaşma dereceleri kendi çevrelerindeki kemokin ve sitokinlerle düzenlenir (57).

Literatürdeki çalışmalar gebe ve gebe olmayan insan uterusunda dendritik hücrelerin bulunabildiğini göstermektedir (58).

Dendritik hücreler implantasyon döneminde birikmeye başlayıp gebeliğin sonuna kadar desiduada bulunmaya devam ederler (58,59). Ancak, uterus dendritik hücrelerinin anatomik yeri, görünüşü ve en önemlisi de gebelik ve implantasyon üzerindeki işlevleri açısından hala sınırlı sayıda bilgi mevcuttur.

Uterus dendritik hücrelerin azalması, bozulmuş çoğalma, farklılaşma ve uygunsuz anjiogenesis ile karakterize damarsal yapılanmayı beraberinde getirir.

Collins ve arkadaşlarının gebe fare uterusunda yaptığı çalışmalar desiduada dendritik hücrelerin azalmasının embriyo kaybı ve implantasyon başarısızlığında önemli olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmada maternal desidual hücre işlevlerindeki azalmanın fetomaternal intoleransı da beraberinde getirdiğini, ancak azalmanın uterus dışına göç veya uterin lenf nodlarında birikme ile açıklanamadığı sonucuna varmışlardır (109).

Endometriyum insanda farklı görevleri olan farklı hücrelerden oluşur (gland, stroma, fibroblastlar, endotelyal hücreler, lenfoid hücreler, düz kas hücreleri). Endometriyumun bu karmaşık yapısı şüphe yok ki hücre dağılımına, hücre trafiğine ve hücreler arası iletişime katkıda bulunan farklı hücrelerin düzenlenişini sağlayan adezyon moleküllerinin varlığını gerektirir (110,111).

İnsan endometriyumunda, luteal fazda implantasyon penceresi dönemiyle başlayıp gebelikte de devam eden, implantasyon ve gebeliğin devamına yönelik değişiklikler olmaktadır. Bu değişiklikler içinde hücre-hücre ve hücrelerle hücre dışı matriks arasındaki etkileşimleri hücre adezyon molekülleri sayesinde olmaktadır. Kadherin kalsiyum bağımlı hücre-hücre aracılı transmembran adhezyon molekülüdür. E-kadherin ektoderm veya endoderm kaynaklı çağılan tüm epitelyal hücrelerde eksprese edilir (112).

Kadherinin on taneden fazla alt grubu mevcuttur. E-(epitelyal), N-(nöral), P (plasental) kadherin başlıca tipleridir. E-kadherin epitelyal hücreler arasında adhezyon oluşmasında ve onları bir arada tutmada anahtar role sahiptir (113). E-kadherin homojenik tipte bağlanma göstermektedir, yani bu molekülü yüzeyinde taşıyan iki hücre birbirine bağlanmaktadır (114). Kadherin epitelyal hücrelerde hücreler arası birleşimin sağlanmasında çoğu organda ana role sahiptir. E-kadherin ve onun mRNA' sı periimplantasyon fazında endometriyumda eksprese olur (115).

Fujimoto ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada E-kadherin, α ve β -katenin mRNA'sının insan proliferatif endometriyumundaki düzeyi sekretuar fazla karşılaştırıldığında anlamlı şekilde düşük olduğu bulunmuş, endometriumun adheziv işlevinin ovulasyon sonrası aktive olduğu sonucuna varılmıştır (116).

Ayrıca MacCalman ve arkadaşlarının, kadherin-6 yaptığı bir çalışmada E-kadherin-11'in menstrüel siklus boyunca endometriyal stromada değişken şekilde eksprese olduğu ve en yüksek kadherin-11 mRNA düzeyinin erken gebelik desiduasında gözleendiği, fakat termde azaldığı ileri sürülmüştür. Bu çalışmada plasentada kadherin-11'in sinsityotrofoblast ve ekstravillöz sitotrofoblast sütunlarında eksprese olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, kadherin-6 yüksek derece invazif ekstravillöz sitotrofoblastlarda predominant kadherin alt tipi olarak bulunmaktadır. Kadherin-11 ve kadherin-6'nın insan endometriyumu ve plasentasının dönüşüm ve yapılanmasında merkezi rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (117).

Ayrıca yine Feinberg ve arkadaşları, endometriyal $\alpha 4 \beta 1$ integrinlerin trofoblastik dokuyu tanıma sürecine katılabileceği ve onkofetal fibronektin için reseptör rolü gösterebileceğini göstermişlerdir (118).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Endometriyumdaki implantasyon başarısızlığına ve dolayısıyla da infertiliteye yol açması muhtemel yerel bağışıklık durumunun ve bu duruma etki eden faktörlerin araştırılması amacıyla bu çalışmayı planladık. Yapılan temel infertilite değerlendirme testleri sonucu bir sorun saptanamamış en az bir yıllık infertilitesi olan, en az üç kez gonadotropinlerle ovulasyon indüksiyonu ve intrauterin inseminasyon yapılmış ve buna rağmen gebe kalamamış hastalar açıklanamayan infertilite grubunu oluşturdu. Kontrol grubumuzu ise fertilitte sorunu olmayan en az üç yaşayan çocuğu olan özgeçmişlerinde başarısız implantasyonu düşündürecek öyküleri olmayan kadınlardan oluşturduk. Bu iki grubun endometriyum biopsilerini akım sitometrisi ile uterus lenfositleri açısından karşılaştırdık.

Karşılaştırılan gruplar arasında endometriyumun histolojik günlemesi, yaş, vücut kitle indeksi, troid fonksiyon testleri, FSH, LH, E2, progesteron düzeyleri, antral folikül sayıları açısından anlamlı istatistiksel fark bulunmamıştır.

Çalışmamızın temel amacı implantasyon başarısızlığına neden olabilecek birçok bilinmeyenli değişkenler arasında endometriyum bağışıklık çevresinin önemli bir ayağını oluşturan uterus lenfosit topluluğunun açıklanamayan infertilitesi olan hastalar ile doğurgan kadınlar arasında farklı olup olmadığıydı. Çünkü, anlamlı farklılıklar bize endometriyal bağışıklık çevresinin değiştirilmesinin hastaların doğurganlığını arttırıcı tedavilere olanak sağlaması açısından yol gösterici olabilecekti. Çalışma sonucunda CD 16 + hücre yüzdesinin açıklanamayan infertilite grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak fazla olması bu hastalardaki endometriyum sitotoksik aktivitesinin fazla olmasına ve infertilite sebebini açıklamada yol gösterici olabilir. Ayrıca, açıklanamayan infertilite grubundaki CD103+ ($\alpha_E\beta_7$) hücre yüzdesinin az olması, CD 103 ($\alpha_E\beta_7$) molekülünün dendritik hücre ve T lenfositler için E-kadherin bağlanma noktası olduğu düşünüldüğünde bizi endometriyal dendritik hücre tutunmasında bir anormallik olduğu sonucuna götürebilir. Çünkü, birçok çalışma bize özellikle implantasyon penceresinde endometriyal dendritik hücre azalmasının implantasyon başarısızlığı ile ilişkili

olduğunu göstermiştir. Bu bağlamda CD103+ ($\alpha\beta_7$) hücre yüzdesinin açıklanamayan infertilite grubunda azalması bu hastalardaki infertilitenin nedenlerinden birisi olabilir.

7. ÖZET

Açıklanamayan infertilitesi olan hastaların endometriyumlarında doğal öldürücü hücre yoğunluğunun değerlendirilmesi.

01/02/2009-05/03/2010 tarihleri arasında 34 kadın çalışmaya dahil edildi. Çalışma grubundaki 22 kadın açıklanamayan infertilitesi olan ve en az üç kez gonadotropinlerle ovulasyon indüksiyonu yapılmasına rağmen gebe kalamamış hastalardan seçildi. Kontrol grubundaki 12 kadın ise en az 3 yaşayan çocuğu olan, özgeçmişlerinde kötü obstetrik öyküsü, kendiliğinden düşük ve başarısız implantasyonu düşündüren gebelik geçmişi olmayan, hastanemize rahim içi araç uygulaması için başvuran gönüllüler arasından seçildi. Açıklanamayan infertilite tanımı en az 1 yıllık düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebe kalamamış ve yapılan temel infertilite değerlendirme testlerinde bir sorun saptanmamış hastalar olarak kabul edildi. Açıklanamayan infertilitesi olan grup olarak yapılan temel infertilite değerlendirme testlerinde ovulasyonun normal olduğunu gösteren laboratuvar testleri, tubal pasajın ve endometriyum kavitesinin düzenli olduğunu gösteren histerosalpingografi ve normal sperm parametreleri olan erkek faktörü dışlanmış hastalardan seçildi. Hastaların hepsinde en az 3 kez gonadotropinlerle ovulasyon indüksiyonu ve ardından intra uterin inseminasyon uygulanmasına rağmen gebelik elde edilememişti. Hastaların adet dönemlerinin üçüncü günü bakılan antral folikül sayıları ortalaması sol over için 6, sağ over için 7 olarak tespit edildi. Ayrıca, hastaların bakılan bazal hormon düzeylerinden FSH, LH, E2 ve prolaktin seviyelerinde anormallik saptanmadı. Endometriyum örnekleme steril karman kanül ve şırınga ile siklusun 20-24 günlerine denk gelen midluteal dönemde, ultrasonografi ile saptanan ovulasyondan sonraki 7. günde yapıldı. Her iki gruptaki hastalardan alınan endometriyum örnekleri akım sitometrisi ile inceleme ve histolojik

günleme için ayrıldı. Histolojik inceleme ve günleme için Noyes klasifikasyonu esas alındı.

Endometriyum CD4+ hücre yüzdesinin açıklanamayan infertilite grubunda ortanca değeri 3.31 (0.11-8.97) iken kontrol grubunda 5.81 (3.12-13.95) olarak tespit edilmiştir. Açıklanamayan infertilite grubunda endometriyum CD4+ hücre yüzdesi istatistiksel açıdan kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0.02). İki grup CD4/CD8 oranları karşılaştırıldığında ise açıklanamayan infertilite grubunda CD4/CD8 oranı median değeri 0.42 (0.05-8.00) iken, kontrol grubunda 0.76 (0.5-2.80) olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda CD4/CD8 oranı istatistiksel açıdan anlamlı olarak açıklanamayan infertilite grubundan daha düşük saptanmıştır (p=0.016). Çalışmamızda endometriyum CD103+ hücre yüzdeleri açısından karşılaştırıldığında açıklanamayan infertilite grubunda ortanca değeri 4.40 (0.10-24.06) bulunurken kontrol grubunda 6.73 (2.83-15.46) olarak tespit edilmiştir. CD103+ ortanca değeri kontrol grubunda, açıklanamayan infertilite grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p=0.02). Endometriyum CD16+ hücre yüzdesi açısından açıklanamayan infertilite grubunun ortanca değeri 0.12 (0.001-4.64) iken kontrol grubunda 0.001 (0.001-0.68) olarak saptanmıştır. Bu değerler açısından kontrol grubunun ortanca değeri açıklanamayan infertilite grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur (p=0.01).

Sonuç olarak, CD 16 + hücre yüzdesinin açıklanamayan infertilite grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak fazla olması bu hastalardaki endometriyumdaki sitotoksik aktivitenin fazla olmasına ve infertilite sebebini açıklamada yol gösterici olabilir. Ayrıca, açıklanamayan infertilite grubundaki CD103+ ($\alpha\text{E}\beta\text{7}$) hücre yüzdesinin az olması, CD 103 ($\alpha\text{E}\beta\text{7}$) molekülünün dendritik hücre ve T lenfositler için E-kadherin bağlanma noktası olduğu düşünüldüğünde bizi endometriyal dendritik hücre tutunmasında bir anormallik olduğu sonucuna götürebilir. Çünkü, birçok çalışma bize özellikle implantasyon penceresinde endometriyal dendritik hücre azalmasının implantasyon başarısızlığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu bağlamda CD103+ ($\alpha\text{E}\beta\text{7}$) hücre yüzdesinin açıklanamayan infertilite grubunda azalması bu hastalardaki infertilitenin nedenlerinden birisi olabilir.

Anahtar kelimeler: Açıklanamayan infertilite, doğal öldürücü hücre, integrin $\alpha\text{E}\beta_7$

8- ABSTRACT

Evaluating natural killer cell density in endometrium of patients with unexplained infertility. Between the dates 01.02.2009-05.03.2009 34 women were included for the study. 22 women with unexplained infertility without any pregnancy outcome despite induction of ovulation at least 3 times with gonadotropines were chosen for the study group. 12 women who have at least 3 live births and don't have any spontan abortion or implantation failure were chosen from the volunteers requesting to the hospital for intrauterin device aplication. The patients who have normal results for infertility tests and don't have any pregnancy outcome despite regular sexual relation for at least a year were defined as unexplained infertility. The unexplained infertility group was chosen from the patients who have normal blood parameters for ovulation functions, normal hysterosalpingography findings for tubal passage and endometrial cavity and normal spermiogram without male factor. Non of the patients had a pregnancy outcome despite 3 times intrauterin insemination after induction of ovulation with gonadotropines. The number of follicules in the third day of menstruation period were 6 for left over and 7 for right over. Also FSH, LH, E2 and prolactin levels were normal. Endometrial sampling was made with sterile karman cannula between the 20-24 th days of menstruation period defined as midluteal term after 7 days of ovulation examined with ultrasonography. The endometrial samples from each 2 groups were saved for flow cytometry and histological dating. Noyes clasification was used for histological exam and dating. The mean value of CD4+ cell ratio in endometrium for unexplained infertility group was 3.31 (0.11-8.97) and for control group it was 5.81 (3.12-13.95). CD4+ cell ratio of unexplained infertility group was statisticly higher than control group ($p=0.02$). To compare CD4/CD8 ratios for both 2 groups the mean value for unexplained infertility group was 0.42 (0.05-8.00) and the mean value for control group was 0.76 (0.5-2.80). CD4/CD8 ratio of control group was statisticly higher than unexplained infertility group ($p=0.016$). The mean values of CD103+ cell ratios in endometrium was 4.40 (0.1-

24.06) for unexplained infertility group and 6.73 (2.83-15.46) for control group. The mean value of CD103+ cells was statistically higher in control group ($p=0.02$). The mean value of CD 16+ cell ratio in endometrium was 0.12 (0.001-4.64) for unexplained infertility group and 0.001 (0.001-0.68) for control group. For CD16+ the mean value of control group was statistically lower than unexplained infertility group ($p=0.01$). As a result, higher levels of CD16+ cells in unexplained infertility group can explain infertility with more cytotoxic activity in these patients. Lower levels of CD103+ in unexplained infertility group can explain a dendritic cell connection failure so that CD103 is a connection point for e-cadherin in dendritic cells and T lymphocytes. Because many research results show that decrease of dendritic cells especially in implantation window is related with implantation failure. So that lower levels of CD103+ cells in unexplained infertility group can explain a reason for infertility of these patients.

Key words: Unexplained infertility, natural killer cell, integrin ($\alpha_E\beta_7$)

9-KAYNAKLAR

1. Fazlı Demirtürk, Ahmet Cantuğ Çalışkan. Kadın İnfertilitesi. In: Leon Speroff ve Marc A.Fritz. Çeviri editörleri: Ahmet Erk, Serdar Günalp, ed. *Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite*, İstanbul, yedinci baskı, Güneş Kitapevi, 2007, 1013-1067.
2. Moghissi K. Infertility Evaluation-targeting the work up and management. *Women's Health in primary care* Mar 2002; **5**(3): 155-167
3. Fukui A, Fujii S, Yamaguchi E, Kimura H, Sato S, Saito Y. Natural killer cell subpopulations and cytotoxicity for infertile patients undergoing in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol* 1999; **41**:413-422.
4. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, authors. Optimal evaluation of the infertile female. *Fertil Steril*. 2006; **86** (5 suppl):264-267.
5. Penzias AS. Subfertility, fecundability, and the impact of laparoscopy on conception rates. *Fertil Steril* 2005; **84**(6):1579-80.
6. Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J. Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. *Fertil Steril* 2003; **79**(3):577-84.
7. Rev Obstet Gynecol. *Spring* 2008; **1**(2): 69-76.
8. Malcolm CE, Cumming DC. Does anovulation exist in eumenorrheic women? *Obstet Gynecol*. 2003; **102**:317-318.
9. Exacoustos C, Zupi E, Carusotti C, et al. Hysterosalpingo-contrast sonography compared with hysterosalpingography and laparoscopic dye pertubation to evaluate tubal patency. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*. 2003; **10**:367-372.
10. Pabuçcu R. *Diagnostik ve operatif histeroskopi*. Ankara, Atlas kitapçılık. 2002: 75-88.
11. Berzofsky JA. İnimmunogenecity and antigenecity. Austen KF. Frank MM. AtkinsonJP. Cantor H (eds): *Samter's Immunologic Diseases*. Lippincott, Wüliams and Wilkins, USA,2001: 65-82.

12. Delves PJ, Roitt M. The immune system (First part). *N Engl J Med* 2000; **343**(1):37-49.
13. Goodman JW: The immune response. Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds): *Basic and Clinical Immunology*. Lange, Lebanon, 1994: 40-49.
14. Von Andrian UH, Mackay CR. T cell function and migration, *N Engl J Med* 2000; **43**(14): 1020-1034.
15. Roitt I, Brostoff J, Male D (eds): *Immunology*. Mosby, Spain, 2001, .173-189.
16. Medzhitov R, Janeway C. 2000 Innate immunity. *N Engl J Med*; **343**(5):338-344.
17. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. (Second part). *N Engl J Med* 2000;**343**(2):108-117.
18. Andreoli TE, Carpenter CCJ, Bennet JC, Plum F. *Cecil Essentials of Medicine*. 4th Ed., W.B. Saunders Company / Nobel Tıp Kitabevleri, 2000.
19. Quenby S, Farquharson R. Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online*. 2006; **13**(1):24-8.
20. Tuckerman E, Laird SM, Prakash A, Li TC. Prognostic value of the measurement of uterine natural killer cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2007; **22**(8): 2208-13.
21. Abbas AK, Lichtman Ali, Pober JS (eds): *Cellular and Molecular Immunology*. W.B.Saunders, Philadelphia, 2000, 4-12.
22. Chavez DJ. Cellular aspects of implantation. in van Blerkam, Motta PJ *Ultrastructure of Reproduction*. *The Hague, martinus Nijhoff* 1984;247–259.
23. Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online* 2003; **7**: 151–161.
24. Paria BC, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 2002; **296**:2185–2188.
25. Critchley HO. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online* 2003; **7**: 151–161.

26. Akbas GE. HOXC and HOXD gene expression in human endometrium: lack of redundancy with HOXA paralogs. *Biol Reprod* 2004; **70**: 39–45.
27. Dey SK Implantation. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, eds. *Reproductive endocrinology, surgery and technology*. 1996 New York: Lippincott-Raven; 421–434.
28. Popovici RM, Giudice LC. Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology* 2000; **141**:3510–3513.
29. Giudice L. Microarray expression profiling reveals candidate genes for human uterine receptivity. *Am J Pharmacogenomics* 2004; **4**: 299-312.
30. Thellin O, Coumans B, Zorzi W, et al. Tolerance to The foeto-placental ‘graft’: ten ways to support a child for nine months. *Curr. Opin. Immunol.* 2000;**12**: 731-737.
31. Sarzotti M, Robbins DS, Hoffman PM. Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science* 1996;**271**:1726-1728.
32. Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T, et al. Changes in T, B and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1997;**37**: 368-377.
33. Cairo MS. Neonatal neutrophil host defense. *Am J Dis Child* 1989;**143**: 40-47.
34. Erlebaher A. Why isn't the fetus rejected? *Current Opin Immunol* 2001; **13**: 590-596.
35. Carosella EG, Dausset J, Kirszenbaum M. HLA-G revisited. *Immunol Today* 1996;**17**: 407-409.
36. Pazmany L, Mandelboim O, Vales-Gomes M et al. Protection from natural killer cell mediated lysis by HLA-G expression on target celi. *Science* 1996;792-793.
37. Harbour DV, Blalock JE. Lymphocytes and lymphocytic hormones pregnancy. *Prog Neuro Endocr Immunol* 1989;**2**: 55-63.
38. Siiteri P.K, Stites, D.P. Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy. *Biol. Reprod.* 1982;**26**: 1-14.

39. Szekeros-Bartho, J. Autran B, Debre P. Andreu, et al Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell. Immunol.* 1989; **122**:281–294.
40. Szekeros-Bartho J, Wegmann T.G, A progesterone dependent immunomodulatory protein alters The Th1/Th2 balance. *J. Reprod. Immunol.* 1996; **31**: 81–95.
41. Bulmer J.N, Morrison L, Longfellow D. et al. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies.. *Hum.Reprod.* 1991; **6**:791–798.
42. Kodama T, Hara T, Okamoto E, et al. Characteristic changes of large granular lymphocytes That strongly express CD56 in endometrium during The menstrual cycle and early pregnancy. *Hum. Reprod.* 1998; **13**:1036–1043.
43. Ritson A, Bulmer J. Endometrial granulocytes in human decidua react with a natural-killer (NK) cell marker, NKH1. *Immunology* 1987; **62**:329-331.
44. Starkey P, M., Sargent, I.L. and Redman, C.W. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by Flow cytometry. *Immunology* 1988; **65**: 129-134.
45. Kin, A, Wellings V, Gardner L. and Loke Y.W. Immunocytochemical characterization of The unusual large granular lymphocytes in human endometrium Throughout The menstrual cycle. *Hum. Immunol.* 1989; **24**: 195-205.
46. Nagler A, Lanier L, Cwirla S. Phillips J.H. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J. Immunol.* 1989; **143**: 3183-3191.
47. Pace, D., Morrison, L. and Bulmer, J.N. Proliferative activity in endometrial stromal granulocytes Throughout menstrual cycle and early pregnancy. *J. Clin. Pathol.* 1989; **42**:35-39.

48. Henderson, T.A., Saunders, P.T., Moffet-King, A., et al. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; **88**:440-449.
49. Ferry, B.L., Starkey, P.M., Sargent, I.L., et al Cell populations in The human early pregnancy decidua: natural killer activity and response to interleukin-2 of CD56 positive large granular lymphocytes. *Immunology* 1990; **70**: 446-452.
50. Guimond, M., Wang, B. and Croy, B.A. Immune competence involving The natural killer cell lineage promotes placental growth. *Placenta* 1999; **20**: 441-450.
51. King, A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum. Reprod. Update*, 2000; **6**:28-36.
52. Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* , 1992; **359**: 76-79.
53. Kojima, K., Kanzaki, H., Iwai, M., et al Expression of leukemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in growth and differentiation of trophoblast. *Hum. Reprod.* 1995 **10**: 1907-1911.
54. Sawai, K., Matsuzaki, N., Kameda, T., et al Leukemia inhibitory factor produced at The fetomaternal interface stimulates chorionic gonadotrophin production: its possible implication during pregnancy, including implantation period. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995 **80**: 1449-1456.
55. Nachtigall, M.J., Kliman, H.J., Feinberg, R.F., et al The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: a potential role in human implantation *J. Clin. Endocrinol Metab.* 1996; **81**:801-806.
56. Steinman, R.M., Hawiger, D., Nussenzweig, M.C. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**: 685-711.
57. Mowat, A.M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:331-341.

58. . Kammerer, U. 2005. Antigen-presenting cells in the decidua. *Chem. Immunol. Allergy*. **89**:96-104
59. Zarnani, A.H., Moazzeni, S.M., Shokri, F., Salehnia, M., Jeddi-Tehrani, M. 2007. Kinetics of murine decidual dendritic cells. *Reproduction*. **133**:275-283.
60. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA 2001 The biology of human natural killer cell subsets. *Trends Immunol* **22**:633–640.
61. Yovel G, Shakhar K, Ben-Eliyau S. The effects of sex, menstrual cycle, and oral contraceptives on the number and activity of natural killer cells. *Gynecol Oncol* 2001; **81**:254-262.
62. Beer AE, Kwak JY, Ruiz JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol* 1996; **35**:376-382.
63. Sorachi K, Kumagai S, Sugita M, Yodoi J, Imura H. Enhancing effect of 17 β -estradiol on human NK cell activity. *Immunol Lett* 1993; **36**:31-5.
64. Szekeres- Bartho J, Hadnagy J, Pasca AS. The suppressive effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: unique progesterone sensitivity of pregnancy lymphocytes. *J Reprod Immunol* 1985; **7**:105-110.
65. Matera L, Cesano A, Bellone G, Oberholtzer E. Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. *Brain Behav Immun* 1992; **6**:409-417.
66. Gregory CD, Lee H, Rees GB, Scott IV, Shah LP, Golding PR 1985 Natural killer cells in normal pregnancy: analysis using monoclonal antibodies and single-cell cytotoxicity assays. *Clin Exp Immunol* **62**:121–127.
67. Gregory CD, Lee H, Scott IV, Golding PR 1987 Phenotypic heterogeneity and recycling capacity of natural killer cells in normal human pregnancy. *J Reprod Immunol* **11**: 135–145.
68. Ponte M, Cantoni C, Biassoni R, Tradori-Cappai A, Bentivoglio G, Vitale C Bertone S, Moretta A, Moretta L, Mingari MC 1999 Inhibitory receptors sensing HLA G1 molecules in pregnancy: decidua- associated

natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5674–5679.

69. Trundley A, Moffett A 2004 Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 63:1–12.
70. Avigan D. Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy. *Blood Rev.* 1999 Mar;**13**(1):51-64.
71. Rescigno M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells at the end of the millennium. *ImmunolbCell Biol.* 1999 Oct;**77**(5):404-10.
72. Di Nicola M, Lemoli RM. Dendritic cells: specialized antigen presenting cells. *Haematologica.* 2000 Feb;**85**(2):202-7.
73. Freemont AJ. Adhesion molecules. *J Mol Pathol Clin Pathol* 1998; **51**: 175-84.
74. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; **76**: 301-14.
75. Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: Functions of Integrins, Cadherins, Selectins and Immunoglobulin Superfamily Members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; **42**: 283-323.
76. Kebudi R, Ayan I, Yasasever V, Akıcı F, Görgün Ö. Kanserli çocuklarda hücre adezyon moleküllerinden ICAM-1 ve CD-44'ün serum düzeyleri. *Türk Hematoloji- Onkoloji Dergisi* 2000; **10**(1): 26-32.
77. Wiedle G, Dunon D, Imhof BA. Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001; **38**(1): 1-31.
78. Makagiansar HY, Anderson ME, Yakovleva TV, Murray SJ, Siahaan JT. Inhibition of LFA-1/ ICAM-1 and VLA-4/ VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev* 2002; **22**: 146-67.
79. González AR, Díaz GF, Sánchez MF. Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs* 1998; **56**: 977-88.
80. Mc Gill NS, Ahmed AN, Christou VN. Endothelial cells: Role in infection and inflammation. *World J Surg* 1998; **22**: 171-8.

81. Kerr JR. Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1999; **52**: 220-30.
82. Parkes JR, Hart LS. Adhesion molecules and gene transfer. *Adv. Drug Deliv Rev* 2000; **44**: 135-52.
83. Lavelle CE. Targeted delivery of drugs to the gastrointestinal tract. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2001; **18**(4): 341-86.
84. McEver RP. Selectins. *Curr Opin Immunol* 1994; **6**: 75-84.
85. Rosen SD, Bertozzi CR. The selectins and their ligands. *Current Opin Cell Biol* 1994; **6**: 663- 673.
86. González AR, Sánchez MF. Cell adhesion molecules: Selectins and integrins. *Crit Rev Immunol* 1999; **19**: 389- 429.
87. Stein JV, Cheng G, Stockton BM, Fors BP, Butcher EC, von Adrian UH. L-Selectin mediated leucocyte adhesion in vivo, microvillous distribution determines tethering efficiency, but not rolling velocity. *J Exp Med* 1999; **189**: 37- 49.
88. Werb Z, Yan Y. A cellular striptease act. *Science* 1998; **282**: 1279- 80.
89. Díaz GF, González AI, Campanero MR, Mollinedo F, del Pozo MA, Muñoz C, Pivel JP et al. Prevention of in vitro neutrophil- endothelial attachment through shedding of Lselectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Invest* 1995; **95**: 1756-65.
90. Dong ZM, Jackson L, Murphy JW. Mechanisms for induction of L-selectin loss from T lymphocytes by a cryptococcal polysaccharide glucuronoxylomannan. *Infect Immunol* 1999; **67**: 220- 229.
91. Janeway AC, Travers P, Walport M, Capra DJ. T-cell mediated immunity. In: *Immunobiology The Immun System in Health and Disease*, 4th ed. London: Current Biology Publications, 1999: 263- 305.
92. Flier van der A. Sonnenberg. Functions and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 2001; **305**: 285-98.
93. Hynes R. Integrins, versality, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; **69**: 11-25.
94. Coppelino GM, Dedhar S. Bidirectional signal transduction by integrin receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; **32**: 171-188.

95. Milner R, Champbell LI. The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. *J Neurosci Res* 2001; **69**: 286-91.
96. Werr J, Xie X, Hedquist P, Ruoslahti E, Lindbom L. α 1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue in vivo. *J Exp Med* 1998; **187**: 2091-6.
97. Robertson M. Cell junctions, cell adhesion and the extracellular matrix. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*, 3th ed. New York: Garland Publishing, 1994: 949-1011.
98. Noyes RW, Haman JO: Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1953; **4**:504–517.
99. Nishikawa K, Saito S, Morii T, Hamada K, Ako H, Narita N, Ichijo M, Kurahayashi M, Sugamura K: Accumulation of CD16-CD56+ natural killer cells with high affinity interleukin 2 receptors in human early pregnancy decidua. *Int Immunol* 1991; **3**:743–750.
100. Hidetaka Kimura, Atsushi Fukui, Shunsaku Fujii, Eiji Yamaguchi, Goichiro Kasai, Hideki Mizunuma: Timed Sexual Intercourse Facilitates the Recruitment of Uterine CD56bright Natural Killer Cells in Women with Infertility. *Am J Reprod Immunol* 2009; **62**:118-124.
101. Coulam CB, Roussev RG: Correlation of NK cell activation and inhibition markers with NK cytotoxicity among women experiencing immunologic implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 2003; **20**:58–62.
102. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2003; **198**:1201–1212.
103. Lobo SC, Huang S-.J, Germeyer A, et al. The immune environment in the human endometrium during the window of implantation. *Am J Reprod Immunol* 2004; **52**:244-251.
104. Thum MY, Bhaskaran S, Abdalla HI, et al. An increase in the absolute count of CD56dimCD16+CD69+ NK cells in the peripheral blood is

associated with a poorer IVF treatment and pregnancy outcome. *Hum Reprod* 2004; **19**:2395–2400.

105. Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Baltar JM, Ortega F, Lopez-Larrea C. Potential role of NKG2D and its ligands in organ transplantation: New target for immunointervention. *Am J Transplant* 2009; **9**: 251–257.
106. Le Bouteiller P, Piccinni MP: Human NK cells in pregnant uterus: why there? *Am J Reprod Immunol* 2008; **59**:401–406.
107. Pellicer, A., et al. 1999. In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil. Steril.* **71**:1033-1039.
108. Pulendran, B. et al. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:1036-1041.
109. Mary K. Collins, Chin-Siean Tay and Adrian Erlebacher. Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice *J Clin Invest.* 2009;**119**(7):2062–2073.
110. Tabibzadeh S. Human endometrium: an active site of cytokine production and action. *Endocr Rev* 1991;**12**:272-90.
111. Wewer UM, Damjanov A, weiss J, liotta LA, Damjanov I. Mouse endometrial stromal cell produce basement-membran components. *Differentiation* 1986;**32**: 49-58.
112. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991; **251**: 1451-5.
113. Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* 1996;**77**: 1605-13.
114. Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS et al. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 1995; **374**: 327-37

115. Dawood MY, Lau M, Khan-Dawood FS. E-cadherin and its messenger ribonucleic acid in periimplantation phase human endometrium in normal and clomiphene-treated cycles. *Am J Obstet Gynecol* 1998;**178**:996-1001.
116. Fujimoto J, Ichigo S, Hori M, Tamaya T. Alteration of E-cadherin, alpha- and beta-catenin mRNA expression in human uterine endometrium during the menstrual cycle. *Gynecol Endocrinol* 1996;**10**: 187-91.
117. MacCalman CD, Getsios S, Chen GT. Type 2 cadherins in the human endometrium and placenta: their putative roles in human implantation and placentation. *Am J Reprod Immunol* 1998;**39**: 96-107
118. Feinberg RF, Kliman HJ, Lockwood CJ. Is oncofetal fibronectin a trophoblast glue for human implantation? *Am J Pathol* 1991;**138**: 537-43.

10-EKLER

10.1. Katılımcı Bilgilendirme Formu

- 1. Çalışmanın adı:** Açıklanamayan infertilitesi olan hastaların endometriyumlarında doğal öldürücü hücre yoğunluğunun değerlendirilmesi.
- 2. Araştırmacıların adları, kurumları ve iletişim numaraları.**

	<i>Adı ve Unvanı</i>	<i>Bölümü</i>	<i>Dahili Telefonu</i>	<i>E-posta adresi</i>
<i>Sorumlu araştırmacı</i>	Arş.Gör.Dr . Sertan Aksu	Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	3038433	sertanaksu@yahoo.com
<i>Danışman</i>	Doç.Dr. Eray Çalışkan	Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	3037142	dreraycaliskan@yahoo.com
<i>Bilimsel Destek Sağlayan Araştırmacılar</i>	Prof. Dr. Erdal Karaöz	KÖGEM	3038586	ekaraoz@hotmail.com
	Yard. Doç.Dr. Gülçin Gacar	KÖGEM	3038586	

- 3. Araştırma amacının anlaşılır ve özet açıklaması:** Rahim içi zarında bulunan bağışıklık sistemi hücrelerinin gebelik sahibi olma üzerine etkisini araştırmak.
- 4. Neden ben seçildim?** Sizin gibi açıklanamayan infertilite hastalığı bulunan bazı kişilerde bu duruma sebep olarak bağışıklık sistemi kaynaklı birtakım hücreler sorumlu tutulmaktadır. Bu hücrelerin rahim içi zarına tutunan embriyoya zarar verdiği düşünülmektedir. Bu yüzden bu çalışmanın size ve sizin durumunuzdaki diğer hastalara faydalı olacağını düşünmekteyiz.

- 5. Araştırmaya katılmak / bir kez katıldıktan sonra sonuna kadar devam etmek zorunda mıyım?** Araştırmamıza katılma mecburiyetiniz kesinlikle yoktur. Bir kez katılmaya karar verip daha sonra vazgeçmeye karar verirseniz araştırma dışı bırakılacaksınız ve sizinle ilgili bütün veriler bilginiz dahilinde imha edilecektir
- 6. Katılmayı kabul edersem bana ne yapılacak?** Araştırma amaçlı hiçbir uygulama yapılmayacaktır. Tedaviniz için gerekli olan, adet döneminizin 2. yarısında yumurtlama olup olmadığının kesin tespiti için rahim içinden örnek doku alınacak. Bu örnek dokudan bir miktar da araştırma için kullanılacaktır.
- 7. Araştırmaya katılmanın olası zararları ve riskleri nelerdir?** Bu çalışmanın herhangi bir zararı yoktur. Sadece rahim iç duvarından sıvı/doku alınırken geçen süre olan 1 dakika içinde adet ağrısı hissedebilirsiniz. Günümüzde rutinde kullanılan yöntemler size uygulanacaktır ve bu uygulamaların her aşamasında sizin onayınız alınacaktır.
- 8. Araştırmaya katılmanın olası yararları nelerdir?** Araştırma sonucu elde edilecek sonuçlarla sizde tespit ettiğimiz ve gebe kalmanıza engel olabilecek bağışıklık sistemi sorunlarını belirlememize ve sizin için daha uygun tedavi yöntemleri belirlememize yardımcı olabilecektir.
- 9. Araştırma masrafları:** Bu araştırma size herhangi bir maddi yük getirmeyecektir.
- 10. Araştırmada ters giden bir şey olursa?** Konuyla ilgili derhal bilgilendirilecek ve araştırma bilginiz dahilinde sonlandırılacaktır.
- 11. (Tedavi edici araştırmalarda) Alternatif tedavi/tanı yöntemleri nelerdir?** Yok.
- 12. Kimlik bilgilerim ve elde edilen verilerin gizliliği nasıl sağlanacak?** Veriler sadece sorumlu hekimin ulaşabileceği gizli bir dolapta saklanacaktır. Çalışma sonuçları bilim dünyasıyla paylaşılırken kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır.
- 13. Araştırma sonunda bana bilgi verilecek mi?** Araştırmanın sizinle ilgili bütün sonuçları hakkında bilgilendirileceksiniz. Genetik test sonucu size verilecektir.
- 14. Araştırma sonuçlarına ne olacak?** Araştırma sonuçları (kimlik bilgileriniz saklı olacak şekilde) bilimsel yayın olarak değerlendirilecek ve yeni tanı ve tedavi metotları bulma yolunda bize yardımcı olacaktır.
- 15. Daha ayrıntılı bilgi için Doç. Dr. Eray Çalışkan'a 0262 3037142 no'lu telefondan ya da dreraycaliskan@yahoo.com adresinden ulaşabilirsiniz.**
- 16. Teşekkür:** Bu çalışmaya katılımınız ve desteğinizden dolayı çok teşekkür ederim.
- 17. İAEK onayı:** Bu araştırma Kocaeli Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından değerlendirip uygun bulunmuştur.

18. Şikâyet için başvuru adresi verilmelidir; Bu araştırma Kocaeli Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Araştırmaya katılımınız ile ilgili herhangi bir şikayetiniz varsa Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı Başkanı Prof Dr. Nermin Ersoy (0262 3038121) vasıtasıyla ulaşabilirsiniz. Her tür şikayetiniz gizlilikle değerlendirilecek, araştırılacak ve sonuç hakkında tarafınıza bilgi verilecektir

10.2. Onam Formu

Araştırmanın Adı: Açıklanamayan infertilitesi olan hastaların endometriyumlarında doğal öldürücü hücre yoğunluğunun değerlendirilmesi.

	Evet	Hayır
Hasta Bilgilendirme Formunu okudunuz mu?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Araştırma projesi size sözlü olarak da anlatıldı mı?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Size araştırmayla ilgili soru sorma, tartışma fırsatı tanındı mı?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sorduğunuz tüm sorulara tatmin edici yanıtlar alabildiniz mi?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Araştırma hakkında yeterli bilgi aldınız mı?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Herhangi bir zamanda herhangi bir nedenle ya da neden göstermeksizin araştırmadan çekilme hakkına sahip olduğunuzu anladınız mı?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Araştırma sonuçlarının uygun bir yolla yayınlanacağına katılıyor musunuz?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yukarıdaki soruların yanıtları size kim tarafından açıklandı? <i>Lütfen ismini yazınız....</i>		

İmza:

Adı / Soyadı:

Tarih:

10.2. Veri Toplama Formu

Hastanın Adı-Soyadı: Dosya No: Telefonları

Yaş: Boy: Kilo: VKİ: Meslek:

İnfertilite tipi: 1. Primer 2. Sekonder İnfertilite süresi (ay):

Önceki tedaviler ve sayıları: CC CC+IUI Gonadotropin Gonadotropin+IUI
IVF-ICSI

G P A DC Y EXU

Diabet: 0- yok 1. Tip I 2. Tip II 3. İnsülin direnci
AKŞ:

Hipertansiyon: 0-yok 1-var

HSG: 0-normal 1. tek tüp tıkalı 2. bilateral tıkalı HS/SİS kavite: 1. normal 2. diğer
açık:

LS/LT: 0- yok 1. normal 2. Salpenjektomi 3. Kistektomi 4. Myomektomi 5.
Adezyoliz 6. diag

Hidrosalpenks: 0- yok 1. unilateral 2. Bilateral Adezyon derecesi

Endometriozis: 0-yok 1. Varsa evresi: Endometrioma: 0-yok 1. ünilateral 2.
bilateral

Endometrioma operasyonu: 0-yok 1. var Polipektomi: 0-yok 1. var

Sagda endometrioma: 0- yok 1. varsa boyut ve sayı:

Solda endometrioma 0-yok 1. varsa boyut ve sayı

Uterus anomalisi 0-yok 1. var açık: septum rezeksiyonu: 0- yok 1. var

Bazal hormon: FSH: LH: E2: PRL: TSH:

USG: 0.normal 1. polip 2. myom 3. diğer açık:

Solda antral folikül sayısı: sağda antral folikül sayısı:

Myom: 0. yok 1. var myom lokalizasyonu: 1. submukoz 2. intramural 3. subseroz

Myom sayısı ve boyutları:

Troid hastalığı: 0. yok 1. varsa açık:

Troidektomi: 0. yok 1. subtotal 2. total troid paneli: TSH sT3: sT4:

Troid tanısı: 0. ötroid 1. hipotroid 2. subklinik hipotroidi 3. hipertroidi 4. subklinik hipertroidi

Levotron: 0. yok 1. varsa dozu: propicil: 0. yok 1. varsa dozu

HBs: 0. neg 1. poz HCV: 0. neg 1. poz Toxo: 0. neg 1. poz Rub: 0. neg 1. poz

CVS class 1 2 3 4 5 CIN: 0. Yok 1 2 3

Kültürde üreme: 0 yok 1. varsa açık:

Erkek yaşı: meslek: Kimyasal maruziyet: 0. yok 1. var

Erkek Tanı: 0. normal 1. oligospermi 2. astenospermi 3. teratospermi 4.OAT 5. Azospermi

Spermiyogram: Hacim(ml): Konsantrasyon: Mil/ ml: