

**T.C.**  
**NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ**  
**MERAM TIP FAKÜLTESİ**  
**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

**NEDENİ BİLİNMEYEN TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA**  
**PERİFERİK NATURAL KİLLER HÜCRE AKTİVİTESİNİN**  
**RETROSPEKTİF ARAŞTIRILMASI**

**DR. ELNARE ALYAZOVA**  
**UZMANLIK TEZİ**

**KONYA-2021**



**T.C.**  
**NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ**  
**MERAM TIP FAKÜLTESİ**  
**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

**NEDENİ BİLİNMEYEN TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA**  
**PERİFERİK NATURAL KİLLER HÜCRE AKTİVİTESİNİN**  
**RETROSPEKTİF ARAŞTIRILMASI**

**DR. ELNARE ALYAZOVA**  
**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**PROF. DR. MEHMET CENGİZ ÇOLAKOĞLU**

**KONYA-2021**

## TEŞEKKÜR

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nde uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, en iyi şekilde yetişmem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, yakın ilgi ve desteklerini her zaman hissettiğim saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Mehmet Cengiz Çolakoğlu'na, Prof. Dr. Ali Acar'a, Prof. Dr. Hüseyin Görkemli'ye, Prof. Dr. Kazım Gezginç'e, Prof. Dr. Osman Balcı'ya, Doktor Öğretim Üyesi Emine Türen Demir'e, Doktor Öğretim Üyesi Hasan Energin'e, Doktor Öğretim Üyesi Jule Eriç Esen'e, Doktor Öğretim Üyesi Fatma Kılıç'a;

Tez çalışmamın istatistik bölümünde bana yardımcı olan perinatoloji yandal asistanı Uzm. Dr. Murat Işıkalın'a;

İhtisas sürem boyunca birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve sağlık personeline;

Son olarak her zaman yanımda olan, eğitim hayatım boyunca bana destek olan aileme;

Sonsuz teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Dr. Elnare Alyazova

## ÖZET

### NEDENİ BİLİNMEYEN TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA PERİFERİK NATURAL KİLLER HÜCRE AKTİVİTESİNİN RETROSPEKTİF ARAŞTIRILMASI

DR. ELNARE ALYAZOVA

UZMANLIK TEZİ

KONYA – 2021

**Amaç:** Periferik Natural Killer hücre aktivitesi seviyesi ve sayısındaki artışın açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı etyolojisindeki rolünü araştırmak.

**Yöntem:** Çalışmamıza Ocak 2019- Ocak 2020 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran, hiçbir düşük nedeni bulunmayan 2 veya daha fazla gebelik kaybı olan kadınlar hasta grubu olarak; 2 veya daha fazla canlı doğum yapmış, düşüğü olmayan kadınlar ise kontrol grubu olarak dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen tüm olgular hasta dosyaları taranarak geriye dönük olarak incelendi. Çalışma vaka-kontrol şeklinde yapıldı.

Natural killer (NK) hücre aktivitesi ELİSA yöntemi kullanılarak NK VUE testi ile periferik kandan çalışılmıştı. Flow sitometrik KIR yöntemi ile NK ve KIR hücrelere özgü antikorlar kullanılarak flow sitometri cihazı ile yaklaşık 100 000 hücre analiz edilerek CD16, CD56, CD8, CD158a pozitif hücrelerin miktarı belirlenmiştir. Çalışmada gruplar arasındaki periferik NK hücre ve KIR geni markerleri ve aktive NK test sonuçları karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Vaka ve kontrol grubu yaş ve gebelik sayısı açısından benzerdi. Vaka grubunda toplam 30 hasta, kontrol grubunda toplam 10 hasta vardı. Vaka grubunda hastaların yaş ortalaması  $28.2 \pm 4.4$ , kontrol grubundaysa  $30.4 \pm 2.0$ 'dir. Grupların NK aktivitesi seviyesi ortanca değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı (2145 ve 1380,  $p=0.662$ ). Grupların laboratuvar değerlerinin karşılaştırılması sonucu gruplar arasında NK aktivitesi seviyesi ve

CD16, CD56, CD8, CD158a pozitif hücrelerin ortanca değerleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

**Sonuç:** Tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan vaka grubu ve normal gebelik geçiren kontrol grubunun laboratuvar değerleri kıyaslandığında CD56+CD16+, CD56+CD16-, CD8+, CD158a+, CD158a+CD8+ ve CD158a- CD8- hücre markerleri ve NK hücre aktivitesi seviyesi için bu iki grup arasında anlamlı fark bulunamadı. Bu çalışmaya göre tekrarlayan gebelik kaybı için düşük etyolojisini açıklamada Natural Killer hücre aktivitesi seviyesi anlamlı bulunamadı. Fakat konu ile ilgili çalışmamız yeterli olmayıp ek çalışmaların yapılmasında fayda olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Natural Killer hücre aktivitesi, tekrarlayan gebelik kaybı



## ABSTRACT

### COMP

**ELNARE ALYAZOVA, MD**

**MASTER THESIS**

**KONYA – 2021**

**Objective:** To investigate the role of increased number and level of peripheral Natural Killer cell activity in the etiology of unexplained recurrent pregnancy loss.

**Materials and Methods:** As the patient group, women who applied to Necmettin Erbakan University Meram Medical Faculty Hospital Obstetrics and Gynecology Department between January 2019 and January 2020 and had 2 or more pregnancy losses without any miscarriage cause; Women who had 2 or more live births and had no miscarriage were included as the control group. All cases included in the study were reviewed retrospectively by scanning patient files. The study was done in the form of a case-control. Natural killer (NK) cell activity was studied from peripheral blood by NK VUE test using ELISA method. The amount of CD16, CD56, CD8, CD158a positive cells was determined by analyzing approximately 100 000 cells by flow cytometric KIR method using antibodies specific to NK and KIR cells. In the study, peripheral NK cell and KIR gene markers and activated NK test results were compared between the groups.

**Results:** Case and control groups were similar in terms of age and number of pregnancies. There were a total of 30 patients in the case group and a total of 10 patients in the control group. The mean age of the patients in the case group was  $28.2 \pm 4.4$  years, and  $30.4 \pm 2.0$  years in the control group. There was no significant difference between the median values of NK activity levels of the groups (2145 and 1380,  $p=0.662$ ). As a result of the comparison of the laboratory values of the groups, no significant difference was found between the levels of NK activity and the median values of CD16, CD56, CD8, CD158a positive cells ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** When the laboratory values of the case group with recurrent pregnancy loss and the control group with normal pregnancy were compared, there was a significant difference between these two groups for the level of CD56+CD16+, CD56+CD16-, CD8+, CD158a+, CD158a+CD8+ ve CD158a- CD8- cell markers and NK cell activity not found.

According to this study, the level of Natural Killer cell activity was not found to be significant in explaining the etiology of miscarriage for recurrent pregnancy loss. However, our study on the subject is not sufficient and it will be beneficial to carry out additional studies.

**Keywords:** Natural Killer cell activity, recurrent pregnancy loss



# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Teşekkür.....	I I
Özet.....	I I I
Abstract.....	V
İçindekiler.....	V I I
Tablolar , Grafikler ve şekiller listesi.....	IX
Simgeler ve kısaltmalar.....	X
<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1.Abortus.....	3
2.1.1. Genel Tanım.....	3
2.1.2. İnsidans.....	3
2.1.3. Sınıflama.....	4
2.1.4. Klinik bulgular.....	6
2.1.5. Tanı ve değerlendirme.....	7
2.1.6. Abortuslarda tedavi.....	9
2.2. Tekrarlayan gebelik kayıpları.....	10
2.3. NK hücreleri ve gebelik.....	18
2.3.1. Genel tanım.....	18.
2.3.2. Sağlıklı gebelikte NK hücrelerinin fizyolojik rolü.....	18
2.3.3. İdiyopatik tekrarlayan gebelik kayıplarında NK hücreleri.....	20
2.3.3.1. NK hücre sitokin üretimi.....	20
2.3.3.1.1. NK1 / NK2 hücreleri.....	20
2.3.3.1.2. NK22.....	21.
2.3.3.2. NK hücre aktivitesinin modülatörleri.....	22
2.3.3.2.1. Sitokin ortamı.....	22
2.3.3.2.2. NK hücre reseptörleri.....	23
2.3.3.2.2.1. NCR Reseptörleri.....	23
2.3.3.2.2.2. TIM-3.....	24

2.3.3.2.2.3. <i>KIR-HLA-C</i> .....	24
2.3.3.2.2.4. <i>Diğer reseptörler</i> .....	25
2.3.3.2.3. <i>Progesteron</i> .....	26
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>28</b>
3.1. İstatiksel analiz.....	30
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>30</b>
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>33</b>
<b>6. SONUÇ</b> .....	<b>36</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	<b>37</b>



## TABLolar VE GRAFİKLER

**Tablo 1** : Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri.

**Tablo 2** : Grupların laboratuvar sonuçlarının karşılaştırılması.

**Grafik 1** :Vaka grubu (1) ve kontrol grubu (2) CD56+16+ hücre yüzdelerinin karşılaştırılması.

## ŞEKİLLER

**Şekil 1** : NK hücrelerinin gebelikteki fizyolojik rolü.

**Şekil 2** : Fertil kadınlar ve İTgK'lı hastaların desidual NK hücreleri

**Şekil 3** : İTgK'da PIBF'un Rolü.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ASRM</b>	: Amerikan Üreme Tıbbı Derneği
<b>APAS</b>	: Antifosfolipid Antikor Sendromu
<b>AS</b>	: Amniyosentez
<b>CD</b>	: Cell Determinent
<b>CRL</b>	: Crow-Rump Length
<b>CVS</b>	: Koryonik villus örnekleme
<b>DIC</b>	: Dissemine İntravasküler Koagülasyon
<b>Dk</b>	: Dakika
<b>DI</b>	: Desilitre
<b>ESHRE</b>	: Avrupa İnsan Üreme ve Embriyolojisi Derneği
<b>eNK</b>	: Endometrial Natural Killer
<b>FKA</b>	: Fetal kardiyak aktivite
<b>GM-CSF</b>	: Granulocyte-Macrophage-Colony-stimulating-Factor
<b>GR</b>	: Gram
<b>HbA1C</b>	: HemogloblinA1C
<b>hCG</b>	: Human kortonik gonadotropin
<b>βHCG</b>	: Beta human kortonik gonadotropin
<b>HLA</b>	: Human Leukosite Antigen
<b>HSG</b>	: Histerosalpingografi
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IFN-γ</b>	: İnterferon-gama
<b>İTGK</b>	: İdiopatik Tekrarlayan Gebelik Kaybı
<b>IVF</b>	: İn vitro fertilizasyon
<b>KIR</b>	: Killer İmmunoglobulin Like Reseptor
<b>LGL</b>	: Large Granüler Lenfosit
<b>LH</b>	: Luteinleştirici hormon

<b>M-CSF</b>	: Macrophage-Colony-stimulating-Factor
<b>MIF</b>	: Macrophage Ingibitory Factor
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	: Macrophage İnflammatory Protein-1 $\beta$
<b>MTHFR</b>	: Metilen Tetrahidrofolat Reductase
<b>Mm</b>	: Milimetre
<b>NSAİİ</b>	: Non-Steroid Anti-İnflamatuar İlaç
<b>NK</b>	: Natural Killer
<b>PAI</b>	:Plazminogen Activator Ingibitor
<b>PBMC</b>	: Peripheral Blood Mononuclear Cells
<b>PIBF</b>	: Progesteron induced blocking factor
<b>PCOS</b>	: Polycystic Overy Syndrom
<b>pNK</b>	: Periferik Natural Killer
<b>Kg/m<sup>2</sup></b>	: Bir metrekare başına kilogram
<b>°C</b>	: Santigrad derece (sıcaklık)
<b>SNP</b>	: Tek nükleotid polimorfizm
<b>TGK</b>	: Tekrarlayan gebelik kayıpları
<b>TİM3</b>	: T-hücresi immünoglobulin alanı ve müsün alanı içeren molekül-3
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekroz Faktör-alfa
<b>TVUSG</b>	: Transvajinal ultrasonografi
<b>TSH</b>	: Tiroid Stimulating Hormon
<b>USG</b>	: Ultrasonografi
<b>uNK</b>	:Uterin Natural Killer
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>VEGF</b>	:Vascular Endotel Growth Factor
<b>VKİ</b>	:Vücut kitle indeksi

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) veya tekrarlayan düşük, çocuk sahibi çiftlerin yaklaşık %1-3'ünü etkileyen erken dönem gebelik komplikasyonudur. TGK'nın tanımı, kayıpların sayısına ve bunların ardışık olup olmadığına bağlı olarak uluslararası toplumlar arasındaki farklılıklar nedeniyle tartışılmaktadır. Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM), TGK'nı gebeliğin 20. haftasından önce arka arkaya olması gerekmeyen, iki veya daha fazla spontan gebelik kaybı olarak tanımlarken[1], Avrupa İnsan Üreme ve Embriyolojisi Derneği (ESHRE) ise bunu üç veya daha fazla ardışık gebelik kaybı (mutlaka intrauterin değil) olarak değerlendirmektedir [2].

TGK etyolojisinde koagülasyon sistem bozuklukları, genetik bozukluklar, anatomik faktörler, immünolojik nedenler, hormonal bozukluklar, çevresel nedenler yer almaktadır [3]. Tekrarlayan gebelik kayıplarının %20-%50'sinin immünolojik nedenlere bağlı olduğu düşünülmektedir [4].

Son yıllarda alloimmun faktörler üzerine yapılan çalışmalar Natural Killer (NK) hücrelerinin implantasyon ve gebeliğin sürdürülmesinde rolü olabileceğini göstermiştir. İmplantasyon ve erken gebelik döneminde endometriumda bulunan lökosit popülasyonu içerisinde çoğunlukta bulunan NK hücreleri olduğu için en kapsamlı çalışmalar bu hücreler üzerine olmuştur. NK hücreleri, periferik NK hücreleri (pNK) ve uterin NK (uNK) hücreleri olmak üzere iki gruba ayrılır. Fenotipik olarak ise iki şekilde gösterilir:

1-CD56pozitif CD16 negatif NK hücreleri (CD56bright şeklinde de gösterilir)

2-CD56pozitif CD16 pozitif NK hücreleri (CD56dim şeklinde de gösterilir) [5].

Periferik kanda, NK hücrelerinin ana popülasyonu (%90) CD56 dim hücrelerdir. Doğal sitotoksitenin güçlü araçlarıdır ve diğer NK alt kümelerinden daha sitotoksiktirler. Bu hücreler, aralıklı boşlukta koryonik villuslarla doğrudan temas halindedir ve gelişmekte olan fetüsün bu hücrelerden NK sitotoksitesini atlatması gebelik sonucunu belirleyebilir [6-8]. Sitotoksik CD56dim alt kümesinin, sağlıklı doğurgan kadınlara kıyasla TGK'lı kadınların periferik kanında yukarı regüle edildiği bildirilmiştir [9, 10].

NK hücreleri, NK hücre sitotoksitesini ve sitokin üretimini düzenleyen geniş bir aktive edici ve inhibe edici reseptörler paneli ifade eder. Bu reseptörler, aktivatör ve inhibitör reseptör sinyalleme arasında dengeleme yaparak NK hücrelerinin aktivitesini kontrol eder. Bu dengenin fetüsün anneden reddedilmesinin önlenmesinde kritik olduğu, tekrarlayan spontan düşüklere ve infertilitede bozulduğu düşünülmektedir [11, 12].

Bazı yazarlar, CD8+ NK alt kümesinin CD8- NK muadilinden daha sitolitik olduğunu göstermiştir. Ayrıca daha yüksek CD8+ ekspresyonuna sahip NK hücrelerinin daha aktif olduğu düşünülmektedir [13-15]. Bununla birlikte, diğer yazarlar, NK sitolitik aktivitesinin, NK hücrelerinde CD158a/b ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir [16].

NK hücrelerinin sitokin üretimi ile ilgili olarak, NK1 ve NK2 olarak sınıflandırılabilirler. Farklı sitokinlerin üretimi ile tanımlanırlar, NK1 tipi esas olarak IFN- $\gamma$  ve Tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) üreticileridir, NK2 tipi ise temel olarak IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 salgılar. Sağlıklı gebeliklerde NK1'den NK2 profiline gerekli bir geçiş belgelenmiştir [17, 18]. TKG öyküsü olan kadınların periferik kan CD56bright NK hücreleri, sağlıklı kontrollere göre orantılı olarak daha düşük IL-4 ve IL-10 seviyeleri ve daha yüksek IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  seviyeleri sergiler. Bu, NK1 / NK2 oranında bir artış anlamına gelir [19]. Öte yandan, IFN- $\gamma$  ve immünosupresif TGF- $\beta$  ve IL-4 üreten NK hücrelerinde bir artış olurken, TKG hastalarının sağlıklı kadınlara kıyasla immüno-regülasyon sitokinler salgılanmasıyla dengelenen daha aktif bir bağışıklık sistemi olduğu düşünülmektedir [10].

Sonuç olarak, artmış pNK hücre aktivitesi ve tekrarlayan düşükler arasındaki ilişki tartışmalı olmaya devam ediyor. Bu çalışmada, pNK hücrelerinin sitotoksik parametreleri; flowsitometri ile sitotoksik CD56dim ve CD56bright alt kümelerin yüzdeleri oranları, KİR geni markerlerinden CD8+ ve CD158a+ reseptörlere sahip NK hücrelerinin yüzdeleri oranları ve ELİSA yöntemi ile IFN- $\gamma$  miktarı ölçülerek pNK hücre aktivitesi seviyesi TKG'lı kadınlar ve sağlıklı fertil kontrol grubu arasında karşılaştırılarak, artmış periferik NK hücre aktivitesinin tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili immünolojik risk faktörlerinden biri olup olmadığı incelenmiştir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 ABORTUS**

#### **2.1.1 GENEL TANIM**

Erken gebelik kayıpları kadın hayatının en uzun dönemi olan reproduktif döneminin sık rastlanan problemlerinden biridir. Abortus gebeliğin en sık görülen komplikasyonu olup, suprapubik ağrı ve uterin kontraksiyonlarla ortaya çıkan vajinal kanama ile beraber gebeliğin uterusdan atılması, gebeliğe dair bulgu ve semptomların kaybolması olarak tanımlanmaktadır [20]. 1977 yılından itibaren Dünya Sağlık Örgütü (WHO), gebelik ürününün ağırlığı ve gebelik süreci kriter alınarak, 20. gebelik haftasından önce, 500 gramın altındaki embriyo veya fetus ve eklerinin tamamının ya da bir kısmının uterusdan atılması durumunu abortus olarak adlandırmaktadır [21].

#### **2.1.2 İNSİDANS**

Spontan abort ilk trimesterde en sık görülen komplikasyondur [22]. 20. gebelik haftasından önce, klinik olarak fark edilen düşükle oranı %8 ile %20 arasındadır. Daha önce term sağlıklı doğum yapan kadınlarda abortus riski daha düşüktür (%5) [23, 24]. Farkedilmeyen yada subklinik gebeliklerin kayıp oranları çok daha yüksek %13 ila %26 arasında izlenmektedir [23-25].

Gebelik haftası ilerledikçe abortusların sıklığı azalmaktadır. Gebeliklerin %30-60'ı ilk 12 haftada çeşitli nedenlerle düşükle sonuçlanmaktadır ve tüm kayıpların en az yarısı fark edilmemektedir [26]. Gebelik kayıpları 8. gebelik haftasından önce daha çok, 12.haftadan sonra nadir izlenmektedir [27].

Normal karyotip olan gebeliklerin %10'u abortusla sonuçlanırken, kromozomal bozukluk olan gebeliklerin hemen hepsi, 10. haftadan önce olmak üzere abortusla sonuçlanır [28, 29]. Bu nedenle gebelik kaybı doğal bir seleksiyon olarak sayılabilir.

İleri anne yaşı sağlıklı kadınlarda bilinen en büyük risk faktörüdür. 1 milyon üzeri hastanın dahil edildiği bir çalışmada toplam abortus oranı %11 olarak bulunmuştur. Bu

çalışmada anne yaşına göre abortus oranları 20-30 yaş arası %9-17, 35 yaş %20, 40 yaş %40 ve 45 yaşında %80 olarak bulunmuştur [30].

Yapılan birçok araştırma düşük riskinin geçmişteki jinekolojik öykü ile ilişkisini göstermiştir. Bir abort sonrası gebelik kaybı riski %20, iki abort sonrası %28 iken üç ve daha fazla sonrası bu oran %43 civarlarında gözlenmektedir [27].

Abort riski progresif olarak gebelik kesesi görüldükten sonra (%12), yolk salk izlenirse (%8), fetal boyut arttıkça (>5mm'de %7, 6-10mm'de %3, >10mm'de %1'in altında) azalmaktadır [31]. Bir diğer prognostik değer fetal kardiyak aktivitenin (FKA) görülmesidir. Düşük tehlikesi olan kadınlarda FKA izlenmesi iyi prognostik faktördür, ancak anormal ultrasonografik görüntülerde (zayıf veya geç oluşan FKA, fetal boyutun gestasyonel hafta ile uyumsuzluğu, subkoryonik hematoma) kayıp riski oranı artabilir [32, 33].

### 2.1.3 SINIFLAMA

Çebelik haftasına göre abortuslar ikiye ayrılır: 1) 12.haftadan önce gerçekleşen düşükler erken abortus, 2) 12 haftalıktan sonra gerçekleşen düşükler ise geç abortus olarak tanımlanır [34].

**1) Erken Abortuslar:** 12. gebelik haftasından önce gerçekleşen abortuslar.

**2) Geç Abortuslar:** 13. gebelik haftası ile 20 gebelik haftasının sonuna kadar ki süre arasında oluşan abortuslar.

**3) Subklinik abortus (Belirlenemeyen abortus):** Klinik olarak tespit edilmeyen, sadece biyokimyasal olarak gebelik tespit edilen olgularda, zamanında ya da birkaç gün geciken menstrüel kanama ile oluşan abortuslar [35].

Oluş şekillerine göre abortuslar:

**1) Spontan abortuslar:** Mekanik veya medikal girişim ve zorlama olmadan gebeliğin 20. gebelik haftasından önce sonlanmasıdır. Klinik olarak gebeliği tespit edilen 20 yaşından genç kadınlarda düşük oranı %12 iken, 40 yaşdan sonra bu oran %26'dır [36].

**2) Zorlanmış (Provoke, Induced) abortuslar:** Fetüsün uterusun dışında yaşama yeteneğini kazanmadan uterus kasılmalarının uyarılması veya doğrudan vaginal yoldan müdahale edilerek gebeliğin sonlandırılmasıdır. Medikal abortus, elektif abortus, septik abortus olarak sınıflandırılabilir.

**a) Medikal abortus (Terapötik abortus):** Gebeliğin tıbbi zorunluluk nedeniyle sonlandırılmasıdır. Maternal ağır sistem hastalıkları, renal hastalıklar, kardiyak hastalıklar, gebelik psikozu, kanser veya fetal anomali tanısı, pelvise aşırı radyasyon uygulanması, gebelikte teratojen ilaç kullanımı özellikle ilk trimesterde geçirilmiş intrauterin enfeksiyon, tesbit edilen genetik hastalıklar, fenilketonuri-galaktozemi gibi doğuştan metabolik hastalıklar varsa, medikal abortus yapılır.

**b) İstemli abortuslar (Elektif, Kriminal):** Ortada anne ve fetus ile ilgili herhangi bir tıbbi problem yokken, istenmeyen gebelik olgusunun 20. gebelik haftasından önce sonlandırılmasıdır. Ülkemizde 1983 yılında çıkarılmış 2827 sayılı ‘nüfus planlanmasına dair kanun ‘ile elektif abortus ve medikal abortus şartları belirlenmiştir. Buna göre 10 gebelik haftasına kadar olan gebelikler istenmediği halde yasal olarak tahliye edilebilir. Hastanın kendisi veya bir başkası tarafından paramedikal aletler kullanılarak yaptırılan düşük kriminal abortus, genital organlarda enfeksiyon meydana gelmesi ile sonuçlanan düşük ise septik abortus adlanır [34].

Tamamlanma şekline göre:

**a) Komplet abortuslar:** Embriyo, veya fetus ve eklerinin tamamen uterus kasılması ile uterus kavitesi dışına atılmasıdır. Tedavide uterin kavitenin keskin küretle kontrol edilmesi önerilir.

**b) İnkompakt abortuslar:** Embriyo, veya fetus ve eklerinin bir kısmının uterus kavitesi dışına atılıp, diğer kısmının kavite içerisinde bulunduğu durumdur. Burada doku kaybı ile birlikte vaginal kanama ve ağrılı uterus krampları vardır. Tedavide uterin kavite boşaltılmalıdır [23].

Klinik seyrine göre abortuslar:

**1) Abortus imminens:** Düşük tehdidi anlamına gelir. 20. gebelik haftasından önce vajinal kanamanın olması ile tanımlanır. Düşen doku parçası ve membran rüptürü yoktur. Pelvik muayenede serviks kapalı olup, uterin kaviteden kanama olduğu izlenir [35].

**2) Abortus insciens:** Abortusun kaçınılmaz olması servikal dilatasyon eşliğinde membranların gross rüptürü ile kendini gösterir. Prognoz kötüdür. Bu durumda abortus hemen hemen kesindir.

**3) Missed abortus:** İntrauterin fetal ölümün gerçekleştiği, ancak diğer abortus türlerinde görülen kanama ya da servikal dilatasyon gibi bulguların görülmediği durumdur. Ultrasonografik muayenede fetal kardiyak aktivite saptanmaz ve takiplerinde  $\beta$ HCG (Beta human koryonik gonadotropin) ölçümlerinde artış olmaz. Tedavi uterin kavitenin boşaltılmasıdır. Ciddi koagülasyon bozuklukları ve kanama görülebilir [37].

**4) Septik abortus:** Genellikle steril olmayan araçlarla düşük yaptırma girişimini takiben ortaya çıkar. Enfeksiyon genellikle endometrit şeklindedir ancak parametrit, peritonit, endokardit ve sepsisemi de gelişebilir. Patojen etken en sık E.coli, sonra diğer enterik gr(-) bakterilerdir.

Gelişmiş bir septik abortus tablosunda ciddi hipotansiyon, oligüri, anüri, hemoliz, DIC (Dissemine İntravasküler Coagulasyon), paradoksik hipotermi ve lökopeni görülebilir. Tedavide temel yaklaşım; uterin kavitenin boşaltılması, şokla mücadele ve parenteral antibiyotik tedavisinin başlatılmasıdır.

**5) Tekrarlayan gebelik kaybı:** Ardışık 2 veya daha fazla gebelik kaybı olarak tanımlanmaktadır [38, 39].

## 2.1.4 KLİNİK BULGULAR

**Komplike olmayan kanama ve kramp:** Semptomatik erken gebelik kayıplarında kadınlarda en sık görülen başvuru şikayetleri kanama ve kramplardır. Kadınlar ayrıca, azalmış meme hassasiyeti ve / veya bulantı, kusma gibi gebelik semptomlarında bir kayıp veya azalma olduğunu da fark edebilir. Alternatif olarak, bazı kadınlar asemptomatiktir ve abortus tesadüfen veya erken gebelikte rutin ultrasonda tesbit edilir. Gebeliğin ilk trimesterinde kanama oldukça yaygındır ve gebe kadınların %20-30'unda görülürken, olguların çoğu düşükle sonuçlanmayabilir [40, 41]. 4000'den fazla gebe kadından oluşan prospektif bir çalışmada, erken dönem vajinal kanaması olan kadınların %12'sinde spontan abortus belgelenmiştir [42]. Düşük sırasında vajinal kanamanın hacmi önemli ölçüde değişir ve kadınlar sıklıkla pıhtı veya doku geçişini bildirir. Genellikle, ne kanama hacmi ne de kendi kendine bildirilen doku geçişi, tipik olarak bir pelvik ultrasonla ek değerlendirme olmadan gebelik kaybını doğrulamak için yeterli değildir. Abortus ile ortaya çıkan ağrı genellikle doğası gereği kramplıdır ve özellikle doku geçişi sırasında hafif veya şiddetli olabilir. Ağrı sürekli veya aralıklı olabilir, genellikle vajinal kanama ile ilişkilidir. Kanama ve kramp aynı zamanda ektopik ve molar gebelik dahil diğer erken gebelik komplikasyonlarının semptomları olduğundan, vajinal kanaması veya pelvik ağrısı olan hamile kadınlar muhakkak değerlendirilmelidir.

**Komplikasyonlarla birlikte kanama ve kramp:** Abortus ile ilişkili en yaygın komplikasyonlar şiddetli olabilen kanama ve enfeksiyondur. Kadınlarda düşükle ilgili vajinal kanama sık görülürken, şiddetli kanama olgusu transfüzyon ve cerrahi tahliyeyi gerektirebilir. Kanamalı kadınlar tipik olarak vital bulgular, anemi ve / veya taşikardi ile birlikte olan ağır vajinal kanama ile başvurur. Genel risk yaklaşık %1'dir [43]. Erken gebelik kaybı sırasında intrauterin enfeksiyon insidansı gebelik yaşına göre değişir. İlk trimesterde yaklaşık %15, ikinci trimesterde ise %66'ya kadar artmaktadır [44]. Belirti ve semptomlar arasında abdominal veya

pelvik ağrı, uterus hassasiyeti, kötü kokulu akıntı ve / veya ateş, taşikardi veya hipotansiyon gibi sistemik enfeksiyon belirtileri bulunur. Enfeksiyöz komplikasyonlar kendiliğinden ortaya çıkabilir tıbbi veya cerrahi müdahaleleri takip edebilir. Enfeksiyon genellikle asemptomatiktir ve çalışma ortamlarının dışında teşhis edilmez; ancak, klinik olarak semptomatik enfeksiyonu olan kadınlar uygun şekilde tedavi edilmelidir [45].

**Asemptomatik veya tesadüfi:** Kanama, kramp veya doku geçişi olmaksızın, erken gebelik kaybı, pelvik ultrasonda tesadüfi bir bulgu olabilir. Son derece hassas gebelik testleri ve ultrasonlar, kadınlarda semptomların başlangıcından önce gebelik ve abortus teşhisine olanak sağlar.

## 2.1.5 TANI, DEĞERLENDİRME

**Alarm bulguları:** Kadınların çoğu aşağıdaki adımlardan oluşan sistematik bir değerlendirmeden geçerken, şiddetli kanama veya enfeksiyon varlığı, hızlı değerlendirme ve acil müdahale gerektirir. Bilinen intrauterin gebelik ve hemodinamik dengesizliği olan kanamalı kadınlarda, erken gebelik kaybı için ultrason kriterleri karşılanmasa bile, kadının sağlığını ve yaşamını korumak için gebeliğin sonlandırılması endikedir. Benzer şekilde, intrauterin enfeksiyon ve sepsis kanıtı (ateş, taşipne, taşikardi veya lökositoz dahil sistemik enflamatuvar yanıt sendromu kriterleri ile tanımlanmıştır) olan bir hastada acil gebelik tahliyesi endikedir. Alarm bulgusu olmayan kadınlar aşağıdaki değerlendirmeye devam eder.

**Anamnez:** Gebe bir kadında vajinal kanama ve / veya kramplı pelvik ağrı öyküsü erken gebelik kaybını düşündürür, ancak tanısız değildir. Bu kadınlar, daha önce mevcut olan gebelik semptomlarında bir azalma da bildirirler. Bununla birlikte, çoğu durumda, kesin tanı için ultrason veya seri  $\beta$ HCG testi ile daha ileri değerlendirme gereklidir.

**Fiziksel muayene:** Gebelikte kanama ile başvuran hastalara kanamanın kaynağı ve miktarını değerlendirmek için spekulum muayenesi yapılmalıdır. Abortusu düşündüren belirtiler arasında serviksten gelen kanama ve açık bir servikal os bulunur. Geleneksel olarak, açık serviks ile vajinal kanama bulguları "kaçınılmaz düşük" olarak teşhis edilebilir. Bununla birlikte, bu terminoloji artık tercih edilmemektedir çünkü pratikte servikal genişlemeyi değerlendirmek zor olabilir ve ilk trimester kanaması olan hastaların sadece %12'de gebelik kaybı oluşmaktadır. Olguların bazılarında gözle görülür şekilde dilate bir serviks veya os'da gebelik dokusu bulunurken, diğerlerinde (özellikle paröz olanlar) normal devam eden bir gebelikte bile dilate görünen bir serviks vardır. Bimanuel muayene ayrıca serviksin açık olup olmadığını ve

servikal kanal içinde gebelik ürünü olup olmadığını da belirleyebilir. Ek olarak, ultrason kolayca bulunamıyorsa, bimanuel muayene gebelik yaşını tahmin edebilir ve bu daha sonra tutarsızlığı ve olası abortus olgusunu değerlendirmek için hastanın bilinen gebelik yaşıyla karşılaştırılabilir. Bununla birlikte, obez hastalarda uterus boyutunu değerlendirmek zor olabilir ve uterus fibroidleri veya diğer uterus anomalileri varlığında yanıltıcı olabilir. Ek olarak, hastanın tahmini gebelik yaşı yanlış olabilir.

**Görüntüleme:** Gebelik kaybını düşündüren belirti veya semptomları olan tüm hamile kadınlar mümkün olduğunda, transvajinal ultrason ile intrauterin gebelik ve viabilite kanıtını doğrulamak için değerlendirilir. Transvajinal ultrason %90–100 sensitif ve %80–90 spesifiktir [40]. Transvajinal ultrasonografide 4. ve 5. haftalar arasında sonografik olarak bulgu olmazken, 5. haftadan sonra gestasyonel kese izlenir. Bu haftada gebelik kesesi içerisinde yolk sak ve fetal pol izlenmez. Sıklıkla ektopik gebelikteki pseudosak ile karışabilir. Ektopik gebelik 5,5 haftadan sonra yolk sak görüntülenmesiyle ekarte edilir. 6–6,5 haftalarda fetal pol izlenir. Şüpheli olgularda  $\beta$ HCG ve progesteron ölçümleri yapılarak tanı desteklenir [46].

Fetal kardiyak aktivite olmaksızın intrauterin gebeliği gösteren ilk transvajinal ultrasonu olan hastalarda erken gebelik kaybı(yani, yaşayabilir bir gebelik şansı yoktur) tanısı esasen %100 spesifite ve pozitif tahmin değeri sağlayan aşağıdaki kriterlere dayanmaktadır [47].

- Ortalama çapı 25 mm olan ve yolk salk veya embriyo içermeyen bir gebelik kesesi
- Kalp aktivitesi olmayan baş-popo uzunluğu (CRL) 7 mm olan bir embriyo
- Pelvik ultrasonda yolk salk olmayan bir gebelik kesesi gösterildikten sonra,  $\geq 2$  hafta içinde kalp atışı olan bir embriyonun olmaması
- Pelvik ultrasonda yolk salk olan bir gebelik kesesi gösterdikten sonra,  $\geq 11$  gün içinde kalp atışı olan bir embriyonun olmaması

Gebelik kaybı için şüpheli olan ancak tanısal olmayan bulgular şunları içerir:

- CRL  $< 7$  mm ve kalp atışı yok
- 16 ila 24 mm arasında ortalama kese çapı ve embriyo yok
- Yolk salk olmayan gebelik kesesi gösteren bir taramadan 7 ila 13 gün sonra kalp atışı olan embriyonun olmaması
- Yolk salk olan gebelik kesesini gösteren taramadan 7-10 gün sonra kalp atışına sahip embriyonun olmaması
- Son adet döneminden 6 hafta sonra embriyo yokluğu
- Boş amniyon (görünür embriyo olmadan yolk salk bitişiğinde görülen amniyon)
- Büyümüş yolk salk ( $> 7$  mm)

- Embriyonun boyutuna göre küçük gebelik kesesi (ortalama kese çapı ile CRL arasında <5 mm fark)

Yukarıda sunulan ultrason kriterleri, Ultrasound Multispecialty Panelinde Radyologlar Derneği'nin Düşük İlk Trimester Erken Teşhisi ve Yaşayan İntrauterin Gebeliğin Dışlanması konusundaki tavsiyelerine dayanmaktadır [47].

**Laboratuvar değerlendirme:** Ultrason varlığında, serum  $\beta$ HCG ve progesteron, gebelik kaybı şüphesi olan kadınların tanısal değerlendirmesinde sınırlı kullanıma sahiptir. Normal gebeliklerde, ortalama  $\beta$ HCG seviyeleri yaklaşık 8 ile 11. haftaya kadar yükselir ve ardından düşer [48]. Ultrasonografinin yetersiz olduğu olgularda ise kandaki  $\beta$ HCG düzeylerinin ölçümü normal ve anormal gebeliklerin tesbitinde önemli değer taşımaktadır. Serum düzeyi  $\beta$ HCG 1800 mIU/ml üzerinde olan ve transvaginal ultrasonografide uterin kavitede gebelik kesesi saptanmayan olgularda ektopik gebelik yönünde araştırma yapılmalıdır [49]. Tek bir değer tanı koydurmaz, fakat ardışık ölçümler gebeliğin viabilitesi hakkında bizleri bilgilendirecektir. Olgularda  $\beta$ HCG ile birlikte mutlaka kan grubu, Rh tayini, kan sayımı yapılmalıdır [50].

Missed abortus olgularında ultrasonografik ve doppler inceleme ile tanı konulur. Olgularda gebelikle ilgili semptomlar gerilemiştir. Sağlıklı bir gebelikte progesteron düzeyi 25 ng/ml üzerinde,  $\beta$ HCG artışı ise 48 saatte %66 oranının üzerinde olup normal sonografik bulgular mevcuttur. Progesteron düzeyi 5 ng/ml altında, ultrason bulguları canlı olmayan gebelik yönünde ve  $\beta$ HCG değerleri plato çiziyor veya düşme eğiliminde ise sağlıklı bir gebelik mevcuttur. Progesteron değerleri 5–25 ng/ml arasında, belirsiz  $\beta$ HCG düzeyleri ve şüpheli sonografik görüntüler kesin olmayan bulguları göstermektedir. Bu olgularda bir hafta sonra tekrar ultrasonografi ve 2-3 günde bir  $\beta$ HCG düzeyi bakılması önerilir. Canlı gebeliği olan olgular kanamasız 1 haftaya kadar düşük tehdidi olarak kabul edilir [46].

## 2.1.6 ABORTUSLARDA TEDAVİ

Spontan abortusda tedavi şekli klinik seyrine göre belirlenir.

Abortus imminenste hastaya yatak istirahatı ve gözlem önerilir. Kanama devam ediyorsa hospitalize edilerek takip edilir. Progesteron tedavisinin etkinliği tartışmalıdır. Fetal viabilite ultrasonografik inceleme ile takip edilir.

Abortus incipiens, inkomplet abortus, missed abortus ve septik abortus vakalarında gebelik tahliyesi yapılması gerekir. Oksitosin infüzyonu ile birlikte suction küretaj yapılır. Fazla

kanama olgularında kan transfüzyonu gerekebilir. Komplet abortus durumunda hasta kanama açısından takip edilmelidir.

Tipinden bağımsız olarak tüm abortus ve küretaj materyali patolojik olarak incelenmeli ve mol veya koryokarsinom ekarte edilmelidir [51].

## 2.2 TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK), çiftlerin yaklaşık %1-3'ünü etkileyen erken bir gebelik komplikasyonudur. TGK'nin tanımı, kayıpların sayısına ve bunların ardışık olup olmadığına bağlı olarak uluslararası toplumlar arasındaki farklılıklar nedeniyle tartışılmaktadır. Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM) TGK'nı gebeliğin 20. haftasından önce arka arkaya olması gerekmeyen, iki veya daha fazla spontan gebelik kaybı olarak tanımlar [1]. Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği (ESHRE) ise ultrasonografik (USG) incelemede saptanamayan biyokimyasal ve/veya ektopik gebelik kayıplarının da bu tanımlamaya eklenmesini önermiştir [52]. Bazı kaynaklarda TGK birbirini izleyen 3 veya daha fazla spontan gebelik kaybı olarak tanımlanmaktadır [53]. Tüm gebeliklerin %0,5–3'ünde görülür [54].

Tekrarlayan gebelik kayıpları etyolojisi genellikle bilinmemektedir ve çok az kanıta dayalı tanı ve tedavi stratejisi vardır. Etiyolojisinde genellikle koagülasyon sistemi bozuklukları, genetik, anatomik, immünolojik, endokrin, çevresel faktörler ve enfeksiyonlar yer alır. Tam bir değerlendirme sonucu olguların yaklaşık yarısında net açıklayıcı bir neden saptanamamaktadır [3].

**Koagülasyon Sistemi Bozuklukları:** Normal gebelik süresince pıhtılaşma eğilimi bir miktar artmaktadır. Trombofili trombozlara eğilimi arttıran, edinsel ya da kalıtsal olabilen koagülasyon sistemi bozukluklarındandır. Kalıtsal trombofililer tedavi edilebilir tekrarlayan gebelik kaybı nedenlerindedir. Son yıllarda saptanan kalıtsal trombofili sayısı artmıştır ve TGK ile ilişkileri arasında farklı sonuçları olan çalışmalar bildirilmektedir. Faktör V Leiden mutasyonu kalıtsal trombofili nedenleri arasında en sık görülendir. Faktör V Leiden mutasyonu aktive protein C (APC)'ye karşı antikoagülan cevabın bozulması ile gelişen bir genetik hastalıktır. Daha doğrusu APC tarafından aktive faktör V'in inaktivasyonu bozulmuştur. Faktör V genindeki nokta mutasyonu APC için klivaj bölgesinde hasara neden olur, sonuçta oluşan mutant faktör V Leiden proteini normale göre 10 kat daha yavaş inaktive olup dolaşımda uzun

süre kalır, trombin oluşumunu arttırarak protrombotik durum yaratır. Hem homozigot (daha fazla) hem de heterozigot mutasyonlar erken ve geç ilk trimester kaybını arttırmaktadır [55].

Faktör V Leiden mutasyonu olmadan olan kazanılmış aktive protein C direnci (APCR) gebelikteki trombotik komplikasyonlar açısından bağımsız risk faktörüdür. Bu durumda APC'nin antikoagülan aktivitesi bozulmuştur. Açıklanamayan TGK vakalarının %9–38'inde APCR pozitifdir. Normal gebelikte fizyolojik olarak APCR'de artış olur. Ancak altta yatan faktör V Leiden mutasyonu yada APCR olan olgularda bu fizyolojik değişiklik daha aşırı olur ve fetal kayıp için daha yüksek risk oluşturur [56].

Bir çok çalışmada FaktörV Leiden mutasyonu ile TGK arasında pozitif ilişki gösterilmiştir [57]. Bu çalışmalarda canlı doğum oranını arttırmak için FaktörV Leiden mutasyonu olan olgularda heparin tedavisi önerilmektedir. Daha önemlisi yapılan randomize kontrollü çalışmalar tekrarlayan gebelik kaybı vakalarında FaktörV Leiden mutasyonunun rutin taranması ve bu mutasyonu taşıyan kadınlara tromboprolaksi önermektedir. Kalıtsal trombofiliye neden olduğu düşünülen diğer sebepler Protein C ve Protein S eksikliği, Antitrombin III eksikliği, protrombin gen mutasyonudur [55, 58]. Tromboz ve gebelik kaybına neden olan yeni bilinen diğer bir patoloji ise faktör 12 eksikliğidir [59]. Daha nadir görülen diğer bir mutasyonda da tromboz için bilinen bağımsız bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemiye eğilim olmaktadır [60]. Bazı çalışmalarda hiperhomosisteineminin tekrarlayan abortuslarda rolü olmadığı gösterilmektedir [61]. Bazılarında ise hiperhomosisteineminin TGK riskini 3–4 kat arttırdığı bildirilmektedir [62]. Hiperhomosisteineminin defektif koryon villus vaskularizasyonuna, endotel hasarına ve prokoagülan etkilere neden olarak erken gebelik kaybına yol açtığı düşünülmektedir [63].

Kalıtsal trombofililer ile gebelik kaybı arasındaki ilişki geniş sistematik meta-analiz sonucuna göre; protein S eksikliğinde TGK riskinde 15 kat, 22 hafta sonrası geç fetal kayıp riskinde ise 7 kat artış izlenmiş, fakat protein C ve antitrombin III eksikliği ile fetal kayıp riski arasında ise anlamlı ilişki gösterilememiştir [55]. Trombofililer ile gebelik kayıpları arası ilişki gebelik kaybı zamanı (erken, geç) ve trombofili tipine göre değişmektedir. Yapılan bir metaanaliz raporlarına göre trombofililerin hem erken ve hem de geç gebelik kayıplarına neden olduğu halde ikinci trimester ve daha sonraki dönem gebelik kayıplarıyla daha fazla ilişkili olduğu bildirilmiştir [55]. Maternal intervillöz kan akımının sekizinci gebelik haftasına kadar oluşmadığı düşünülecek olursa trombofiliye bağlı tromboz bu sebepten erken gebelik kayıplarını açıklayamayacaktır [64]. Tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan kadınlarda trombofili tarama endikasyonları net olarak belirtilmemiştir. Açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olan

olgulara ne trombofilili taraması ne de genetik polimorfizm bakılması önerilmemektedir [65]. Bunun yanısıra, 8 haftanın üzerinde veya fetal kalp aktivitesi tespiti sonrası nedeni açıklanamayan TGK olanlarda veya tromboz veya plasental yetmezliğe bağlı gelişebilecek gebelik komplikasyon öyküsü (preeklampsi, intrauterin gelişme geriliği, plasental dekolman) olanlarda tarama yapılabilir. Trombofilili ile ilgili gebelik kayıpları olan kadınlarda tedavi endikasyonları kesinleşmemiştir. Kontrolsüz tedavi çalışmalarında, tekrarlayan gebelik kaybı ve bir veya birden fazla trombofilik bozukluğu olan kadınlarda heparinin tek başına veya aspirinle birlikte uygulanmasının canlı doğum oranını düzelttiği bildirilmiştir [64]. Tekrarlayan erken gebelik kaybı olan kadınlarda uygulanan rutin empirik aspirin tedavisinin kanıtlanmış bir faydası bilinmemektedir [66]. Aspirin ile düşük moleküler ağırlıklı heparinin kombine tedavisi yalnız geç gebelik kaybı ve Antifosfolipid Antikor Sendromu (APAS) birlikteliği olan kadınlarda önerilmelidir. Bu kombinasyon tromboembolik öyküsü olmayan tekrarlayan düşük ve kalıtsal trombofilili hastalara profilaksi amaçlı önerilmemelidir [65].

Erken ve tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olan, etyolojisinde otoimmün faktörlerin yer aldığı Sistemik Lupus Eritomatozus (SLE) ve APAS en sık rastlanan edinsel trombofilili sebepleridir [58]. APAS spesifik klinik ve laboratuvar özellikleri olan otoimmün hastalıktır. Habituel abortusların %5–10 kadarından sorumlu olduğu gösterilen APAS tekrarlayan gebelik kayıplarının potansiyel olarak tedavi edilebilen bir nedenidir. Çeşitli antifosfolipid antikolar belirtilse de sadece Antikardiolipin antikor ve Lupus antikoagulanı yaygın kabul görmüştür. Antifosfolipid antikolar düşük risk grubundaki %2'lik orana karşın TGK'lı olgularda %15 oranında izlenmektedir [67]. APAS ile TGK arasındaki nedensel bir ilişki tanımlanmasa da, düşük doz aspirin, heparin ve steroidler ile bir çok terapötik çalışmalar yapılmıştır [68]. Yapılan bir çalışmada aspirin ve düşük molekül ağırlıklı heparin kombinasyonunun antifosfolipid antikoru bulunan kadınlarda düşüğü %54 oranında azalttığı gösterilmiştir [69]. Steroidlerin TGK'lı kadınlarda canlı doğum oranını arttırdığı ile ilgili bir kanıt bulunamamıştır [68]. Birçok çalışma heparinin aspirinden daha etkili, aspirin ve heparinle kombine tedavinin ayrı ayrı uygulamalardan daha etkili olduğunu göstermiştir [65, 70-73]. Bu bilgilere göre trombofililere bağlı gebelik kayıpları ilk trimestere göre daha çok ikinci-üçüncü trimester kayıplarına neden olmaktadır [74].

Sonuç olarak seçilmiş tekrarlayan gebelik kaybı olgularında Faktör V Leiden mutasyonu ve protrombin gen mutasyonu için DNA analizi, protein S eksikliği, Antikardiolipin antikor ve Lupus antikoagulanı taraması yapılmalıdır.

**Genetik Faktörler:** Kromozomal anormallikler, erken dönem gebelik kayıplarının en sık rastlanan nedenidir. Embriyonun anormal karyotipe sahip olması birçok düşüğün altında yatan sebeptir. Erken gebelik kayıplarının %50'sinde, ikinci trimester kayıplarının %30'unda genetik bozukluk tespit edilmektedir [75, 76]. Bu genetik bozuklukların çoğu (%90 üzeri) sayısaldır (anöplöidi, poliplöidi), diğerleri yapısal anomali (translokasyon, inversiyon) ve mosaizmdir [77]. En sık görülen kromozomal anomali otozomal trizomilerdir (kromozom 13, 16, 22, 23). Daha sonra monozomi X (45X) ve poliplöidiler gelmektedir [75]. Anne yaşı ve gebelik haftasına göre sınıflandırıldığında tekrarlayan gebelik kayıplarındaki kromozom anomali dağılımı genel popülasyonda görülenden farklı değildir [78]. TGK olgularının %4– 8'inde çiftlerden biri veya diğerinde fetal genetik bozukluğu oluşturacak parental kromozom anomalileri mevcuttur [79]. Tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkili parental kromozom anomalilerinden en sık dengeli translokasyonlar görülmektedir [80]. TGK olan çiftlerin %10'undan fazlasında önceki çocuk ve yakınlarında multifaktöriyal anomaliler; nöral tüp defektleri, diyafragma hernisi, omfalosel, yarık damak, yarık dudak gözlenmiştir [20]. Bu hastalarda çiftlerin detaylı bir öyküsü alınmalı ve soy ağacı çıkarılmalıdır. Çiftlerin karyotip ve düşük materyalinin sitogenetik analizi yapılmalıdır. Paternal defektlerde tedavide artifisyel inseminasyon, maternal defekte ise oosit donasyonu gerekebilir [20]. Çiftlerin karyotip analizi ve abortus materyalinin sitogenetik analizi üçüncü erken gebelik kaybında önerilmelidir [65].

**Anatomik Nedenler:** Anatomik nedenler TGK'ların %15'inden sorumludur. Erken gebelik kayıplarına göre ikinci ve üçüncü trimester gebelik kayıplarıyla daha fazla ilişkilidir. Abortuslara yol açan anatomik nedenler; müllerian kanal defektleri gibi konjenital nedenler, uterin leiomyomlar, küretaj ya da enfeksiyonlar sonrası gelişen intrauterin adezyonlar, endometrial polipler gibi edinsel nedenlerdir. TGK etyolojisinde edinsel faktörlere göre konjenital nedenlerin daha fazla rol oynadığı düşünülmektedir. Konjenital uterin anomalilerin sınıflandırılmasının kesinleştirilmesi, yalnız gebelik sonuçları, TGK etyolojisi açısından değil, yapılacak cerrahi müdahalenin seçimi ve sonuçları açısından da son derece önemlidir. Kayıplar genelde implantasyon bölgesinin yetersiz kanlanması yüzünden ilk trimesterde veya yapısal defektlere bağlı ikinci trimesterde görülür [81]. Cerrahi tedavi ile vakaların %70'inde sonuçlar başarılı olmaktadır.

Uterin septum en sık rastlanan konjenital uterin gelişim anomalisi olup TGK'lı olgularda (%3,5 sıklık) ve genel popülasyonda tüm majör malformasyonların %80–90'ını oluşturmaktadır [82]. Bu anomali en sık kötü gebelik sonuçlarıyla ilişkilidir [83] ve en kolay düzeltilebilen bozukluktur. Uterin septum her zaman kötü gebelik sonuçlarıyla birlikte olmayabilir, ancak TGK

nedeni ise cerrahi tedavi olarak histeroskopik septum rezeksiyonu yapılmasının uygun olduğu bildirilmektedir. Bikornuat veya unikornuat uterusu olan birçok kadında obstetrik prognoz iyi olduğu için ve bu anomalilerin onarımı daha invaziv, yüksek komplikasyon riski olduğundan bu anomalilerin onarılması önerilmemektedir.

Servikal yetmezlik spontan düşüklerin %0.2'sinden, ikinci ve üçüncü trimester gebelik kayıplarının %16–20'sinden [84] ve TGK'ların %8–15'inden sorumludur [85]. Preterm doğumların yaklaşık %10'unundan servikal yetmezlik sorumludur [86]. Cerrahi tedavi olarak transvajinal veya abdominal serklaj uygulanmaktadır. Cerrahi risklerin olasılığı nedeniyle serklajın daha önceden ikinci trimester gebelik kaybı öyküsü olan seçilmiş kadınlara uygulanması önerilmektedir.

Uterin myomların TGK nedeni olduğunu gösteren net kanıtlar yoktur. Genellikle submüköz myomlar tek ve küçük boyutta ise histeroskopik myomektominin faydası riskinden çok olmasından dolayı önerilmemektedir [87].

İntrauterin adezyonlar TGK'lara neden olmakla birlikte, klinik olarak daha sık menstruel bozukluklar ve infertilite ile prezente olur [88]. İntrauterin adezyonlarda gebelik sonuçları genel olarak kötüdür ancak adezyolizis sonrası düzelme olmaktadır. Prognoz ise genellikle hastalık derecesiyle ilgilidir.

**Endokrinolojik Nedenler:** Gebelik kayıplarının yaklaşık %10'u endokrinolojik nedenlerle ilişkilidir. Endokrinolojik bozukluklar arasında diabetes mellitus (DM), tiroid bez fonksiyon bozukluğu, luteal faz defekti, polikistik over sendromu (PKOS), hiperprolaktinemi gibi endokrinolojik problemler yer alır.

Kontrollü DM'lerde abortus oranının artmadığı, kontrolsüz DM'lerin ise abortuslara sebep olabileceği bildirilmektedir [89]. Kontrolsüz DM olgularında spontan abortus riski 3 kat artmaktadır. Erken gebelik döneminde HbA1c düzeylerinde yükseklik olan kadınlarda fetal ölüm ve spontan abortus ihtimalinin arttığı bildirilmektedir [81]. Sonuç olarak TGK'lı kadınlarda, kan glukoz ve HbA1C değerlerinin ölçümü bilinen veya klinik olarak tahmin edilen diyabeti olan kadınlarda yapılmalıdır, ancak bunların dışında tarama rutin olarak önerilmemektedir. TGK olup yüksek HbA1C düzeyleri olan diyabetik kadınlara, düzeyler normal seviyeye gelinceye kadar gebe kalmamaları önerilmelidir.

Luteal faz yetmezliği TGK'ların tartışmalı sebepleri arasındadır [90]. Uterusta preimplantasyon öncesi hazırlıklar dönemindeki bazı endokrinolojik değişiklikler tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olabilir. Korpus luteumunun özellikle ilk 8 haftadaki yetersiz progesteron üretimi, anormal luteinizan hormon sekresyonu veya mevcut progesterona

endometriyumun verdiği kötü yanıt luteal faz yetmezliği sebepleri arasındadır. Bu durum TGK'lı olguların %23'ü ile 60'ı arasında varyasyon göstermektedir [91]. Serum progesteron düzeyi midluteal fazda 12 ng/ml altında olursa, gebeliğin kaybedilme riski artar [65]. Tedavi olarak progesteron içeren vajinal suppozituarlar veya korpus luteum fonksiyonunu destekleyen progesteron preparatları, ekzojen hCG, gonodotrin ve klomifen sitrat uygulamaları mevcuttur. Ancak etkinliği randomize kontrollü çalışmalarda kesinleşmemiştir. Literatürde luteal faz yetmezliğinin patolojik bir durum olduğunu destekleyen çok az sayıda veri vardır. Bu nedenle TGK olgularının değerlendirilmesinde luteal faz yetmezliği tanısı üzerine ilgili testlerin yapılması önerilmemektedir [92].

Hipotiroidi ve hipertiroidi durumlarının her ikisi de üreme fonksiyonunda bozulmaya neden olabilir. Son zamana ait çalışmalarda tiroid stimulan hormonu (TSH) düzeylerinin gebelik kayıpları ile ilişkisi üzerinde durulmaktadır. TSH seviyesinin 6 mIU/ml üzerinde olmasının yüksek oranda ölü doğumla ilişkili olduğu bildirilmektedir [93, 94]. Klinik hipertiroidiye bağlı olarak abortus riskinde bir artış olmadığı gösterilmiştir. Çalışmalarda tiroid fonksiyon testleri normal bulunan tedavi edilmiş hipotiroidi hastalarında gebelik kaybı insidansı çok düşük rapor edilmiştir. Fakat tedavi edilmemiş subklinik hipotiroidi olan ve belirgin hipotiroidi olup da yeterli ekzojen tiroid hormon tedavisi almayan kadınlarda yüksek TSH düzeyleri düşük riskini belirgin olarak artırmaktadır [95-99]. Tedavi edilmesi kolay patolojiler olması ve tedavi sonuçlarının gebelik prognozunu düzelttiğinden dolayı TGK tetkikleri arasına TSH da dahil edilmelidir. Bazı çalışmalarda antitiroid antikorlarının da gebelik kaybı ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Ancak randomize araştırmalar sonucu, antitiroid antikorlarının tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkisi net olarak gösterilememiştir ve ayrıca antitiroid antikor pozitifliğinin günümüzde etkin tedavisi de mevcut değildir [97, 98]. Bu nedenle tiroid otoantikor taraması TGK değerlendirmesi güncel algoritmasında yer almamaktadır.

Polikistik over sendromu olan kadınların %36-56'sında TGK saptanmaktadır. Polikistik over sendromu olgularında gebelik kaybı lüteinize hormon (LH), hiperandrojenemi ve insülin direncine bağlanmaktadır. Bunun yanısıra PKOS olmadan insülin rezistansı ve obezitenin birlikte tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkisi gösterilmiştir [100]. Çalışmalarda metforminin özellikle bozulmuş glukoz tolerans testi olanlarda gebelik kaybı oranlarını azalttığı bildirilmiştir. Polikistik over sendromu ve insülin direnci olgularına metformin tedavisinin yararlı olduğunu gösteren yayınlar vardır [101]. Fakat randomize kontrollü çalışmalarda abortus oranlarında klomifen sitrat ile metformin arasında bir fark olmadığı belirtilmektedir. Obez PKOS'lu

kadınlarda kilo verme basit ve başta önerilmesi gereken yöntemdir. Sonuç olarak seçilmiş TGK olgularında klinik ve laboratuvar olarak PKOS açısından değerlendirme yapılması önerilebilir.

Hiperprolaktineminin ovaryan granüloza hücrelerinden progesteron salınımını inhibe ederek (luteal faz defektine neden olarak) endometriyal defektlere neden olabileceği bildirilse de TGK'larda rolü net değildir [93, 102]. Bazı çalışmalarda bromokriptin tedavisiyle başarılı gebelik sonuçları bildirilmektedir. Bu nedenle hiperprolaktinemili TGK'lı olguda tedaviden sonra gebelik önerilebilir.

İdiyopatik TGK olgularında nedeni bilinenlere göre adetın üçüncü günü foliküler stimulan hormon (FSH) ve estradiol (E2) değerleri daha yüksek bulunmuştur. Bir çalışmada olguların %58'inde TGK nedeni olarak adetın 3. gününde FSH veya E2 yüksekliği gösterilmiştir [103]. Menstrual döngünün üçüncü günü FSH ve E2 düzeyinde artış oosit kalitesi ve sayısında azalmaya neden olur, sonuçta bu kötü kaliteli oositlerden oluşacak embriyolarda kromozom anomalisi ve dolayısıyla düşük insidansı artmaktadır. Her TGK olgusunda yaşına bakılmaksızın adetın 3. günü FSH düzeyine bakılmalıdır.

**Enfeksiyonlar:** Tekrarlayan gebelik kayıplarında bilinen etiyolojik faktörler içinde enfeksiyon en az görülmüştür. Spontan abortusla ilişkisi iyi bilinmesine rağmen TGK ile ilişkisi gösterilememiştir. Ureaplasma urealiticum ve Mycoplasma hominis bu konuda en çok suçlanan enfeksiyon ajanlarıdır. TGK'ya neden olduğu konusunda kesin kanıtlar olmamasından dolayı güncel literatür bilgilerine göre TGK-lı olgularda TORCH grubu, serviks kültürü ve biyopsi taraması gereksiz olarak kabul edilmektedir [52]. İlk trimesterde bakteriyel vaginosis varlığı, gebeliğin 2. trimesterinde düşük veya preterm doğum için bir risk olarak bilinmektedir, fakat 1. trimester kayıpları için ise veriler yetersizdir. Klindamisin tedavisi ile gebeliğin termde sonlanması ve canlı bebek doğurma oranları artmaktadır [104].

**Çevresel Faktörler:** Güncel verilere göre çevresel ajanların tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olduğu konusunda kesin kanıtlar yoktur. Diyetteki herhangi bir besin eksikliğinin ya da tüm besinlerin orta derecedeki eksikliğinin abortusta rolü olduğuna dair kesin bir veri yoktur. Sigara içimi ve düşük riski arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda genel olarak sigara içmenin doza bağımlı bir şekilde spontan düşük riskini artırdığı belirtilmiştir. Sorumlu mekanizmalar net değildir fakat sigara dumanındaki nikotin, karbondioksit, siyanür dahil bazı maddelerin vazokonstriktif ve antimetabolik etkileri plasental yetmezliğe neden olabilir [105]. Gebeliğin ilk 8 haftasında alkol kullanımı hem spontan abortus hem de fetal anomalilere neden olabilir [106]. Başka bir prospektif çalışmada gebelik boyunca düşük düzeyde alkol kullanımı anlamlı abortus riski ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir [107]. Kafein tüketimi ile düşük riski

arasındaki ilişkiyi inceleyen çoğu çalışmada aşırı kafein tüketiminin spontan abort riskinde 2 kat artışa neden olduğu gösterilmiştir [108]. İsoetretinoin yükselmiş spontan düşük insidansı ile ilişkilidir [109]. Son verilere göre 5 Rad'ın altında bir radyasyon dozunda malformasyon, büyüme geriliği veya düşük açısından artmış bir fetal risk yoktur [110].

**İmmünolojik Faktörler:** İmmünolojik faktörlerin sebebi bilinmeyen TGK olgularının ortalama %20'sinden sorumlu olduğu düşünülmektedir [19, 111, 112]. Bilinen immünolojik nedenleri otoimmün ve alloimmün olmakla iki gruba ayrılır.

Otoimmün nedenler: SLE ve APAS gebelik kayıpları ile en sık ilişkilendirilen otoimmün hastalıklardır. Bu sendromlarda, 1. trimester abortus riskinde artış olmamakla birlikte, geç dönem abortuslarda risk oranı ortalama %20 artar. APAS'da tespit edilen otoantikörler (anti-kardiyolipin, lupus antikoagülanı, anti  $\beta$ 2 glikoprotein-1), gebelik kaybı ile ilişkisi net bilinen tek otoantikör grubudur ve TGK öyküsü olan tüm kadınlarda bakılması önerilmektedir. Bu otoantikörler, villöz trofoblastların farklılaşmasını ve ekstrasvillöz sitotrofoblastların desiduaya invazyonunu inhibe ederek [113, 114], sinsityotrofoblastların apoptozunu indükler [115] ve maternal immün yolları aktive ederek etkisini trofoblastlar üzerinde gösterir [116]. Ayrıca açıklanamayan küçük damar trombozlarına ve 34 haftadan önce şiddetli preeklampsi ve plasental yetmezliğe neden olurlar. Etkisini plasental tromboksan sentezini artırıp, prostasiklin sentezini azaltarak ve anneksin V'i plasentadan uzaklaştırarak sağlar.Yapılan bir çalışmada aspirin ve düşük molekül ağırlıklı heparin kombinasyonunun antifosfolipid antikoru bulunan kadınlarda düşüğü %54 oranında azalttığı gösterilmiştir [69]. Steroidlerin TGK'lı kadınlarda canlı doğum oranını arttırdığı ile ilgili bir kanıt bulunamamıştır [68]. Birçok çalışma heparinin aspirinden daha etkili, aspirin ve heparinle kombine tedavinin ayrı ayrı uygulamalardan daha etkili olduğunu göstermiştir [65, 70-73].

Alloimmün nedenler: Maternal sitotoksik antikörler, MHC I-II uyumsuzlukları, plasentaya karşı artmış maternal immün reaksiyon, artmış NK hücre ve T-helper Th1/Th2 oranı, Natural Killer (NK) ve T-lenfositlerin fonksiyon bozuklukları olası alloimmün nedenler arasındadır. Etiyolojinin araştırılması amacıyla maternal HLA taramasının ya da lenfosit fonksiyon incelemesinin rutin olarak yapılması önerilmemektedir [52]. Son dönemlerde maternal immün düzenleyici genler üzerinde çalışmalara ağırlık verilmiş olup interlökinler, NK hücre yanıtları, CD4 T-helper hücre dengesi ve HLA allelleri ile ilişkili yolak/genler incelenmektedir. Steroid tedavisi, TGK endikasyonunda etkinliği gösterilemediğinden fetal ve maternal olası yan etkileri nedeniyle önerilmemektedir [117, 118]. IVIG kullanımı ise tartışmalı bir konudur ve yeterli çalışma bulunmamaktadır [119].

## 2.3 TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARI VE NK HÜCRELERİ

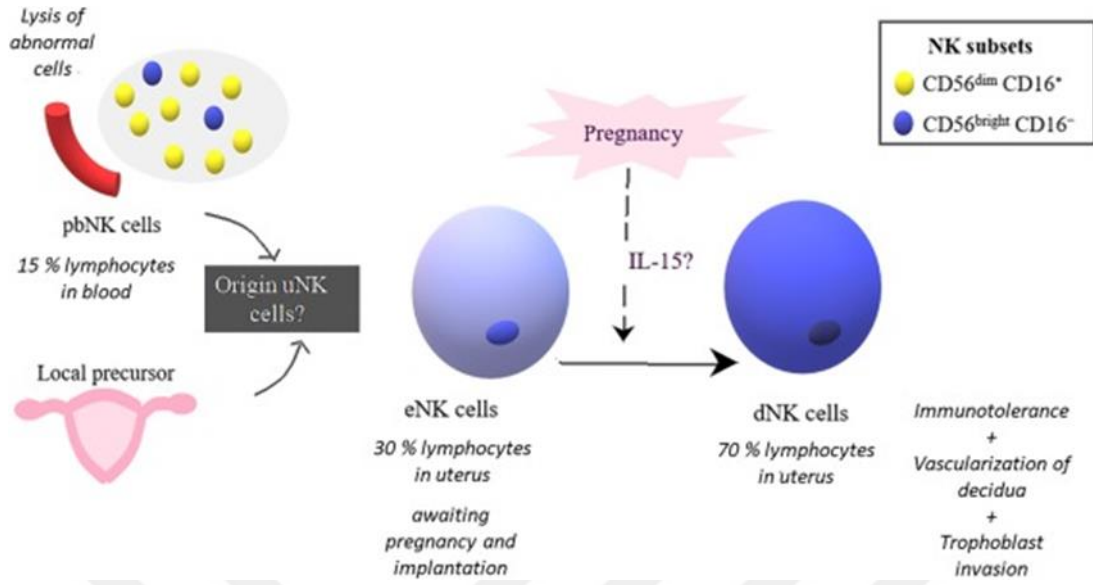
### 2.3.1 GENEL BİLGİ

Sağlıklı gebeliklerin sürdürülmesinde bağışıklık sisteminin rolü tam olarak anlaşılammıştır. Uterus ve fetus, immünolojik olarak farklı bölgeleri temsil etmesine rağmen, genellikle maternal immün sistemi, kendine özgü olmayan, paternal kalıtsal fetal antijenlere saldırmaz. Birkaç immünolojik değişiklik, fetüse ve düşüklere tolerans kaybı ile ilişkilendirilmiştir ve bu ortamda düzenleyici T hücrelerinin rolü iyi bilinmektedir [120]. İdiyopatik tekrarlayan gebelik kayıplarında (İTGK) kadınların periferik kanında ve uterusunda, sağlıklı bireylere kıyasla NK hücrelerinin önemli bir oranda daha yüksek olduğu bildirilmiştir [9, 10, 121] .

NK hücreleri, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçasıdır ve CD3 – CD56 + lenfositler olarak tanımlanırlar. CD56 + (nöral hücre adezyon molekülü) ekspresyonunun yoğunluğuna bağlı olarak, bunlar klasik olarak CD56bright (yüksek yoğunluk) ve CD56dim (düşük yoğunluk) NK hücrelerine ayrılır. CD56dim NK hücre alt kümesi, sitotoksitesisi ve antikora bağımlı hücre sitotoksitesinde (ADCC) yer alan bir reseptörün CD16 (FcyRIII) yüksek ekspresyonu ile karakterize edilir. Bunun tersine, CD56bright NK hücreleri, yüksek bir proliferatif aktivite ve bağışıklık düzenleyici sitokinlerin üretimi ile karakterize edilir. Diğer yüzey reseptörleri ile birlikte farklı CD56 ve CD16 ekspresyonları, bu hücrelerin sitolitik veya immünoregülatör kapasitesini modüle eder [122, 123].

### 2.3.2 SAĞLIKLI GEBELİKTE NK HÜCRELERİNİN FİZYOLOJİK ROLÜ

Periferik kan NK (pNK) hücreleri, kandaki toplam lenfositlerin yaklaşık %10-15'ini oluşturur. CD56dim alt kümesi yaklaşık %90'ını oluştururken, CD56bright alt kümesi ise periferik kandaki toplam NK hücrelerinin yaklaşık %10'unu oluşturur. CD56dim NK hücrelerinin ana rolü, enfekte veya tümör hücreleri gibi anormal hücrelerin parçalanmasıdır [8, 122, 123]. Öte yandan, uterus NK (uNK) hücreleri çoğunlukla CD56bright CD16– hücreleridir. Histolojik bir bakış açısına göre, uNK hücreleri pNK'den çok daha fazla granüle edilmiştir ve baskın bir sitolitik aktiviteye sahip olan pNK alt kümesine göre daha bağışıklık düzenleyici bir rol sergilerler (Şekil 1) [124, 125].



Şekil 1. NK hücrelerinin gebelikteki fizyolojik rolü [125].

Uterin NK hücrelerinin kökeni hala bilinmemektedir. Uterin NK hücreleri esas olarak daha immüno-regülatör bir role sahip olan CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> hücreleridir. Endometrial NK (eNK) hücreleri, endometriyumdaki toplam lenfositlerin üçte birini temsil eder ve embriyo implantasyonunda rol oynayabilir. Gebelik oluşuktan sonra, desidual NK (dNK) hücreleri uterustaki baskın lenfosit alt kümesidir ve gebeliğin sürdürülmesine katkıda bulunur. uNK hücrelerinde, endometriyal (eNK) ve desidual (dNK) NK hücrelerini ayırt etmek önemlidir. Bu bölünmenin önemi uterusun her dönemde farklı fonksiyonlarına dayanır [126, 127]. eNK hücreleri, endometrial lenfositlerin %30'unu temsil ederken, dNK hücreleri %70'e kadar ulaşarak gebelik sırasında uterusta baskın lenfosit popülasyonu haline gelir [126]. eNK hücreleri, dNK hücrelerinden daha az çalışılmıştır ve bunların işlevsel özelliklerinin öğrenilmesine hala ihtiyaç vardır. eNK hücrelerinin sayısı, adet döngüsünün proliferatif dönemden sekretuar fazına doğru çarpıcı bir şekilde artmaktadır. Bazı raporlara göre (KI67 proliferasyon markeri kullanarak) eNK hücrelerinin sekretuar fazda bölünerek embriyo implantasyonuna katılabilirliği düşünülmektedir [124, 126, 127]. Manaster ve arkadaşları, eNK hücrelerinin, gebe kalmayı bekleyen olgunlaşmamış bir alt kümeyi temsil edebileceği fikrini ileri sürdü. Bu hipotezde, interlekin (IL)-15 etkisi ile aktive edici reseptörler NKp30 ve NKp44'ün ekspresyonu ve interferon (IFN)- $\gamma$  ve indüklenebilir protein10 (IP-10) üretimi artarak eNK hücrelerinin dNK'ye farklılaşmasında gerekli bir aracı olduğu düşünülmektedir. IP-10, trofoblast istilasının düzenlenmesinde rol oynar

[126]. Öte yandan, dNK hücreleri maternal-fetal toleransla ilgilidir. Sitokinler ve kemokinlerin üretimi yoluyla desidua damarlanmasını düzenler. dNK hücreleri spiral arterlerin etrafına yayılır ve anjiopietin-1, anjiopietin-2, plasental büyüme faktörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü gibi proanjiojenik büyüme faktörleri salgılar ve bu damarların gelişimini ve bakımını kolaylaştırır [128, 129]. Dahası, dNK, trofoblast hücrelerindeki reseptörleri ile etkileşime giren IL-8, IFN-  $\gamma$  ve IP-10 salgılar ve bunların maternal spiral arterlere infiltrasyonunu teşvik eder [130].

Günümüzde uNK hücrelerinin kökeni konusunda bir fikir birliği yoktur ve hayvan modellerine dayanarak iki dalga hipotezi öne sürülmüştür; ilk dalga, desidualizasyonun başlangıcında dokuda yerleşik NK hücrelerinin lokal proliferasyonunu ifade eder ve ikinci dalga, plasentasyon sırasında dolaşımdaki NK hücrelerinin görevlendirilmesini varsayar [131]. Gösterilen şey, pNK hücrelerinin gen ekspresyonunun, kadınlarda gebeliğin korunmasına katkıda bulunan, eksozomlar tarafından aktarılan mRNA'lar ve proteinler aracılığıyla trofoblast tarafından modüle edilebilmesidir [132].

### **2.3.3 İDİYOPATİK TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA NK HÜCRELERİ**

Başarılı implantasyonun, uNK hücrelerinin aktivasyonu ve inhibisyonu arasında doğru bir denge gerektirdiği öne sürülmüştür [133]. Bu süreçte sitokinler, progesteron gibi hormonlar ve bazı NK hücre reseptörleri gibi çeşitli faktörler rol oynar.

#### **2.3.3.1 NK HÜCRE SİTOKİNLERİ**

##### **2.3.3.1.1 NK1 / NK2 HÜCRELERİ**

NK hücrelerinin sitokin üretimi ile ilgili olarak, NK1 ve NK2 olarak sınıflandırılabilirler. Bu terminoloji, CD4 T hücrelerinin T helper (Th) -1 ve Th2 alt kümelerine bir analogi olarak önerilir. Farklı sitokinlerin üretimi ile tanımlanırlar, NK1 tipi esas olarak IFN-  $\gamma$  ve Tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) üreticileridir, NK2 ise temel olarak IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 salgılar. Sağlıklı gebeliklerde NK1'den NK2 profiline gerekli bir geçiş belgelenmiştir [17, 18]. IFN-  $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ , spiral damarların trofoblast hücre büyümesini, oluşumunu ve yeniden şekillenmesini

teşvik etmede önemli bir role sahiptir. Bu sitokinlerin anormal seviyeleri, düşükler, gebelik diyabeti, preeklampsi veya fetal büyüme kısıtlaması gibi gebelik komplikasyonları ile ilişkilendirilmiştir [134, 135]. Ayrıca, düşüklerde düşük IL-10 seviyeleri bildirilmiştir [17]. Referans IFN- $\gamma$  ve IL-4 seviyeleri alınarak, idiopatik TKG öyküsü olan hamile kadınların dNK hücrelerinde daha yüksek bir NK1 / NK2 oranı bulunmuştur [136]. Öte yandan, TKG'lı kadınların CD56bright eNK hücreleri tarafından IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  üretimi, sağlıklı doğurgan kadınlara göre daha düşüktür [137]. Tekrarlayan düşük yapan hamile olmayan kadınların periferik kan CD56bright NK hücreleri, sağlıklı kontrollere göre orantılı olarak daha düşük IL-4 ve IL-10 seviyeleri ve daha yüksek IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  seviyeleri sergiler; bu, NK1 / NK2 oranında bir artış anlamına gelir [19]. Öte yandan, IFN- $\gamma$  ve immüno-supresif TGF- $\beta$  ve IL-4 üreten NK hücrelerinde bir artış gözlemlenirken, TKG hastalarının sağlıklı donörlere kıyasla immüno-regülatör sitokinler salgılanmasıyla dengelenen daha aktif bir bağışıklık sistemi gösterdiğini düşündürmektedir [10].

#### **2.3.3.1.2. NK22**

Son on yılda, NK22 hücreleri, IL-22 üretimi ile tanımlanan yeni bir uNK hücreleri alt kümesi olarak tanımlanmıştır [138]. Bu hücreler endometriyum ve desidua'da tespit edilmiştir, ancak üremedeki rolü hala net değildir. IL-22, konakçı savunmasında ve mukoza homeostazında rol oynar, bu nedenle NK22 hücrelerinin, adet döngüsü sırasında endometriyumun yenilenmesini teşvik ettiği öne sürülür. Ayrıca, desidua'daki NK22 hücreleri, trofoblast istilasını düzenleyebilen IL-22'nin ana kaynaklarıdır [139-141]. ROR $\gamma$ t reseptörünün, pNK ve eNK hücrelerindeki CD56 + IL-22 + ve CD56 + NKp46 + ROR $\gamma$ t + hücreleri arasındaki pozitif bir korelasyona dayanarak üremedeki NK22 hücreleri ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. İlginç bir şekilde, CD56 + IL-22 + hücrelerinin yüzdesi, periferik kanda ve endometriyumda IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  üretimi ile negatif korelasyon gösterir [140, 141].

TKG'lı kadınlarda, trofoblastta daha düşük bir IL-22 reseptörü (IL-22R) ekspresyonu ve desidua'da daha düşük bir IL-22 seviyesi bildirilmiştir [142].

## 2.3.3.2 NK HÜCRE AKTİVİTESİNİN MODÜLATÖRLERİ

### 2.3.3.2.1 SİTOKİN ORTAMI

IL-15 ve IL-18, maternal-fetal arayüzde bulunur ve burada NK hücre sitokin üretimini modüle etme kapasiteleri nedeniyle önemli bir rol oynarlar [143]. IL-15, NK hücre fonksiyonunun ve farklılaşmasının önemli bir düzenleyicisidir [144]. Stromal hücrelerin progesteron reseptörleri (PR) aracılığıyla aktivasyonlarına yanıt olarak IL-15 ürettikleri ve IL-15 düzeylerinin uNK hücrelerinin sayısı ile pozitif korelasyon gösterdiği gösterilmiştir [145]. Buna göre, hormonal döngünün proliferatif fazına kıyasla salgılama fazında ve daha sonra erken gebelikte IL-15'in önemli bir artışı gözlenmiştir [146]. Öte yandan, IL-15'in tip 2 sitokinlerin üretiminde ve dolayısıyla gebeliğin sürdürülmesinde gerekli bir uyarıcı olduğu görülmektedir [8, 122].

IL-18, IL-12 ile birlikte tip 1 ve tip 2 sitokinler arasındaki dengeyi düzenleyen anahtar sitokinlerdir. IL-18 tek başına bir tip 2 sitokin olarak kabul edilebilir, ancak IL-12 ile kombinasyon halinde bir tip 1 sitokin tepkisine yol açar. Bu nedenle, yüksek bir IL-18 / IL-12 oranı, tip 2 sitokinlere geçişe katkıda bulunurken, düşük bir IL-18 / IL-12 oranı, tip 1 yanıtı ve sonuç olarak bir IFN- $\gamma$  düzeyinde artışa yol açacaktır [147]. Bu sinerjistik etki, IL-12'nin IL-18R ekspresyonunu yukarı regüle etmesinden kaynaklanmaktadır [148]. İTGG'lı kadınlarda, sağlıklı fertil kadınlara göre, endometriyumda daha yüksek IL-12, IL-15 ve IL-18 seviyeleri ve periferik kan serumunda IL-12 ve IL-18 gözlenmiştir.

Son zamanlarda, desidua stromal hücrelerinin erken gebelikte IL-24 salgılanmasıyla CD56bright CD16<sup>-</sup> NK hücrelerinin farklılaşmasını modüle ettiği, CD16, perforin, Granzyme B ve IFN- $\gamma$  ekspresyonunu baskıladığı ve Killer Ig benzeri reseptör (KIR) ailesinin inhibitör reseptörleri, KIR2DL1 ve KIR3DL1 ve immünotolerans ile anjiyogenezde rol oynayan sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-8) ekspresyonunu teşvik ettiği öne sürülmüştür [149]. İTGG'da IL-24 hakkında veri yoktur, İTGG'lı kadınlarda uterusu IL-24 seviyeleri ve reseptörlerinin incelenmesi ilgi çekici olabilir.

### 2.3.3.2.2 NK HÜCRE RESEPTÖRLERİ

NK hücreleri, NK hücre sitotoksitesini ve sitokin üretimini düzenleyen geniş bir aktive edici ve inhibe edici reseptörler paneli ifade eder. NK hücre işlevi, tümör veya virüs ile enfekte olmuş hücreler gibi değiştirilmiş hücrelerin parçalanmasına yol açan bu reseptörler aracılığıyla sinyal gönderilerek yönetilirken sağlıklı hücreler korunur [150, 151].

Sitotoksik CD56dim CD16 + alt kümesinin, sağlıklı doğurgan kadınlara kıyasla TKG'lı kadınların periferik kanında yukarı regüle edildiği bildirilmiştir [9, 10]. Bu, diğer reseptörlerin bozulmuş ekspresyonu ile birlikte, gebelikte NK hücrelerinin işlevselliğini önemli ölçüde değiştirebilir.

### 2.3.3.2.2.1 NCR RESEPTÖRLERİ

Doğal Sitotoksite Reseptörleri (NCR), NKp30, NKp44 ve NKp46, tümör hücrelerinin ve enfeksiyonların kontrolünde önemli bir role sahip olan bir aktive edici reseptörler grubudur. NKp30 ve NKp46, aktif ve dinlenme NK hücrelerinde ifade edilirken, NKp44 yalnızca aktivasyon altında ifade edilir [152]. NCR, virüs, bakteri ve parazit proteinleri ve heparin sülfatlar gibi çok çeşitli moleküller tarafından aktive edilebilir. NKp46'nın insan üremesindeki önemi belirlenmiştir. TKG'lı hamile olmayan kadınların periferik kanında NKp46 + CD56 + hücrelerinin yüzdesinde azalma bulundu [153]. Öte yandan TKG öyküsü olan gebe kadınlarda, hem 12. hem de 20. gebelik haftalarında NKp46 + CD56bright NK hücre yüzdesinde bir azalma tanımlandı [137]. NKp46'nın bu azalmış ekspresyonu, TKG'lı kadınların eNK hücrelerinde de tanımlanmıştır [137]. NKp46, NK hücrelerinin sitokin üretiminde rol oynar [154, 155]. Aynı NKp46bright CD56bright fenotipine sahip olmalarına rağmen, pNK hücreleri ve eNK hücreleri farklı sitokin profili gösterir; NKp46bright CD56bright pNK hücreleri esas olarak IFN- $\gamma$  üreticileridir, NKp46bright CD56bright eNK hücreleri ise daha fazla IL-4 üretir [156].

### 2.3.3.2.2 TIM-3

İnhibitör reseptör TIM-3 (T-hücresi immünoglobulin alanı ve müsin alanı içeren molekül-3), Galactin-9 ligandı ile bağımlı bir yolda, trofoblasta karşı NK hücresi sitotoksitesini sınırlar [157, 158]. TIM-3, dNK hücrelerinin %60'ından fazlasında eksprese edilir ve sitokinlerin üretimini düzenler. TIM-3+ hücreleri daha fazla IL-4 üretirken, TIM-3- hücreleri daha fazla TNF- $\alpha$  ve perforin ifade eder [157]. TKG'lı hamile kadınların pNK hücrelerinde TIM-3'ün analizi, bu markerin daha düşük bir ekspresyonunu ve ayrıca TIM-3 ekspresyonunu düzenleyen anti-inflamatuar sitokin TGF- $\beta$ 1'de bir düşüş gösterir [158, 159].

### 2.3.3.2.3 KIR - HLA-C

Maternal KIR'lerin ve fetal HLA-C allellerinin (C1 veya C2 genotipleri) belirli kombinasyonlarının gebelik sonuçlarını düzenleyebileceği açıklanmıştır. KIR gen ailesi, A ve B olarak adlandırılan iki farklı haplotipe sınıflandırılmıştır. KIR A haplotipi, inhibe edici profilli yedi gen (KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR3DL3) ve sıklıkla işlevini engelleyen bir mutasyon sunan yalnızca bir aktive edici reseptör (KIR2DS4) içerir.

KIR B haplotipi, inhibitör (KIR2DL2 ve KIR2DL5) ve aktive edici (KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 ve KIR3DS1) reseptörleri kodlayan değişken sayıda gen içerir.

Farklı KIR allelleri ile HLA-C varyantları arasındaki spesifik etkileşimlerin NK hücrelerinin sitotoksitesinin kontrolünü ve dolayısıyla gebeliğin komplikasyonlarını nasıl etkileyebileceği araştırılmaktadır [160, 161].

Maternal KIRAA'nın fetal C2 genotipleri ile kombinasyonunun, KIR2DL1'in aracılık ettiği ve fetal büyüme kısıtlılığı ve preeklampsi ile ilişkili NK hücrelerinin güçlü bir inhibisyonuna yol açtığı bildirilmiştir. NK hücrelerinin bu güçlü inhibisyonu, kusurlu spiral arter yeniden şekillenmesi ile ilişkilidir. KIRAB genotipine ve C2 genotipine sahip fetusa sahip kadınlarda, aktive edici KIR2DS1'in (KIRB haplotipi) ifadesi, KIR2DL1 (KIRA haplotipi) tarafından aracılık edilen inhibisyonu dengeleyebilir ve gebelik komplikasyonlarını önleyebilir [133, 162] KIRAB ve KIRBB ve fetal C2 genotipleri, dNK hücresi, trofoblast hücreleriyle

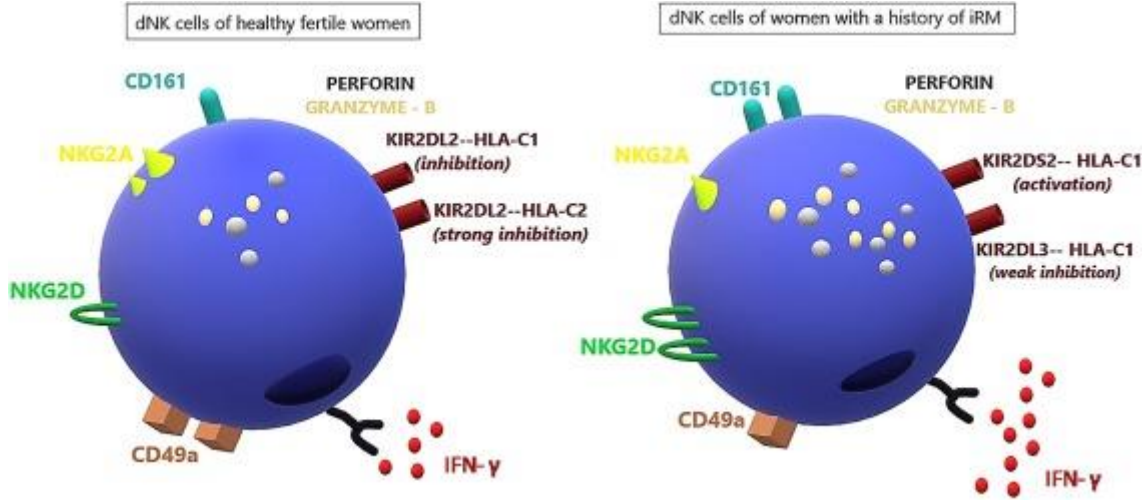
etkileşimden sonra aktive olur ve plasentasyonu artıran GM-CSF gibi daha yüksek sitokin seviyeleri salgılar [133, 162].

KIR'lerin ve HLA-C genlerinin tekrarlayan düşüklerin ortaya çıkmasındaki spesifik anlamı hala belirsizdir. TGK hastalarından oluşan bir kohortu sağlıklı donörlerle karşılaştıran bazı çalışmalar, bunun NK hücrelerinin aktivasyonuna karşı bir dengesizlik olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 2) [161].

Bir çalışmada, İT GK vakalarında ( $\geq 3$  düşük) fetal HLA-C2 (güçlü inhibisyon) ile birlikte maternal KIR2DL1 sıklığında bir azalma ve fetal HLA-C1 (aktivasyon) ile birlikte daha yüksek bir maternal KIR2DS2 frekansı bulunmuştur [163]. Ayrıca, sağlıklı doğurgan kadınlara kıyasla İT GK'lı kadınlarda ( $\geq 3$  düşük) fetal HLA-C1 ile kombine maternal KIR2DL2 sıklığının daha düşük olduğu gözlemlendi [164]. Öte yandan, TGK vakalarında ( $\geq 3$  düşük) KIR2DL3 için daha yüksek homozigot kadın sıklığı fark edildi, bu da fetal HLA-C1 ile zayıf bir inhibisyona aracılık edebilir [165]. Bir tartışma konusu olmasına rağmen, bazı yazarlar KIR genotiplemesini kliniklerde kullanılması için şu anda hiçbir gerekçe olmadığını savunuyorlar, çünkü KIR ile trofoblast arasındaki ilişkinin ilk trimesterde kan sağlamadaki başarısızlığını net bir şekilde tanımlamak için büyük kohort çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [162].

#### **2.3.3.2.2.4 DİĞER RESEPTÖRLER**

Adezyon molekülü olan CD49a, eNK hücrelerinde önemli ölçüde daha yüksek olmasına rağmen, her iki uNK hücresi tipinde eksprese edilir. CD49a seviyeleri menstrual döngü sırasında proliferatif aşamadan sekretuar faza doğru giderek artar [124]. CD49a, dNK hücrelerinin trofoblasta erken yapışmasını ve göçünü düzenler ve perforin, granzim B ve IFN- $\gamma$  ekspresyonunu azaltarak bunların sitotoksitesini önler. TGK'lı kadınların dNK hücrelerinde, perforin ve granzim B'nin artmasıyla sonuçlanan bu yapıcının daha düşük ekspresyonu bildirilmiştir (Şekil 2) [166]. Öte yandan, TGK'lı kadınların pNK hücrelerinde aşırı CD69, CD161, CD94, NKG2A ve NKG2D (lenfosit aktivasyonunun erken bir belirteci) ekspresyonu tanımlanmıştır [10, 167]. NKG2D, inhibe edici reseptör NKG2A'nın azalmasıyla birlikte tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan kadınların dNK hücrelerinde de yukarı doğru düzenler [168]. Ek olarak, dNK hücreleri tarafından IFN- $\gamma$  üretimi de TGK vakalarında çok daha yüksektir (Şekil 2) [168].



Şekil 2. İdiyopatik TGK'lı kadınlardan elde edilen decidual NK (dNK) hücreleri, inhibisyon eksikliğinden (örn., Aktive edici KIR veya zayıf inhibitör KIR ve azalmış NKG2A ekspresyonunun baskınlığı), aktive edici reseptör NKG2D ekspresyonunun artması ve proinflamatuvar sitokinlerin daha yüksek üretimine bağlı olarak daha aktif bir durum sergiler [161].

### 2.3.3.2.3 PROGESTERON

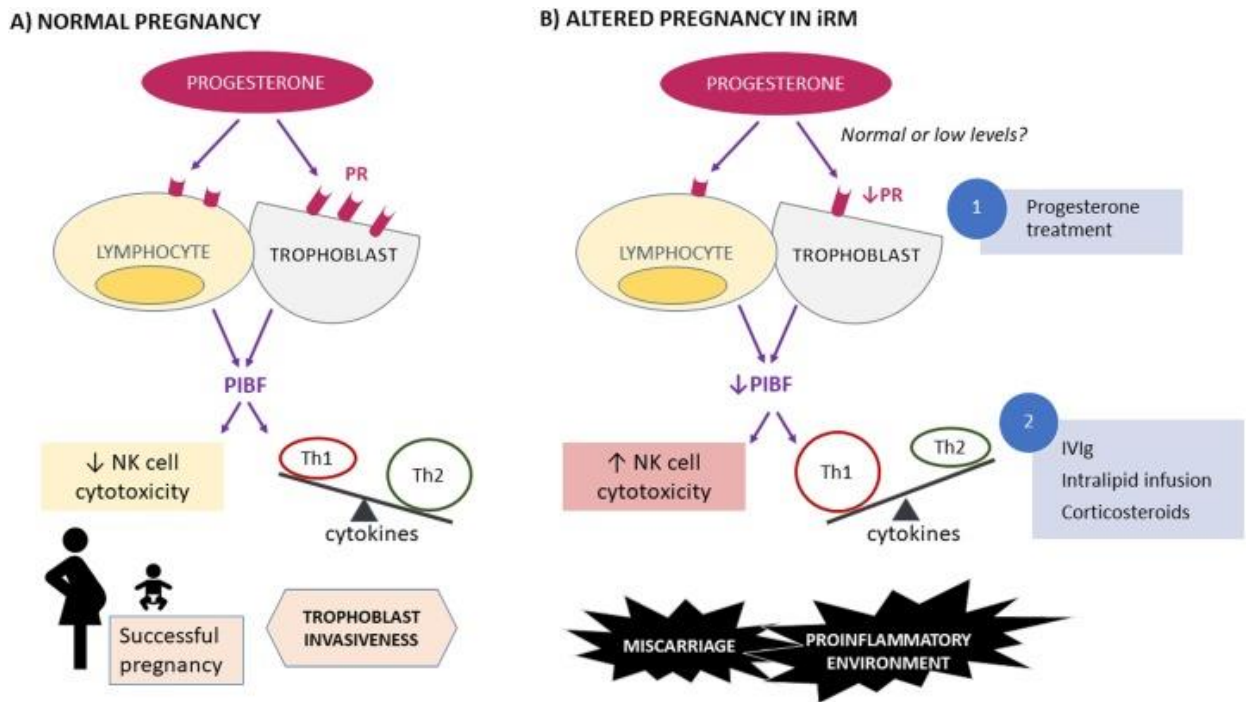
Üremede gerekli bir hormon olan progesteron, gebeliğin korunmasına katkıda bulunur. UNK hücrelerinde PR eksikliği olduğu bilinmektedir, ancak dolaylı olarak bu hormon NK hücre aktivitesini ve sitokin dengesini modüle edebilir [169]. Progesteron, PR eksprese eden lenfositler tarafından progesteron kaynaklı bloke edici faktör (PIBF) üretimini teşvik eder ve ayrıca trofoblast hücreleri tarafından eksprese edildiği bulunmuştur [169].

Normal gebeliklerde progesteron ve PIBF'nin hamilelik sırasında arttığı ve korunmalarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir [170]. PIBF, NK hücre aktivitesini modüle eder, sitokin üretimini düzenler (Şekil 3A) ve dengeyi, PIBF ekspresyonu ile trofoblast invazivliği arasında ters bir korelasyon ile Th2 tipi sitokinlere kaydırır [169, 171]. Bu anlamda TGK'lı kadınların trofoblast ve desidua'sında daha düşük PIBF ve PR ekspresyonu bulunmuştur (Şekil 3B) [172].

TGK'lı kadınlardan alınan lenfositler PIBF ile kültürlendiğinde, IL-4 ve IL-10 seviyelerinde bir artış bulunurken, bu da PIBF'nin bir immünomodülatör faktör olarak hareket edebileceğini düşündürmektedir [173].

Stromal ve dendritik hücreler, PR'leri aracılığıyla aktivasyon üzerine IL-15 ve IL-18 üreten ara hücreler olarak davranırlar [145, 174].

Sonuç olarak, hormonal döngünün proliferatif fazına kıyasla salgılama fazında ve daha sonra progesteron seviyelerinde olduğu gibi erken gebelikte IL-15 seviyesinde önemli bir artış gözlenir [175]. IL-18 ile uNK sayısı arasında da pozitif bir ilişki bulunmuştur [174]. Progesteronun ayrıca HLA-G ekspresyonunu arttırdığı öne sürülmüştür [176]. Hamilelik sırasında HLA-G, trofoblast hücreleri tarafından yüksek oranda ifade edilir, KIR2DL4 ve ITL-2'ye (inhibitör reseptörler) bağlanarak fetüse karşı bağışıklık toleransına aracılık eder [177]. TGK'lı kadınlarda anormal HLA-G ekspresyonuna rastlanmamıştır [178, 179].



Şekil 3. İTGM'de PIBF'un Rolü.

A) Progesteron, lenfositler ve trofoblast hücreleri tarafından PIBF üretimini teşvik eder. PIBF, gebeliğin sürdürülmesinde, NK hücrelerinin sitotoksitesinin kontrol edilmesinde ve Th2 tipi sitokinlerin salgılanmasının desteklenmesinde önemli bir rol oynar.

B) İTGM'li kadınlarda, düşük PR ekspresyonu veya luteal yetersizlik nedeniyle PIBF üretimi azalır. 1. Progesteron tedavisi bu kusuru geri alabilir. 2. Ek olarak, IVIg, intralipid infüzyonlar veya kortikosteroidler NK hücre fonksiyonunu aşağı regüle etmek için kullanılabilir.

İRM: İdiyopatik tekrarlayan gebelik kaybı; IVIg: İntravenöz immünoglobulin; PIBF: Progesteron kaynaklı bloke edici faktör; PR: Progesteron Reseptörleri.

Özet olarak, farklı çalışmalar inhibisyon eksikliğini ve dolayısıyla TGK'da NK hücrelerinin aktivasyonunun arttığını göstermektedir. Bununla birlikte, TGK'lı kadınlarda NK hücre inhibitör reseptörlerinin incelenmesi, öncelikle MHC sınıf I spesifik reseptörler, KIR ve C-

tipi lektin reseptörlerine (CD94-NKG2) odaklanmıştır. KIR-HLA-C etkileşimleri, NK hücre davranışının anlaşılmasında oldukça önemli olmasına rağmen, spesifik olmayan MHC sınıf I inhibitör reseptörlerinin incelenmesi, NK hücrelerinin TKG'daki rolünü açıklamak için de uygun olabilir. Bu reseptörler arasında TIGIT, TACTILE (CD96 olarak da bilinir), PVRIG, TIM-3 ve Lag-3 bulunur [180, 181]. Bu reseptörlerden, TKG öyküsü olan hamile kadınların periferik kanında daha düşük bir TIM-3 + CD56 + hücresi yüzdesi ve uterustaki TIM-3 + dNK hücrelerinin yüzdesinin artması ile sadece TIM-3 çalışılmıştır [182, 183]. NKp46 reseptörü de önemli bir rol oynayabilir, TKG'lı kadınların eNK hücrelerinde ve pNK'sında sağlıklı doğurgan kadınlara göre ekspresyonu daha düşüktür [137, 153]. Ayrıca, NKp46, daha fazla çalışma gerektiren yeni NK22 alt kümesiyle de ilişkili görünmektedir [141].

TKG'lı kadınların sitokin profili de değişmiş bulunmaktadır. Bir yandan TKG'lı kadınlarda periferik kan ve desidua CD56bright NK hücrelerinde NK1 / NK2 oranında artış olduğu bildirilmiştir [19, 136]. Diğer taraftan, TKG'lı kadınların eNK hücrelerinde daha düşük IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  seviyeleri tespit edilmiştir; bu, trofoblast invazyonunun ve spiral arterlerin yeniden şekillenmesinin ilk adımlarını değiştirebilir.

Kanıtlara göre, PIBF, gebeliğin sürdürülmesine katkıda bulunan NK hücrelerinin önemli bir immünomodülatörü olabilir [171, 173, 184]. PIBF seviyeleri, önerildiği gibi progesteron eksikliğine bağlı olarak ve aynı zamanda trofoblastta daha düşük PR ekspresyonu nedeniyle azaltılabilir [172]. Ayrıca kortizol, progesteronun kortikotropin salgılayan hormon üzerindeki inhibitör etkisini antagonize ederek, preterm doğumlara katkıda bulunan proinflamatuvar bir ortamı teşvik ettiği için de katkıda bulunabilir [185].

### **3.GEREÇ VE YÖNTEM.**

Çalışmaya Ocak 2020 ve Ocak 2021 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde polikliniğe başvuran, 2 veya daha fazla gebelik kaybı olan kadınlar hasta grubu olarak; 2 veya daha fazla canlı doğum yapmış, düşüğü olmayan kadınlar ise kontrol grubu olarak alındı. Bir hastayı tekrarlayan gebelik kaybı olarak kabul etmek için 20. gebelik haftasından önce 2 veya daha fazla düşük yapmış olma kriteri olarak kabul edildi.

Tekrarlayan gebelik kaybı olan, 20–40 yaş arası toplam 30 hasta çalışmaya dahil edildi. Bütün kadınlar normal parental kromozoma sahipti. Hepsi antifosfolipid antikorlar (ANA, Anti

DNA, Antikardiyolipin-IgM, Antikardiyolipin-IgG, Antifosfolipid-IgM, Antifosfolipid Ig-G), Anti Toksoplazma-IgM, Antirubella-IgM, hipotiroidi ya da hipertiroidi (serbest T4 ve TSH değerlerine bakıldı) açısından negatifti. Bütün hastalar normal HSG'ye sahipti ve hiçbirinde menstrüel siklusun 26. gününde 8 no'lu Hegar bujisi ile bakılan servikal yetmezlik yoktu. Hiçbir hastada trombofili kriterine (Antitrombin III eksikliği, Protein C eksikliği, Protein S eksikliği, Faktör V Leiden mutasyonu, Protrombin 2010 mutasyonu, MTHFR 677 mutasyonu, MTHFR 1298 mutasyonu) rastlanmadı. Kontrol grubu ise Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'ne başvuran gebelik kaybı öyküsü olmayan, 2 veya daha fazla doğum yapmış 20–40 yaş arası 10 kadından oluştu.

Çalışmada, hasta dosyaları retrospektif olarak tarandı. Katılımcıların demografik ve klinik özellikleri hastane girişinde kaydedilmişti.

Çalışmaya hasta grubunda alınan kişiler poliklinik başvuru sırasına göre gelişigüzel alınmıştır ve kontrol grubuna alınacaklar basit rasgele örnekleme ile atanmıştır.

Tüm hasta ve kontrol grubundaki kişilerin kan örnekleri Ankara'da, Mikrogen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi laboratuvarında çalışılmıştır.

NK hücre aktivitesi için periferik kan örneklerinden ELİSA yöntemi ile NK VUE testi kullanarak IFN- $\gamma$  miktarı ölçüldü. Her hastadan örnek olarak alınan 1ml kan immunomodülatör sitokin (PROMOCA) ve antikoagulan olarak heparin içeren NK VUE tüpüne alındı. Kan alma işleminden 15dk sonra içinde kan olan NK VUE tüpleri inkübatör içine dik bir şekilde konularak 37°C'de 20-24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası berrak plazma örneği alınarak 1.5ml'lik mikrosentrifüj tüpüne aktarıldı. NK hücreleri aktive olduktan sonra, kantitatif ELİSA yöntemiyle NK hücreleri tarafından salgılanan IFN- $\gamma$  miktarını belirlemek için ELİSA test kiti kullanıldı. Bu amaçla, anti-IFN- $\gamma$  monoklonal antikor, bir mikrokuyucuk plate önceden absorbe edilmiştir. Numuneler kuyucuklara pipetle konularak IFN- $\gamma$  ELİSA kuyucuklarındaki antikora bağlanmaya bırakıldı. Bağlanmamış tüm materyal yıkandıktan sonra, HRP kompleksi kuyucuklara ilave edildi. Herhangi bir bağlanmamış antikor-HRP kompleksini uzaklaştırmak için bir nal yıkamayı takiben, substrat çözeltisi kuyucuklara eklenip renk değişimi için bekletildi. 450 nm'de absorbans ölçülerek NK hücreleri tarafından salgılanan IFN- $\gamma$  miktarı, bir IFN- $\gamma$  standart eğrisine kıyasla null olarak niceleştirildi. Aktive NK testi için normal referans aralığı <1800 pg/ml olarak kabul edildi.

Flow sitometri tekniği heparinli taze kan üzerinde yapıldı. Flow sitometri özellikleri: BD / Yazılım: Cell Quest (Macintosh-ABD) / Model: Facscalibw / Analiz: Dört renk (FITC, PE, PERCP, APC) / Lazer: Mavi 488 nm ve Kırmızı 635 nm. Periferik kan hücreleri, boyamadan

önce fosfat tamponlu salin ile iki kez yıkandı, ardından renkli floresanla aktive edilmiş hücre sınıflandırma taraması kullanılarak, NK hücreleri, monoklonal antikörlerle (PARTEC Almanya) CD158a, CD8, CD16 ve CD56'ya boyandıktan sonra belirlendi. Flow sitometrik cihazı ile yaklaşık 100 000 hücre analiz edilerek CD16, CD56, CD8 ve CD158a hücrelerin yüzdelik oranları hesaplandı.

### 3.1. İstatiksel Analiz

İstatiksel analiz için toplanan tüm veriler Statistical Package for the Social Sciences, sürüm 20, SPSS Inc., Chicago, IL (SPSS) ile analiz edildi. Verilerin normal dağılımları Kolmogrov-Smirlov testi ve histogramlar ile belirlenmiştir. Normal dağılım gösteren sürekli değişkenler bağımsız T testi ile, normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenler ise Mann Whitney U testi ile analiz edilmiştir. Kategorik değişkenler için Ki-Kare testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri  $P \leq 0.05$  olarak belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'ne, Ocak 2019- Ocak 2020 tarihleri arasında başvuran ve tekrarlayan gebelik kaybı tanısı alan 30 hasta ve aynı tarihler arasında aynı kliniğe başvuran 10 sağlıklı fertil bayan olmak üzere toplam 40 kadın çalışmaya alınmıştır.

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol grubun demografik özelliğine bakıldığında;

Kontrol grubunda abort eden hasta yoktu, hiçbir hasta sigara kullanmıyordu, hiçbir hastada akrabalık yoktur.

Hasta grubunun yaş ortalaması  $28.2 \pm 4.4$ ; kontrol grubunun yaş ortalaması  $30.4 \pm 2.0$  idi. İki grup arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi ( $p=0.462$ ).

Hasta grubunun gebelik sayısı ortalaması 3(3, 12), kontrol grubunun gebelik sayısı ortalaması 3(3, 4) idi. İki grup arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi ( $p=0.101$ ).

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan kadınların demografik özelliklerinin (yaş, gebelik sayısı, doğum sayısı, yaşayan sayısı ve abortus sayısı) karşılaştırmasına ait veriler Tablo 1'de sunulmuştur

**Tablo 1:** Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri

	Vaka grubu(n=30)	Kontrol grubu(n=10)	P değeri
Yaş	28.2±4.4	30.4±2.0	0.462
Gravida	3(3, 12)	3 (3, 4)	0.101
Parite	0(0, 3)	3(3,4)	<0.001*
Canlı doğum	0(0, 3)	3 (3,4)	<0.001*
Veriler ortalama±standart sapma, ortanca (en düşük, en yüksek) ve sayı (%) olarak verilmiştir.			
Anlamlı p değerleri “*” ile gösterilmiştir.			

Grupların NK aktivitesi seviyesi ortanca değerleri vaka grubunda 2145 (264, 3900), kontrol grubunda 1380 (500, 4000) idi. İki grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0.662).

NK aktivitesi yüksek olan ortalama hasta sayısı vaka grubunda 17 (%56.7), kontrol grubunda 5 (%50) idi. İki grup arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi (p=0.714).

CD56+CD16+ subgrubun yüzdeler oranların ortanca değeri vaka grubunda 52.3 (23.7, 70.7), kontrol grubunda 49.6 (23.7, 66.7) idi. İki grup arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi (p=0.574).

CD56+CD16- subgrubun yüzdeler oranların ortanca değeri vaka grubunda 47.6 (29.2, 76.23), kontrol grubunda 50.3 (33.2, 76.2) idi. İki grup arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi (p=0.563).

CD8+ subgrubun yüzdeler oranların ortanca değeri vaka grubunda 27.4 (1.32, 45.52), kontrol grubunda 24.61 (8.66, 36.10) idi. İki grup arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi (p=0.743).

CD158a+ subgrubun yüzdeler oranların ortanca değeri vaka grubunda 10.52 (2.75, 53.40), kontrol grubunda 9.48 (2.75, 40.21) idi. İki grup arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi (p=0.662).

CD158-CD8- subgrubun yüzdeler oranların ortanca değeri vaka grubunda 53.58 (0.47, 75.58), kontrol grubunda 57.06(31.68, 75.58) idi. İki grup arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi (p= 0.217).

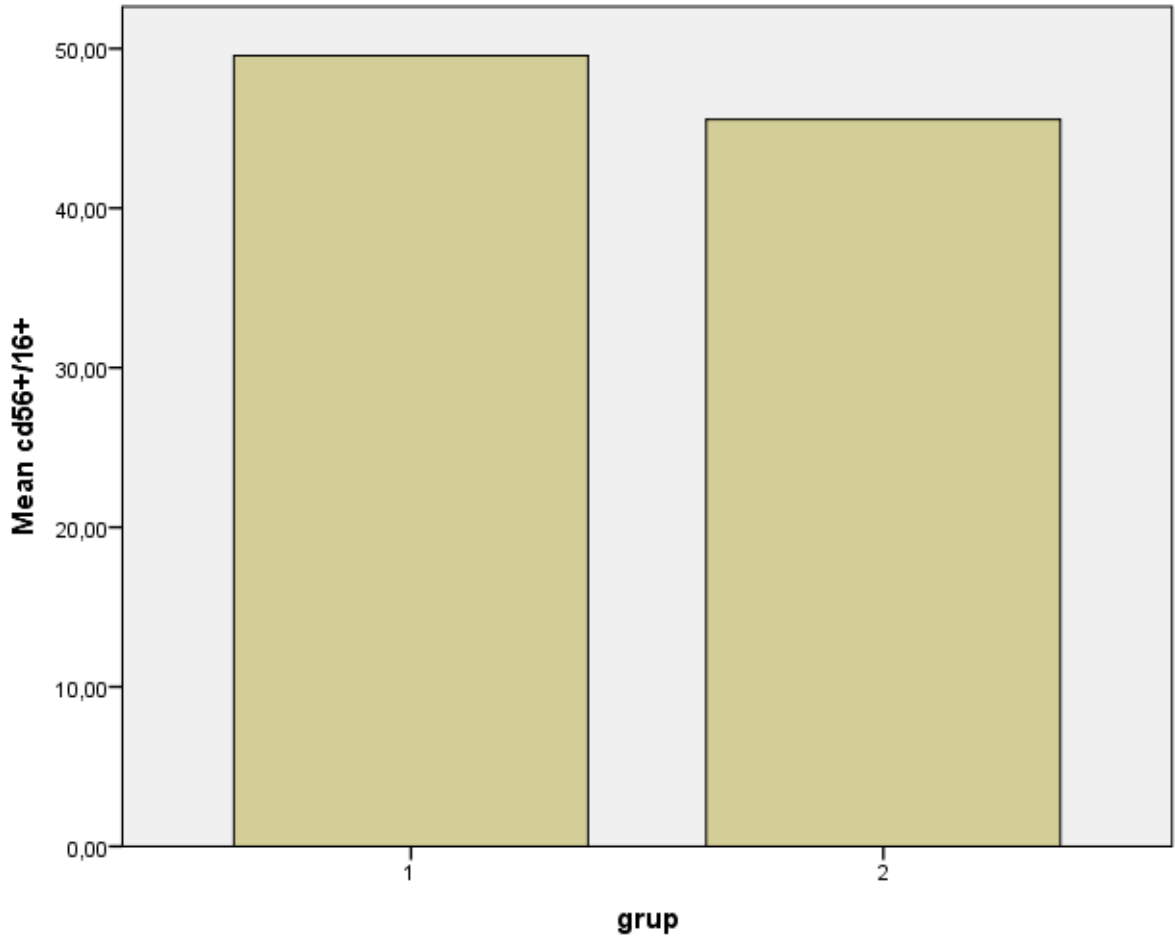
CD158+CD8+ sub grubun yüzdelik oranların ortanca değeri vaka grubunda 6.86 (2.44, 27.79), kontrol grubunda 5.62(4.05, 8.22) idi. İki grup arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi (p=0.381).

Grupların laboratuvar değerlerinin karşılaştırılması Tablo 2' de sunulmuştur.

**Tablo 2.** Grupların laboratuvar sonuçlarının karşılaştırılması

	Vaka grubu(n=30)	Kontrol grubu(n=10)	P değeri
NK aktivitesi seviyesi	2145 (264, 3900)	1380 (500, 4000)	0.662
NK aktivitesi yüksek olan hasta	17 (%56.7)	5 (%50)	0.714
CD56+CD16+	52.3 (23.7, 70.7)	49.6(23.7, 66.7)	0.574
CD56+CD16+ ≥%35	26 (%83.3)	6 (%60)	0.126
CD56+CD16-	47.6(29.2, 76.23)	50.3 (33.2, 76.2)	0.563
CD56+CD16- ≥%65	5(%16.7)	4 (%40.0)	0.126
CD8+	27.4(1.32, 45.52)	24.61(8.66, 36.10)	0.743
CD8+ >%35	4 (%13.3)	1 (%10)	0.783
CD158a+	10.52(2.75, 53.40)	9.48 (2.75, 40.21)	0.662
CD158a+ >%8	17(%56.7)	5 (%50.0)	0.714
CD158-CD8-	53.58 (0.47, 75.58)	57.06(31.68, 75.58)	0.217
CD158-CD8- >%50	18 (%60.0)	8 (%80)	0.251
CD158+CD8+	6.86 (2.44, 27.79)	5.62(4.05, 8.22)	0.381
CD158+CD8+ >%7	14(%46.7)	3(%30.0)	0.356
NK, naturel killer. Veriler ortalama±standart sapma, ortanca (en düşük, en yüksek) ve sayı (%) olarak verilmiştir. Anlamli p değerleri “*” ile gösterilmiştir.			

**Grafik 1.** Vaka grubu (1) ve kontrol grubu (2) CD56+16+ hücre yüzdelilerinin karşılaştırılması.



## 5. TARTIŞMA

Tekrarlayan düşüklerin meydana gelmesiyle ilgili mekanizmalar tam olarak anlaşılmamıştır. Son on yılda Doğal Öldürücü hücrelerin düşükle ilişkili olup olmadığını belirlemek için NK hücrelerinin spesifik özellikleri periferik kan ve uterusu incelenmiştir. Farklı yazarlar, tekrarlayan düşükleri olan kadınlarda, kontrol fertil kadınlara kıyasla artan sayıda uterusu ve periferik kan NK hücreleri tanımlamışlardır [9, 10, 121]. Ancak, düşükle ilişkisi kesinleşmemiştir. Tekrarlayan düşükleri olan hastalarda, desidua NK hücrelerinin inhibisyonunun eksikliği gözlemlenebilir, bu da daha yüksek proinflatuar sitokin seviyeleri ile karakterize edilen daha aktif bir duruma yol açar [161]. Periferik kanda, IFN- $\gamma$  seviyelerinde bir artış ve IL-4'te bir azalma ile NK hücreleri tarafından disfonksiyonel bir sitokin üretimi de rapor edilmiştir[19].

Yasuhiko Ebina ve arkadaşları, yaptıkları prospektif bir çalışmada NK hücre aktivitesinin tekrarlayan düşük etiolojisi ile ilişkisini araştırmış ve bu kadınlarda sonraki gebeliklerin sonuçları için NK hücre aktivitesinin prediktif değerini incelemişler. Bu çalışmaya dahil edilen TGK öyküsü olan 160 kadında periferik NK hücre aktivitesi ölçülmüş ve sonuçlar TGK etyolojisine ve gebe kalan kadınlarda gebelik sonuçlarına göre karşılaştırılmıştır. İdiyopatik TGK'lı hastalarda NK hücre aktivitesi, TGK'nın bilinen etyolojisine sahip olanlardan önemli ölçüde daha yüksekti. Normal kromozom karyotipli fetüslerin düşük yapması ile sonuçlanan, sonradan tekrar gebe kalan kadınlarda NK hücre aktivitesi, canlı doğum yapanlara göre daha yüksekti ( $p<0.05$ ). Ek olarak, NK hücre aktivitesi %33 ve üzeri olan kadınlarda normal kromozom karyotipli düşük riski daha yüksekti (göreceli risk 3.4, %95, güven aralığı 1.3- 8.7). Bu çalışma sonucuna göre, periferik NK hücre aktivitesinde bir artış normal kromozom karyotipli düşükler ile ilişkilendirildi ve bu artış, TGK'nın altında yatan patofizyolojide rol oynayabilir [186].

Başka bir çalışmada, Lee ve arkadaşları, %34.3 ve üzeri kesme değerine sahip yüksek NK hücre aktivitesinin TGK ile ilişkili olduğunu bildirmiştir [111].

Çernişov ve arkadaşları, İVF başarısızlığı olan kadınlarda artmış periferik NK hücre sitotoksitesinin (NKc) rolünü değerlendirmiştir. Yüksek NKc'lı 33 hastayı içeren APAS negatif toplam 79 kadında lenfosit alt kümeleri, hücre içi sitokinler (IFN- $\gamma$ , İL-4, TNF- $\alpha$ , İL-10), aktive edici belirteçlerin ekspresyonu (CD69, HLA-DR, CD8, KIR(CD158a), CD95 ve kemokin reseptörleri (CXCR3, CCR4) flowsitometrik yöntem ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, implantasyon başarısızlığı (İB) olan kadınlarda, NKc seviyeleri İVF-de başarılı olan kadınlara göre daha yüksek saptanmıştır. İmplantasyon başarısızlığı, NK hücrelerinde daha yüksek CD8, CD158a ve HLA-DR ekspresyonu, T-lenfositlerde belirteçleri aktive etme ve İL-4+ T lenfosit alt kümeleri seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir. İVF başarısı için tek yükselmiş NKc-nin tahmin değeri 0.85 iken diğer iki anormal parametrenin eklenmesi 0.39'un altına düşmesine neden olmuştur.

Çalışmanın sonucuna göre, yüksek NKc, İVF sikluslarında implantasyon için kritik olmasa da, negatif faktördür. İVF başarısızlığının, immun mekanizması sadece yüksek NKc'yi değil, aynı zamanda NK hücrelerinde CD8 ve CD158a'nın artmış ekspresyonu, T lenfosit aktivasyonu ve azalmış Th2 parametreleri gibi bazı diğer faktörleri de içerir [187].

Bununla birlikte, Seshadri ve arkadaşlarının yaptığı bir sistematik inceleme ve meta-analiz, infertil kadınlarda periferik NK hücreleri sayısının fertil kontrollerden daha yüksek olduğunu göstermiştir [188]. Ek olarak, aynı çalışmada TGK'lı kadınlarda periferik NK hücrelerinin sayısı ve yüzdesi kontrollerdekinden daha yüksektir [188].

NK hücre sitotoksitesisi ve kadın doğurganlığı arasındaki ilişki ile ilgili bir dizi kanıt mevcut olmasına rağmen [189], pNK'nin sitotoksik aktivitesi ve TKG arasındaki ilişki ile ilgili farklı görüşler formüle edilmiştir [188, 190, 191].

pNK hücreleri, plasantasyon için immün toleranslı bir ortam oluşturmaya katkıda bulunsa da, normal koşullar sırasında enfeksiyonlarla savaşmak için belirli bir sitotoksik potansiyele sahip olmaları gerekir [192]. Bazı çalışmalarda, TKG'lı hastalarda yüksek pNK hücre oranı [191, 193] veya sitotoksitesite rapor edilmiştir [194]. Bununla birlikte, diğer çalışmalarda, fertil kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TKG olgularında düşük NK hücre oranını [195] veya daha düşük pNK sitotoksitesisini gösteren çelişkili sonuçlar bildirilmiştir [196]. Büyük bir kohort çalışması, sonraki gebelik sonucu ile pNK sitotoksitesisi arasındaki ilişkinin doğrusal olmadığını ve hem düşük hem de yüksek pNK sitotoksitesisine sahip hastaların düşük yapma oranının yüksek olma eğiliminde olduğunu ileri sürdü [197]. Bu nedenle, fertil kontrole kıyasla hem daha yüksek pNK sitotoksitesisine sahip TKG hastaları, hem de daha düşük pNK sitotoksitesisine sahip olan TKG hastaları ciddi şekilde dikkate alınmalıdır.

NK sitotoksitesisi, inhibe edici ve aktive edici reseptörler arasındaki karmaşık etkileşim tarafından kontrol edilir [198, 199]. Aslında, NK hücreleri, aktive edici reseptör sinyalleri baskın olduğunda, sitotoksik granüller salgılayarak sitotoksitesilerini gösterirler [200].

Bizim çalışmada, TKG hastalarında düşük etiyojisini araştırmak için TKG'lı kadın ve kontrol fertil grubun pNK hücrelerinin sitotoksitesisi ile ilişkili parametreler değerlendirildi. Her ne kadar çalışmamızda tekrarlayan gebelik kaybı olan grubun pNK aktivite seviyesi ortanca değerleri kontrol grubuna göre nispeten daha yüksek saptansa da gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p=0,448$ ). TKG ve kontrol grupları arasında pNK hücrelerinde CD8, CD158a (KIR2DL1) ekspresyonları ve IFN- $\gamma$  miktarı açısından anlamlı fark görülmemiştir.

Çalışmamızda birçok kısıtlayıcı faktörler bulunmaktadır. Periferik kan NK hücrelerinin düzeyini ve işlevini etkileyen birkaç faktör; zihinsel stres [201, 202], egzersiz [203, 204], yaş, ırk sonuçları etkileyebilir. Tesbit edilmemiş bazı otoimmün hastalıkların veya enfeksiyonların sonucu etkilemesi de olasıdır. Öte yandan, konsepsiyon olan sikluslarla konsepsiyon olmayan sikluslar arasında, hücre aktivitesi açısından benzerlik olup olmadığı da açık değildir. Belki de implantasyon olduğunda pNK hücre sayısı ve fonksiyonlarında değişiklik olmaktadır. Aktivite mevcut çalışmada sadece bir kez ölçülmüştür. Ayrıca NK hücrelerinin subgrupları gebelik sonuçlarını etkiliyor olabilir. Çalışmanın retrospektif olması ve yeterli hasta sayısının olmaması da çalışmadaki kısıtlayıcı faktörlerden sayılabilir.

## 6. SONUÇ

Yaptığımız çalışma sonuçlarına göre açıklanamayan TGK'lı hasta grubu ve sağlıklı fertil kontrol grubu arasında CD56+dim ve CD56+bright pNK hücrelerinin yüzdeleri oranlarında önemli bir fark bulunamadı. Açıklanamayan TGK'lı hasta grubu ve sağlıklı fertil kontrol grubu arasında pNK hücrelerinde CD8, CD158a ekspresyonları arasında anlamlı fark bulunamadı. Ayrıca, her iki grupta NK hücre aktivite seviyesi arasında anlamlı fark izlenmedi.

İnsan üremesinde NK hücre fonksiyonu halen tam olarak anlaşılammıştır. Tüm çalışmaların sonucu dikkate alındığında, tekrarlayan gebelik kayıplarında ve infertilitede NK hücre popülasyonunda değişiklikler olmaktadır; sonuçlar incelenen materyalin periferik kan, endometrium veya ilk trimester desiduası olmasına göre değişmektedir.

Uterin ve periferik kan NK hücreleri arasında varsa ne tür bir bağlantı olduğu tam olarak bilinmemektedir. Erken implantasyonda uterus NK hücrelerinin önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir, ancak aberasyonların düşüklere neden olup olmadığı bilinmemektedir. Her durumda, birçok çalışma periferik NK hücreleri ve TGK arasında bağımsız bir ilişki olduğunu gösterir.

Yapılan birçok araştırmalara göre TGK'lı kadınlarda immünolojik risk belirteçleri olarak düşünülebilmesine rağmen, pNK sayı değerlendirmesinin veya aktivitesinin prognostik değeri hala şüphelidir. NK hücre sayısı ve aktivitesindeki değişikliklerin neden mi, sonuç mu olduğu tam olarak bilinmemektedir. Dolayısıyla, bu alandaki birçok argüman nedeniyle, NK hücre değerlendirmesinin infertilite veya TGK'lı kadınları taramak için öngörücü bir test olarak rolünü kabul etmek veya reddetmek için daha büyük hasta ve kontrol grubu ile yapılacak prospektif çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 7.KAYNAKLAR

1. Medicine, P.C.o.t.A.S.f.R., Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertility and sterility*, 2020. **113**(3): p. 533-535.
2. Kolte, A., et al., Terminology for pregnancy loss prior to viability: a consensus statement from the ESHRE early pregnancy special interest group. *Human Reproduction*, 2015. **30**(3): p. 495-498.
3. Daya, S. and M.D. Stephenson, Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertility and sterility*, 1996. **66**(1): p. 24-29.
4. King, A., et al., Uterine NK cells and trophoblast HLA class I molecules. *American Journal of Reproductive Immunology*, 1997. **37**(6): p. 459-462.
5. Tuckerman, E., et al., Prognostic value of the measurement of uterine natural killer cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage. *Human reproduction*, 2007. **22**(8): p. 2208-2213.
6. Kwak-Kim, J. and A. Gilman-Sachs, Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *American journal of reproductive immunology*, 2008. **59**(5): p. 388-400.
7. Orange, J.S. and Z.K. Ballas, Natural killer cells in human health and disease. *Clinical immunology*, 2006. **118**(1): p. 1-10.
8. Cooper, M.A., et al., Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood*, 2001. **97**(10): p. 3146-3151.
9. King, K., et al., Detailed analysis of peripheral blood natural killer (NK) cells in women with recurrent miscarriage. *Human reproduction*, 2010. **25**(1): p. 52-58.
10. Zhu, L., et al., Increased natural killer cell subsets with inhibitory cytokines and inhibitory surface receptors in patients with recurrent miscarriage and decreased or normal subsets in kidney transplant recipients late post-transplant. *Clinical & Experimental Immunology*, 2018. **193**(2): p. 241-254.
11. Kusumi, M., et al., Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. *Journal of reproductive immunology*, 2006. **70**(1-2): p. 33-42.
12. Ntrivalas, E.I., et al., Expression of killer immunoglobulin-like receptors on peripheral blood NK cell subsets of women with recurrent spontaneous abortions or implantation failures. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2005. **53**(5): p. 215-221.
13. Lowdell, M.W., et al., Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. *British journal of haematology*, 2002. **117**(4): p. 821-827.

14. Kushima, K., et al., Flow cytometric analysis of chicken NK activity and its use on the effect of restraint stress. *Journal of veterinary medical science*, 2003. **65**(9): p. 995-1000.
15. Srour, E.F., et al., Cytolytic activity of human natural killer cell subpopulations isolated by four-color immunofluorescence flow cytometric cell sorting. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 1990. **11**(3): p. 442-446.
16. Varker, K.A., et al., Impaired natural killer cell lysis in breast cancer patients with high levels of psychological stress is associated with altered expression of killer immunoglobulin-like receptors. *Journal of Surgical Research*, 2007. **139**(1): p. 36-44.
17. Plevyak, M., et al., Deficiency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: a lack of correlation with the decidual immune cell profile. *American journal of reproductive immunology*, 2002. **47**(4): p. 242-250.
18. Sargent, I.L., A.M. Borzychowski, and C.W. Redman, NK cells and human pregnancy—an inflammatory view. *Trends in immunology*, 2006. **27**(9): p. 399-404.
19. Fukui, A., et al., Intracellular cytokine expression of peripheral blood natural killer cell subsets in women with recurrent spontaneous abortions and implantation failures. *Fertility and sterility*, 2008. **89**(1): p. 157-165.
20. Atasü, T. and Ş. Şahmay, Abortus. *Jinekoloji, Nobel*, 2001. **2**: p. 533-545.
21. GÜLER, A. and Y. SAYIN. PRETERM ERKEN MEMBRAN RÜPTÜRÜ OLGULARINDA MATERNAL VE NEONATAL SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ. in *Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi Medi Forum*.
22. Regan, L. and R. Rai, Epidemiology and the medical causes of miscarriage. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 2000. **14**(5): p. 839-854.
23. Wilcox, A.J., et al., Incidence of early loss of pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 1988. **319**(4): p. 189-194.
24. Wang, X., et al., Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. *Fertil Steril*, 2003. **79**(3): p. 577-84.
25. Lohstroh, P.N., et al., Secretion and excretion of human chorionic gonadotropin during early pregnancy. *Fertility and sterility*, 2005. **83**(4): p. 1000-1011.
26. Edmonds, D.K., et al., Early embryonic mortality in women. *Fertility and sterility*, 1982. **38**(4): p. 447-453.
27. Regan, L., P.R. Braude, and P.L. Trembath, Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *British Medical Journal*, 1989. **299**(6698): p. 541-545.
28. Jacobs, P., Chromosome abnormalities origin and etiology in abortions and livebirths. *Human genetics*, 1987.

29. Quenby, S., et al., Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? Human reproduction, 2002. **17**(8): p. 1959-1963.
30. Andersen, A.-M.N., et al., Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. Bmj, 2000. **320**(7251): p. 1708-1712.
31. Goldstein, S.R., Embryonic death in early pregnancy: a new look at the first trimester. Obstetrics and gynecology, 1994. **84**(2): p. 294-297.
32. Tannirandorn, Y., et al., Fetal loss in threatened abortion after embryonic/fetal heart activity. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2003. **81**(3): p. 263-266.
33. Nagy, S., et al., Clinical significance of subchorionic and retroplacental hematomas detected in the first trimester of pregnancy. Obstetrics & Gynecology, 2003. **102**(1): p. 94-100.
34. Deniz, R., Y. Baykuş, and E.Ç. Kavak, Approach to Recurrent Early Pregnancy Loss. Kafkas Journal of Medical Sciences, 2016. **6**(2): p. 130-137.
35. HA, D.T.K. and E. Göksin, Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Gebelikte hipertansiyon, preeklampsi-eklampsi. Güneş Kitabevi, Ankara, 1996: p. 1647-1651.
36. Harlap, S., A life table of spontaneous abortions and the effects of age, parity and other variables. Human embryonic and fetal death, 1980: p. 145-158.
37. Boué, J., A. Boué, and P. Lazar, Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. Teratology, 1975. **12**(1): p. 11-26.
38. Malpas, P., A study of abortion sequences. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 1938. **45**(6): p. 932-949.
39. Meigs, J.V., et al., Progress in gynecology. Vol. 1. 1946: Grune & Stratton.
40. STROBINO, B. and J. PANTEL-SILVERMAN, Gestational vaginal bleeding and pregnancy outcome. American journal of epidemiology, 1989. **129**(4): p. 806-815.
41. Everett, C., Incidence and outcome of bleeding before the 20th week of pregnancy: prospective study from general practice. Bmj, 1997. **315**(7099): p. 32-34.
42. Hasan, R., et al., Patterns and predictors of vaginal bleeding in the first trimester of pregnancy. Annals of epidemiology, 2010. **20**(7): p. 524-531.
43. Zhang, J., et al., A comparison of medical management with misoprostol and surgical management for early pregnancy failure. New England Journal of Medicine, 2005. **353**(8): p. 761-769.
44. Giakoumelou, S., et al., The role of infection in miscarriage. Human reproduction update, 2016. **22**(1): p. 116-133.
45. Dalton, V.K., et al., Treatment patterns for early pregnancy failure in Michigan. Journal of Women's Health, 2009. **18**(6): p. 787-793.

46. Scroggins, K.M., W.D. Smucker, and A.E. Krishen, Spontaneous pregnancy loss: evaluation, management, and follow-up counseling. *Primary care*, 2000. **27**(1): p. 153-167.
47. Doubilet, P.M., et al., Diagnostic criteria for nonviable pregnancy early in the first trimester. *New England Journal of Medicine*, 2013. **369**(15): p. 1443-1451.
48. Wallach, E. and F.R. Batzer, Hormonal evaluation of early pregnancy. *Fertility and Sterility*, 1980. **34**(1): p. 1-13.
49. Deutchman, M., S. Eisinger, and M. Kelber, First trimester pregnancy complications. *ALSo: Advanced Life Support in obstetrics course syllabus*. 4th ed. Leawood, Kan.: American Academy of Family Physicians, 2000: p. 1-27.
50. Wong, S.F., M.H. Lam, and L.C. Ho, Transvaginal sonography in the detection of retained products of conception after first-trimester spontaneous abortion. *Journal of clinical ultrasound*, 2002. **30**(7): p. 428-432.
51. Beksaç, M., et al., *Obstetrik Maternal Fetal Tıp & Perinatoloji*. Malatyalıoğlu E. *Perinatal Enfeksiyonlar*. MN Medikal & Nobel, 2001: p. 470-523.
52. Kolte, A., et al., Non-visualized pregnancy losses are prognostically important for unexplained recurrent miscarriage. *Human Reproduction*, 2014. **29**(5): p. 931-937.
53. Alberman, E., The epidemiology of repeated abortion, in *Early Pregnancy Loss*. 1988, Springer. p. 9-17.
54. Obstetricians, A.C.o. and Gynecologists, ACOG practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss. Number 24, February 2001.(Replaces technical bulletin number 212, September 1995). American College of Obstetricians and Gynecologists. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 2002. **78**(2): p. 179-190.
55. Rey, E., et al., Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *The Lancet*, 2003. **361**(9361): p. 901-908.
56. Rai, R., et al., Factor V Leiden and acquired activated protein C resistance among 1000 women with recurrent miscarriage. *Human Reproduction*, 2001. **16**(5): p. 961-965.
57. Grandone, E., et al., Factor V Leiden is associated with repeated and recurrent unexplained fetal losses. *Thrombosis and haemostasis*, 1997. **77**(05): p. 0822-0824.
58. Yamaç, K., R. Gürsoy, and N. Çakır, *Gebelik ve sistemik hastalıklar*. 2002: Nobel Tıp Kitabevi.
59. Pauer, H.-U., et al., Factor XII deficiency is strongly associated with primary recurrent abortions. *Fertility and sterility*, 2003. **80**(3): p. 590-594.
60. Frosst, P., et al., A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature genetics*, 1995. **10**(1): p. 111-113.

61. Foka, Z., et al., Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Human Reproduction*, 2000. **15**(2): p. 458-462.
62. Nelen, W.L., et al., Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertility and sterility*, 2000. **74**(6): p. 1196-1199.
63. Nelen, W.L., et al., Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. *Human Reproduction*, 2000. **15**(4): p. 954-960.
64. Younis, J.S., et al., The effect of thrombophylaxis on pregnancy outcome in patients with recurrent pregnancy loss associated with factor V Leiden mutation. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 2000. **107**(3): p. 415-419.
65. Huchon, C., et al., *Pregnancy loss: French clinical practice guidelines*. 2016, Elsevier.
66. Rai, R., et al., Recurrent miscarriage—an aspirin a day? *Human reproduction*, 2000. **15**(10): p. 2220-2223.
67. Rai, R., et al., High prospective fetal loss rate in untreated pregnancies of women with recurrent miscarriage and antiphospholipid antibodies. *Human reproduction*, 1995. **10**(12): p. 3301-3304.
68. Cowchock, F.S., et al., Repeated fetal losses associated with antiphospholipid antibodies: a collaborative randomized trial comparing prednisone with low-dose heparin treatment. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1992. **166**(5): p. 1318-1323.
69. Empson, M., et al., Recurrent pregnancy loss with antiphospholipid antibody: a systematic review of therapeutic trials. *Obstetrics & Gynecology*, 2002. **99**(1): p. 135-144.
70. Pattison, N., et al., Antiphospholipid antibodies in pregnancy: prevalence and clinical associations. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 1993. **100**(10): p. 909-913.
71. Lima, F., et al., A study of sixty pregnancies in patients with the antiphospholipid syndrome. *Clinical and experimental rheumatology*, 1996. **14**(2): p. 131-136.
72. Kutteh, W.H., Antiphospholipid antibody-associated recurrent pregnancy loss: treatment with heparin and low-dose aspirin is superior to low-dose aspirin alone. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1996. **174**(5): p. 1584-1589.
73. Tulppala, M., et al., Low-dose aspirin in prevention of miscarriage in women with unexplained or autoimmune related recurrent miscarriage: effect on prostacyclin and thromboxane A2 production. *Human reproduction (Oxford, England)*, 1997. **12**(7): p. 1567-1572.
74. Sarig, G., et al., Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. *Fertility and sterility*, 2002. **77**(2): p. 342-347.

75. Hassold, T. and D. Chiu, Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Human genetics*, 1985. **70**(1): p. 11-17.
76. Warburton, D., Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. *Perinatal Genetics Diagnosis and Treatment*, 1986: p. 133-148.
77. Philipp, T., et al., Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Human reproduction*, 2003. **18**(8): p. 1724-1732.
78. Stephenson, M., K. Awartani, and W. Robinson, Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Human reproduction*, 2002. **17**(2): p. 446-451.
79. Tho, P.T., J.R. Byrd, and P.G. McDonough, Etiologies and subsequent reproductive performance of 100 couples with recurrent abortion. *Fertility and sterility*, 1979. **32**(4): p. 389-395.
80. Daniel, A., E.B. Hook, and G. Wulf, Risks of unbalanced progeny at amniocentesis to carriers of chromosome rearrangements: data from United States and Canadian laboratories. *American journal of medical genetics*, 1989. **33**(1): p. 14-53.
81. Arredondo, F. and L.S. Noble. Endocrinology of recurrent pregnancy loss. in *Seminars in reproductive medicine*. 2006. Copyright© 2006 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ...
82. Homer, H.A., T.-C. Li, and I.D. Cooke, The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertility and sterility*, 2000. **73**(1): p. 1-14.
83. Grimbizis, G.F., et al., Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results. *Human reproduction update*, 2001. **7**(2): p. 161-174.
84. Stromme, W.B. and E.W. Haywa, Intrauterine fetal death in the second trimester. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1963. **85**(2): p. 223-233.
85. Jewelewicz, R. Incompetent cervix: pathogenesis, diagnosis and treatment. in *Seminars in perinatology*. 1991.
86. Iams, J.D., et al., Cervical competence as a continuum: a study of ultrasonographic cervical length and obstetric performance. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1995. **172**(4): p. 1097-1106.
87. Fernandez, H., et al., Hysteroscopic resection of submucosal myomas in patients with infertility. *Human reproduction*, 2001. **16**(7): p. 1489-1492.
88. Al-Inany, H., Intrauterine adhesions: an update. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 2001. **80**(11): p. 986-993.
89. Greene, M.F., et al., First-trimester hemoglobin A1 and risk for major malformation and spontaneous abortion in diabetic pregnancy. *Teratology*, 1989. **39**(3): p. 225-231.

90. Noyes, R.W., A.T. Hertig, and J. Rock, Dating the endometrial biopsy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1975. **122**(2): p. 262-263.
91. Tulppala, M., et al., Luteal phase defect in habitual abortion: progesterone in saliva. *Fertility and sterility*, 1991. **56**(1): p. 41-44.
92. Porter, T.F. and J.R. Scott, Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 2005. **19**(1): p. 85-101.
93. Kaur, R. and K. Gupta, Endocrine dysfunction and recurrent spontaneous abortion: An overview. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 2016. **6**(2): p. 79.
94. Allan, W., et al., Maternal thyroid deficiency and pregnancy complications: implications for population screening. *Journal of medical screening*, 2000. **7**(3): p. 127-130.
95. Abalovich, M., et al., Overt and subclinical hypothyroidism complicating pregnancy. *Thyroid*, 2002. **12**(1): p. 63-68.
96. Stagnaro-Green, A., et al., Detection of at-risk pregnancy by means of highly sensitive assays for thyroid autoantibodies. *Jama*, 1990. **264**(11): p. 1422-1425.
97. Rushworth, F., et al., Prospective pregnancy outcome in untreated recurrent miscarriers with thyroid autoantibodies. *Human Reproduction*, 2000. **15**(7): p. 1637-1639.
98. Esplin, M.S., et al., Thyroid autoantibodies are not associated with recurrent pregnancy loss. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1998. **179**(6): p. 1583-1586.
99. Kutteh, W.H., et al., Increased prevalence of antithyroid antibodies identified in women with recurrent pregnancy loss but not in women undergoing assisted reproduction. *Fertility and sterility*, 1999. **71**(5): p. 843-848.
100. Wang, J.X., M.J. Davies, and R.J. Norman, Obesity increases the risk of spontaneous abortion during infertility treatment. *Obesity research*, 2002. **10**(6): p. 551-554.
101. Lord, J.M., I.H. Flight, and R.J. Norman, Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Bmj*, 2003. **327**(7421): p. 951.
102. Porter, M.B., J.R. Brumsted, and C.K. Sites, Effect of prolactin on follicle-stimulating hormone receptor binding and progesterone production in cultured porcine granulosa cells. *Fertility and sterility*, 2000. **73**(1): p. 99-105.
103. Trout, S.W. and D.B. Seifer, Do women with unexplained recurrent pregnancy loss have higher day 3 serum FSH and estradiol values? *Fertility and sterility*, 2000. **74**(2): p. 335-337.
104. Leitich, H. and H. Kiss, Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk factors for adverse pregnancy outcome. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 2007. **21**(3): p. 375-390.

105. Wallach, E.E., E.G. Hughes, and B.G. Brennan, Does cigarette smoking impair natural or assisted fecundity? *Fertility and sterility*, 1996. **66**(5): p. 679-689.
106. Floyd, R.L., P. Decouflé, and D.W. Hungerford, Alcohol use prior to pregnancy recognition. *American journal of preventive medicine*, 1999. **17**(2): p. 101-107.
107. Cavallo, F., et al., Moderate alcohol consumption and spontaneous abortion. *Alcohol and Alcoholism*, 1995. **30**(2): p. 195-201.
108. Rasch, V., Cigarette, alcohol, and caffeine consumption: risk factors for spontaneous abortion. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 2003. **82**(2): p. 182-188.
109. Schnorr, T.M., et al., Video display terminals and the risk of spontaneous abortion. *New England Journal of Medicine*, 1991. **324**(11): p. 727-733.
110. Brent, R.L., Utilization of developmental basic science principles in the evaluation of reproductive risks from pre-and postconception environmental radiation exposures. *Teratology*, 1999. **59**(4): p. 182-204.
111. Lee, S.K., et al., Determination of clinical cellular immune markers in women with recurrent pregnancy loss. *American journal of reproductive immunology*, 2013. **70**(5): p. 398-411.
112. Ford, H.B. and D.J. Schust, Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Reviews in obstetrics and gynecology*, 2009. **2**(2): p. 76.
113. Rote, N.S., et al., Antiphospholipid antibodies and placental development, in *Immunobiology of reproduction*. 1994, Springer. p. 285-302.
114. Katsuragawa, H., et al., Monoclonal antibody against phosphatidylserine inhibits in vitro human trophoblastic hormone production and invasion. *Biology of Reproduction*, 1997. **56**(1): p. 50-58.
115. Di Simone, N., et al., Monoclonal anti-annexin V antibody inhibits trophoblast gonadotropin secretion and induces syncytiotrophoblast apoptosis. *Biology of reproduction*, 2001. **65**(6): p. 1766-1770.
116. Bulla, R., F. Bossi, and F. Tedesco, The complement system at the embryo implantation site: friend or foe? *Frontiers in immunology*, 2012. **3**: p. 55.
117. Laskin, C.A., et al., Prednisone and aspirin in women with autoantibodies and unexplained recurrent fetal loss. *New England Journal of Medicine*, 1997. **337**(3): p. 148-154.
118. Gur, C., et al., Pregnancy outcome after first trimester exposure to corticosteroids: a prospective controlled study. *Reproductive toxicology*, 2004. **18**(1): p. 93-101.
119. Stephenson, M.D., et al., Intravenous immunoglobulin and idiopathic secondary recurrent miscarriage: a multicentered randomized placebo-controlled trial. *Human Reproduction*, 2010. **25**(9): p. 2203-2209.

120. Deshmukh, H. and S.S. Way, Immunological basis for recurrent fetal loss and pregnancy complications. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2019. **14**: p. 185-210.
121. Kuon, R.J., et al., Uterine natural killer cells in patients with idiopathic recurrent miscarriage. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2017. **78**(4): p. e12721.
122. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology*, 2001. **22**(11): p. 633-640.
123. Montaldo, E., et al., Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry Part A*, 2013. **83**(8): p. 702-713.
124. Searle, R.F., R.K. Jones, and J.N. Bulmer, Phenotypic analysis and proliferative responses of human endometrial granulated lymphocytes during the menstrual cycle. *Biology of reproduction*, 1999. **60**(4): p. 871-878.
125. Eriksson, M., et al., Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF- $\beta$ . *Journal of leukocyte biology*, 2004. **76**(3): p. 667-675.
126. Manaster, I., et al., Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *The Journal of Immunology*, 2008. **181**(3): p. 1869-1876.
127. Shivhare, S.B., et al., Menstrual cycle distribution of uterine natural killer cells is altered in heavy menstrual bleeding. *Journal of reproductive immunology*, 2015. **112**: p. 88-94.
128. Robson, A., et al., Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *The FASEB Journal*, 2012. **26**(12): p. 4876-4885.
129. Kalkunte, S.S., et al., Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. *The Journal of Immunology*, 2009. **182**(7): p. 4085-4092.
130. Hanna, J., et al., Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature medicine*, 2006. **12**(9): p. 1065-1074.
131. Sojka, D.K., L. Yang, and W.M. Yokoyama, Uterine natural killer cells. *Frontiers in immunology*, 2019. **10**: p. 960.
132. Ishida, Y., et al., Maternal peripheral blood natural killer cells incorporate placenta-associated microRNAs during pregnancy. *International journal of molecular medicine*, 2015. **35**(6): p. 1511-1524.
133. Hiby, S., et al., Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Human reproduction*, 2008. **23**(4): p. 972-976.
134. Yockey, L.J. and A. Iwasaki, Interferons and proinflammatory cytokines in pregnancy and fetal development. *Immunity*, 2018. **49**(3): p. 397-412.

135. Brogin Moreli, J., et al., Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics. *International Scholarly Research Notices*, 2012. **2012**.
136. Dong, P., et al., Simultaneous detection of decidual Th1/Th2 and NK1/NK2 immunophenotyping in unknown recurrent miscarriage using 8-color flow cytometry with FSC/Vt extended strategy. *Bioscience reports*, 2017. **37**(3).
137. Fukui, A., et al., Expression of natural cytotoxicity receptors and cytokine production on endometrial natural killer cells in women with recurrent pregnancy loss or implantation failure, and the expression of natural cytotoxicity receptors on peripheral blood natural killer cells in pregnant women with a history of recurrent pregnancy loss. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2017. **43**(11): p. 1678-1686.
138. Satoh-Takayama, N., et al., The natural cytotoxicity receptor NKp46 is dispensable for IL-22-mediated innate intestinal immune defense against *Citrobacter rodentium*. *The Journal of Immunology*, 2009. **183**(10): p. 6579-6587.
139. Perfetto, C.O.H., et al., Expression of interleukin-22 in decidua of patients with early pregnancy and unexplained recurrent pregnancy loss. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2015. **32**(6): p. 977-984.
140. Kamoi, M., et al., NK 22 Cells in the Uterine Mid-Secretory Endometrium and Peripheral Blood of Women with Recurrent Pregnancy Loss and Unexplained Infertility. *American journal of reproductive immunology*, 2015. **73**(6): p. 557-567.
141. Fuchinoue, K., et al., Expression of retinoid-related orphan receptor (ROR)  $\gamma$ t on NK22 cells in the peripheral blood and uterine endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss and unexplained infertility. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2016. **42**(11): p. 1541-1552.
142. Wang, Y., et al., IL-22 secreted by decidual stromal cells and NK cells promotes the survival of human trophoblasts. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2013. **6**(9): p. 1781.
143. Laskarin, G., et al., Physiological role of IL-15 and IL-18 at the maternal-fetal interface. *Immunology of pregnancy*, 2005. **89**: p. 10-25.
144. Toth, B., et al., Placental interleukin-15 expression in recurrent miscarriage. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2010. **64**(6): p. 402-410.
145. Wilkens, J., et al., Uterine NK cells regulate endometrial bleeding in women and are suppressed by the progesterone receptor modulator asoprisnil. *The Journal of Immunology*, 2013. **191**(5): p. 2226-2235.
146. Kitaya, K., et al., IL-15 expression at human endometrium and decidua. *Biology of reproduction*, 2000. **63**(3): p. 683-687.
147. Sakai, M., et al., The ratio of interleukin (IL)-18 to IL-12 secreted by peripheral blood mononuclear cells is increased in normal pregnant subjects and decreased in pre-eclamptic patients. *Journal of reproductive immunology*, 2004. **61**(2): p. 133-143.

148. Tokmadzić, V.S., et al., IL-18 is Present at the Maternal–Fetal Interface and Enhances Cytotoxic Activity of Decidual Lymphocytes. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2002. **48**(4): p. 191-200.
149. Yang, H.L., et al., Decidual stromal cells promote the differentiation of CD56brightCD16– NK cells by secreting IL-24 in early pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2019. **81**(6): p. e13110.
150. Di Santo, J.P., Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu. Rev. Immunol.*, 2006. **24**: p. 257-286.
151. Long, E.O., et al., Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annual review of immunology*, 2013. **31**: p. 227-258.
152. Barrow, A.D., C.J. Martin, and M. Colonna, The natural cytotoxicity receptors in health and disease. *Frontiers in immunology*, 2019. **10**: p. 909.
153. Fukui, A., et al., Expression of natural cytotoxicity receptors and a2V-ATPase on peripheral blood NK cell subsets in women with recurrent spontaneous abortions and implantation failures. *American journal of reproductive immunology*, 2006. **56**(5-6): p. 312-320.
154. Bryceson, Y.T., et al., Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 2006. **107**(1): p. 159-166.
155. Fukui, A., et al., Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy loss, implantation failure and preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 2011. **90**(1): p. 105-10.
156. Yokota, M., et al., Role of NK p46 Expression in Cytokine Production by CD 56-Positive NK Cells in the Peripheral Blood and the Uterine Endometrium. *American journal of reproductive immunology*, 2013. **69**(3): p. 202-211.
157. Li, Y.-H., et al., The Galectin-9/Tim-3 pathway is involved in the regulation of NK cell function at the maternal–fetal interface in early pregnancy. *Cellular & molecular immunology*, 2016. **13**(1): p. 73-81.
158. Sun, J., et al., Tim-3 is upregulated in NK cells during early pregnancy and inhibits NK cytotoxicity toward trophoblast in galectin-9 dependent pathway. *PloS one*, 2016. **11**(1): p. e0147186.
159. Li, Y., et al., Tim-3 signaling in peripheral NK cells promotes maternal-fetal immune tolerance and alleviates pregnancy loss. *Sci Signal*, 2017. **10**(498).
160. Colucci, F., The role of KIR and HLA interactions in pregnancy complications. *Immunogenetics*, 2017. **69**(8): p. 557-565.
161. Díaz-Peña, R., et al., Understanding the role of killer cell immunoglobulin-like receptors in pregnancy complications. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2019. **36**(5): p. 827-835.

162. Moffett, A., et al., Variation of maternal KIR and fetal HLA-C genes in reproductive failure: too early for clinical intervention. *Reproductive biomedicine online*, 2016. **33**(6): p. 763-769.
163. Faridi, R. and S. Agrawal, Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) and HLA-C allorecognition patterns implicative of dominant activation of natural killer cells contribute to recurrent miscarriages. *Human reproduction*, 2011. **26**(2): p. 491-497.
164. Mansour, L., et al., Association of Killer Immunoglobulin-Like Receptor and Human Leukocyte Antigen Class I Ligand with Recurrent Abortion in Saudi Women. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 2020. **24**(2): p. 78-84.
165. Flores, A.C., et al., KIR receptors and HLA-C in the maintenance of pregnancy. 2007, Wiley Online Library.
166. Li, H., et al., CD49a regulates the function of human decidual natural killer cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2019. **81**(4): p. e13101.
167. Ghafourian, M., et al., Increase of CD69, CD161 and CD94 on NK cells in women with recurrent spontaneous abortion and in vitro fertilization failure. *Iranian Journal of Immunology*, 2014. **11**(2): p. 84-96.
168. Sotnikova, N., et al., Interaction of Decidual CD 56+ NK with Trophoblast Cells during Normal Pregnancy and Recurrent Spontaneous Abortion at Early Term of Gestation. *Scandinavian journal of immunology*, 2014. **80**(3): p. 198-208.
169. Szekeres-Bartho, J. and A. Schindler, Progesterone and immunology. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2019. **60**: p. 17-23.
170. Lim, M.K., et al., Characterisation of serum progesterone and progesterone-induced blocking factor (PIBF) levels across trimesters in healthy pregnant women. *Scientific reports*, 2020. **10**(1): p. 1-9.
171. Miko, E., et al., Progesterone-induced blocking factor (PIBF) and trophoblast invasiveness. *Journal of reproductive immunology*, 2011. **90**(1): p. 50-57.
172. Wu, S., et al., Expression of kisspeptin/GPR54 and PIBF/PR in the first trimester trophoblast and decidua of women with recurrent spontaneous abortion. *Pathology-Research and Practice*, 2014. **210**(1): p. 47-54.
173. Raghupathy, R., et al., Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. *Journal of reproductive immunology*, 2009. **80**(1-2): p. 91-99.
174. Wang, F., et al., Effects of human chorionic gonadotropin, estradiol, and progesterone on interleukin-18 expression in human decidual tissues. *Gynecological Endocrinology*, 2017. **33**(4): p. 265-269.
175. Okada, S., et al., Expression of interleukin-15 in human endometrium and decidua. *Molecular human reproduction*, 2000. **6**(1): p. 75-80.

176. Yie, S.-m., R. Xiao, and C.L. Librach, Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. *Human reproduction*, 2006. **21**(10): p. 2538-2544.
177. Djurusic, S., L. Skibsted, and T.V.F. Hviid, A Phenotypic Analysis of Regulatory T Cells and Uterine NK Cells from First Trimester Pregnancies and Associations with HLA-G. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2015. **74**(5): p. 427-444.
178. Eskicioğlu, F., et al., The association of HLA-G and immune markers in recurrent miscarriages. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2016. **29**(18): p. 3056-3060.
179. Bhalla, A., et al., Comparison of the expression of human leukocyte antigen (HLA)-G and HLA-E in women with normal pregnancy and those with recurrent miscarriage. *Reproduction*, 2006. **131**(3): p. 583-589.
180. Sanchez-Correa, B., et al., Modulation of NK cells with checkpoint inhibitors in the context of cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2019. **68**(5): p. 861-870.
181. Sanchez-Correa, B., et al., DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE axis: novel immune checkpoints for natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancers*, 2019. **11**(6): p. 877.
182. Li, Y., et al., Tim-3 signaling in peripheral NK cells promotes maternal-fetal immune tolerance and alleviates pregnancy loss. *Science Signaling*, 2017. **10**(498).
183. Li, J., et al., Up-regulated expression of Tim-3/Gal-9 at maternal-fetal interface in pregnant woman with recurrent spontaneous abortion. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 2014. **34**(4): p. 586-590.
184. Szekeres-Bartho, J., et al., The antiabortive effect of progesterone-induced blocking factor in mice is manifested by modulating NK activity. *Cellular immunology*, 1997. **177**(2): p. 194-199.
185. Karalis, K., G. Goodwin, and J.A. Majzoub, Cortisol blockade of progesterone: a possible molecular mechanism involved in the initiation of human labor. *Nature medicine*, 1996. **2**(5): p. 556-560.
186. Ebina, Y., et al., Natural killer cell activity in women with recurrent miscarriage: etiology and pregnancy outcome. *Journal of reproductive immunology*, 2017. **120**: p. 42-47.
187. Chernyshov, V.P., et al., Comparison of T and NK lymphocyte subsets between human endometrial tissue and peripheral blood. *Central-European journal of immunology*, 2019. **44**(3): p. 316.
188. Seshadri, S. and S.K. Sunkara, Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*, 2014. **20**(3): p. 429-438.

189. Quenby, S., et al., Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Human Reproduction*, 1999. **14**(9): p. 2386-2391.
190. Rai, R., G. Sacks, and G. Trew, Natural killer cells and reproductive failure—theory, practice and prejudice. *Human reproduction*, 2005. **20**(5): p. 1123-1126.
191. Yamada, H., et al., Pre-conceptional natural killer cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. *American journal of reproductive immunology*, 2003. **50**(4): p. 351-354.
192. Szekeres-Bartho, J., Regulation of NK cell cytotoxicity during pregnancy. *Reproductive biomedicine online*, 2008. **16**(2): p. 211-217.
193. KWAK, J.Y., et al., Up-regulated expression of CD56+, CD56+/CD16+, and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *American journal of reproductive immunology*, 1995. **34**(2): p. 93-99.
194. Morikawa, M., et al., NK cell activity and subsets in women with a history of spontaneous abortion. *Gynecologic and obstetric investigation*, 2001. **52**(3): p. 163-167.
195. Thum, M., et al., Simple enumerations of peripheral blood natural killer (CD56+ NK) cells, B cells and T cells have no predictive value in IVF treatment outcome. *Human reproduction*, 2005. **20**(5): p. 1272-1276.
196. Souza, S.S., et al., Immunological evaluation of patients with recurrent abortion. *Journal of reproductive immunology*, 2002. **56**(1-2): p. 111-121.
197. Katano, K., et al., Peripheral natural killer cell activity as a predictor of recurrent pregnancy loss: a large cohort study. *Fertility and sterility*, 2013. **100**(6): p. 1629-1634.
198. Moffett-King, A., Natural killer cells and pregnancy. *Nature Reviews Immunology*, 2002. **2**(9): p. 656-663.
199. Martinet, L. and M.J. Smyth, Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nature Reviews Immunology*, 2015. **15**(4): p. 243-254.
200. Kumar, S., Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology*, 2018. **154**(3): p. 383-393.
201. Salleh, M.R., Life event, stress and illness. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 2008. **15**(4): p. 9.
202. Shakhar, K., et al., High NK cell activity in recurrent miscarriage: what are we really measuring? *Human reproduction*, 2006. **21**(9): p. 2421-2425.
203. Fiuza-Luces, C., et al., Effects of exercise on the immune function of pediatric patients with solid tumors: insights from the PAPEC randomized trial. *American journal of physical medicine & rehabilitation*, 2017. **96**(11): p. 831-837.

204. Gustafson, M.P., et al., A systems biology approach to investigating the influence of exercise and fitness on the composition of leukocytes in peripheral blood. *Journal for immunotherapy of cancer*, 2017. **5**(1): p. 1-14.

