

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI OLAN VAKALARDA
PENTRAKSİN 3 EKSPRESYON PROFİLİNİN
BELİRLENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. SELCAN ZEYBEK**

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. EMRE TEPELİ**

DENİZLİ - 2015

**T.C
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI OLAN VAKALARDA
PENTRAKSİN 3 EKSPRESYON PROFİLİNİN
BELİRLENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. SELCAN ZEYBEK**


**DANIŞMAN
DOÇ.DR. EMRE TEPELİ**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 11.09.2014 tarih ve 2014TPF014 nolu kararı ile desteklenmiştir.


DENİZLİ - 2015

Doç.Dr. Emre TEPELİ danışmanlığında Dr. Selcan ZEYBEK tarafından yapılan "Tekrarlayan gebelik kaybı olan vakalarda Pentraxin 3 ekspresyon profilinin belirlenmesi" başlıklı tez çalışması 04/03/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.


BAŞKAN


Prof. Dr. Gülseren Bağcı

ÜYE


Prof. Dr. Selma Öztürk

ÜYE


Prof. Dr. Hüseyin Bağcı

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. 08/04/2015


Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince ve tez çalıőmam sırasında her konuda bilgi, deneyim ve desteğini esirgemeyen, tez danıőmanım ve değerli hocam Doç. Dr. Emre TEPELİ'ye, bilgi ve tecrübelerini her zaman bizlerle paylaőan, bölümümüzde aile ortamı yaratan başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Gülseren BAĞCI olmak üzere, Prof. Dr. C. Nur SEMERCİ, Doç. Dr. Vildan CANER ve Yrd. Doç. Dr. G. Ozan ÇETİN hocalarıma, desteğini her zaman hissettiğim sayın hocam Prof. Dr. Füsün DÜZCAN'a, hasta seçimi, immünohistokimyasal boyama analizlerindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Metin AKBULUT'a, istatistiksel analizlerdeki katkılarından dolayı Hande ŐENOL'a, asistanlık eğitimim sürecinde bana destek olan tüm asistan ve biyolog arkadaşlarıma,

Ayrıca bu süreçte desteğini sürekli yanımda hissettiğim eőime ve aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
ÖZET.....	XII
İNGİLİZCE ÖZET.....	XIV
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
ABORTUS ve TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI.....	3
Tanım.....	3
Epidemiyoloji.....	3
Risk faktörleri.....	4
<i>Maternal yaş</i>	4
<i>Önceki gebelik kaybı sayısı</i>	4
<i>Canlı doğum varlığı</i>	5
<i>Önceki gebelik kayıplarının zamanı</i>	5
<i>Yaşam tarzı faktörleri</i>	5
<i>Tekrarlayan gebelik kaybı olan aile bireylerinin varlığı</i>	6
Etiyoloji.....	6
<i>Genetik Faktörler</i>	6
<i>Anatomik Faktörler</i>	11

<i>Endokrin Faktörler</i>	12
<i>Koagülasyon Sistemine Ait Patolojiler</i>	14
<i>Enfeksiyöz Faktörler</i>	15
<i>Çevresel Faktörler</i>	16
<i>İmmunolojik Faktörler</i>	16
PENTRAKSİN 3	22
Gebelik Sürecinde PTX3	27
GEREÇ ve YÖNTEM	29
Olguların Seçimi	29
Doku Örneklerinin Deparafinizasyon İşlemi	30
Total RNA İzolasyonu	30
Total RNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının ve Saflık Derecelerinin Belirlenmesi	31
Gerçek-Zamanlı Kantitatif PCR	32
İmmunohistokimyasal Analiz	34
İstatiksel Analiz	35
BULGULAR	36
TARTIŞMA	43
SONUÇLAR	49
KAYNAKLAR	50

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

PTX3	: Pentraksin 3
sPRM	: Sıvı faz patern tanıma molekülleri
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
TGK	: Tekrarlayan gebelik kaybı
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
İUGG	: İntrauterin gelişme geriliği
BMI	: (Body mass index) Vücut kitle endeksi
HLA	: İnsan lökosit antijeni
SNP	: Tek nükleotid polimorfizm
HbA1c	: Hemogloblin A1c
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
AFS	: Antifosfolipid sendromu
SLE	: Sistemik lupus eritematozis
CMV	: Sitomegalovirüs
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HSV	: Herpes Simplex Virüsü
NK hücresi	: Doğal öldürücü hücre
Treg	: Regülatuar T hücre

LPS	: Lipopolisakkarit
MBL	: MannoZ bağlayan lektin
CRP	: C-reaktif protein
SAP	: Serum amiloid protein
DAF	: Decay accelerating factor
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat redüktaz
NOD	: Nükleotid bağlayan oligomerizasyon domain proteini
°C	: Santigrat
µl	: Mikrolitre
İHK	: İmmunohistokimya
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
IL	: İnterlökin
MCP	: Membran kofaktör protein
ml	: Mililitre
PGE2	: Prostoglandin E2
TGF	: Transforme edici büyüme faktörü
T4	: Tiroksin
TNF alfa	: Tümör nekrozis faktör alfa
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 Düşüklerde trimesterlere göre kromozomal anomali görülme oranları ..	8
Şekil 2 İnsan kısa ve uzun pentraksinlerin şematik gösterimi	23
Şekil 3 PTX3'ün, C1q'ye bağlanarak apoptotik hücrelerin temizlenmesini inhibe etmesinin şematik gösterimi	26
Şekil 4 LightCycler 480II cihazında değerlendirilen örneklerle ait amplifikasyon eğrileri	34
Şekil 5 Hasta ve kontrol grubunun ortalama ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması	38
Şekil 6 İmmunhistokimyasal analizde anti-PTX3 ile boyanmada 1+ olarak değerlendirilen olgunun plasenta doku örneği	39
Şekil 7 İmmunhistokimyasal analizde anti-PTX3 ile boyanmada 4+ olarak değerlendirilen olgunun plasenta doku örneği	39

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1 Yaşa göre spontan abortus oranları.....	4
Tablo 2 Tekrarlayan gebelik kaybı etyolojisinde yer alan faktörler.....	7
Tablo 3 Klinik tanı almış birinci trimester spontan abortuslarda kromozomal anomali dağılımı.....	9
Tablo 4 Herediter ve edinilmiş (akkiz) trombofililer	14
Tablo 5 Pentraksin 3'ün ligandları.....	24
Tablo 6 RT-PCR'da kullanılan primer setleri ve UPL numaraları.....	32
Tablo 7 OneStep RT-PCR kit ile optimize edilen gerçek-zamanlı PCR karışımı.....	33
Tablo 8 Optimize edilen reaksiyon şartları.....	33
Tablo 9 Hasta grubunun genel bilgileri.....	36
Tablo 10 Kontrol gruplarının genel bilgileri.....	36
Tablo 11 Hasta ve kontrol gruplarının yaş, canlı doğum sayısı, Δ CT değerleri ve immunhistokimyasal analiz sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması.....	37
Tablo 12 Tüm kişiler için maternal yaş, canlı doğum sayısı, normalize ekspresyon düzeyi ve immunhistokimyasal skorlandırma parametrelerinin karşılaştırılması.....	40
Tablo 13 Hasta grubu için maternal yaş, canlı doğum sayısı, önceki düşük sayısı, düşük haftası, immunhistokimyasal skorlandırma ile normalize ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	40

Tablo 14	Hasta grubu için maternal yaş, canlı doğum sayısı, immunhistokimyasal skorlandırma, normalize ekspresyon düzeyi, düşük sayısı ve düşük haftası parametrelerinin karşılaştırılması...	41
Tablo 15	Hasta grubu için normalize ekspresyon düzeylerinin daha önce canlı doğum olup olmamasına göre karşılaştırılması.....	41
Tablo 16	Kontrol grubu için maternal yaş, sağlıklı gebelik sayısı, immunhistokimyasal skorlandırma, normalize ekspresyon düzeyi parametrelerinin karşılaştırılması.....	42

ÖZET

Tekrarlayan gebelik kaybı olan vakalarda Pentraxin 3 ekspresyon profilinin belirlenmesi

Dr. Selcan Zeybek

Tekrarlayan gebelik kaybı, klasik olarak birbirini izleyen en az iki ya da daha fazla klinik tanımlı gebeliğin 20. gebelik haftasından önce spontan sonlanması olarak tanımlanmaktadır. Tekrarlayan gebelik kaybının bilinen birçok nedeni olsa da, olguların yaklaşık yarısından fazlasında herhangi bir neden saptanamamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar sayesinde, nedeni açıklanamamış tekrarlayan gebelik kaybı, preeklampsi, intrauterin gelişme geriliği gibi birçok gebelik komplikasyonunun maternal immun sistemdeki problemler veya anormal fetomaternal immun ilişkiler nedeniyle oluştuğunun kanıtları her geçen gün artmaktadır. Özellikle doğal immun yanıtın regülasyonu fetal allograft rejeksiyonunu önlemek için önemlidir. Pentraxin 3 (PTX3), doğal immun sistemin sıvısal kısmını oluşturan, inflamasyonda efektör ve modulator olarak anahtar rol oynayan akut faz reaktanıdır. PTX3'ün gebelikte amniyotik epitelyum, koryonik mezoderm, trofoblast terminal villusları ve plasentanın perivasküler stromasından eksprese edildiği, bu nedenle anne kanında yüksek düzeyde seyrettiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda preeklampsili hastalarda, yetersiz plasentasyona bağlı trofoblast ölümü ve inflamatuvar faktörlerin salınımının gerçekleşmesine yanıt olarak PTX3 ekspresyonunun arttığı saptanmış ve PTX3'ün apoptotik hücrelere ve bu hücrelere bağlı oluşan bileşenlere bağlanarak immünojenitelerini sınırlamaya ve otoimmünite risklerini azaltmaya çalıştığı düşünülmüştür. Son yıllarda abortus ve nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı ile hücre apoptozisi arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma sayısı artmaktadır. Tüm bunlardan yola çıkarak literatürde ilk kez olacak bu çalışmada, nedeni belirlenemeyen tekrarlayan gebelik kaybı olan bireylerdeki endometrial ve plasental PTX3 geninin mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonu incelenmesi amaçlanmıştır. Nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olan bireylerin endometrium ve plasental örneklerindeki PTX3 ekspresyon düzeyleri, sağlıklı term plasentalardaki ekspresyon düzeyleriyle karşılaştırılmış ve anlamlı artış saptanmıştır, ancak bu olgularda, PTX3 ekspresyon düzeyi ile gebelik kaybı haftası ve önceki gebelik kaybı sayısı arasında ilişki bulunamamıştır. PTX3,

birçok hastalıkta kanıtlanmış çok iyi bir akut faz reaktanı olması ve nedeni saptanamayan tekrarlayan gebelik kaybı sürecinde doku düzeyinde ekspresyonunun belirgin yüksek saptanmış olması nedeniyle, tekrarlayan gebelik kaybındaki otoinflatuar sürecin erken tanısında ve klinik sürecin takibinde fayda sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Tekrarlayan gebelik kaybı, Pentraksin 3, ekspresyon, apoptozis,

SUMMARY

Determining expression profile of Pentraxin 3 in cases of recurrent pregnancy loss

Dr. Selcan Zeybek

Recurrent pregnancy loss classically refers to the occurrence of two or more consecutive losses of clinically recognized pregnancies prior to the 20th week of gestation. Approximately more than half of all cases will remain unexplained, though there are various known causes for recurrent miscarriage. The evidence that many complications of pregnancy such as unexplained recurrent pregnancy loss, preeclampsia, intrauterine growth retardation have arisen from maternal immune system problems or abnormal immune feto-maternal relations through the increasing number of studies in recent years. Especially the innate immune response of the regulation is important in order to prevent fetal allograft rejection. Pentraxin 3, constitute the humoral part of the innate immune system, which plays a key role as an modulator and effector of inflammation and is an acute phase reactant. It is detected that PTX3 is expressed from amniotic epithelium, chorionic mesoderm, the terminal villous trophoblast and placenta's perivascular stroma in the pregnancy and therefore it is found in high levels in the mother's blood. In studies in patients with preeclampsia found that increased PTX3 expression is response to the release of inflammatory factors and trophoblast death due to inadequate placentation. Binding to apoptotic cells and to the components stemming from these cells, PTX3 tries to limit the immunogenicity and reduce the risk of autoimmunity. In recent years, the researches that show the abortus and unexplained recurrent pregnancy loss are related with cell apoptosis are increased. Based on these studies, it is aimed to investigate the expression of endometrial and placental PTX3 gene on the level of mRNA and protein in individuals with unexplained recurrent pregnancy loss, to be the first time in the literature. The endometrial and placental expressions of individuals who have unexplained recurrent pregnancy loss are compared with healthy term placentas expressions and significant increase is detected. However, in these cases, there is no correlation found between expression level and the age of pregnancy loss, the number of previous pregnancy losses, the maternal age. PTX3 will provide a lot of benefits as being used in both early diagnosis of autoinflammatory process and clinical follow-up process for

unexplained pregnancy loss. Because PTX3 is not only very well an acute phase reactant proven in many diseases but also its expression is significantly high in the process of unexplained pregnancy loss.

Keywords: Recurrent pregnancy loss, Pentraxin 3, expression, apoptosis

GİRİŞ

Erken dönem gebelik kaybı, gebeliğin en sık görülen komplikasyonudur (1). Tüm konsepsiyonların %30'u implantasyondaki bozukluk ve %30'u biyokimyasal prelinik kayıp olarak klinik tanı alamadan kaybedilmektedir. Klinik tanı konulduktan sonra, gebeliklerin yaklaşık olarak %12-15'i birinci trimesterin sonuna kadar kaybedilmekte ve ancak %25'i canlı doğum olarak sonuçlanabilmektedir (2). Tekrarlayan gebelik kayıpları ise, tüm kadınların %1-3'ünü etkileyen endişe verici bir durumdur ve getirdiği psişik, biyolojik ve ekonomik yönlerle hastaları, etyolojinin araştırılması ve tedavi sürecinde ortaya çıkan sorunlarla da hekimleri güçlüklerle karşı karşıya bırakabilmektedir (3).

Altta yatan pek çok neden bulunsa da tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan ve mevcut tetkiklerle değerlendirilen olguların yaklaşık %50'sinde belirgin bir neden bulunamamaktadır (4) ve hiçbir tedavi uygulanmamasına rağmen bu olguların yaklaşık % 70'i daha sonra başarılı bir gebelik elde edebilmektedir (5).

Tekrarlayan gebelik kayıplarının bilinen nedenleri embriyonik (anormal embriyonik karyotip) ve maternal olarak (endometrium ve/veya plasental gelişim etkilenmesi) ikiye ayrılabilir. Maternal defektlerin bilinen nedenleri ise, koagülasyon bozuklukları, anatomik bozukluklar, otoimmün defektler, endokrin bozukluklardır...

Uterus, implantasyon öncesi ve gebelik boyunca birçok immun sistem modifikasyonları geçirmekte, böylece semiallojenik fetus, maternal immun sistemden korunmaktadır (6). Bu nedenle immun sistem modifikasyonları, gebelik oluşumu ve devamı için temel kavramlardan birini oluşturmaktadır. Birçok gebelik komplikasyonunun ise maternal immun sistemdeki problemler veya anormal fetomaternal immun ilişkiler nedeniyle oluştuğunun kanıtları her geçen gün artmaktadır (7).

Hem maternal hem de paternal genleri eksprese eden semiallograft embriyonun, anne ile başarılı bir şekilde bir arada yaşabilmesi için maternal-fetal yüzeydeki immun lokal adaptasyonunun temelini doğal immun sistem oluşturmaktadır (8). Doğal bağışıklık, yabancıya karşı filogenetik olarak en eski savunma mekanizmasıdır ve aynı zamanda adaptif immun yanıtın aktivasyonu ve oryantasyonunda anahtar rol oynamaktadır. Sıvı faz patern tanıma molekülleri (sPRM) ise doğal savunmanın önemli efektörleri ve modülatörleridir (9). Bu grubun temel proteini olan PTX3 ise farklı ligandlarla etkileşim kapasitesiyle multifonksiyonel

özelliği olan ve inflamatuvar koşullarda hastalığın şiddetiyle korele olarak düzeyinin hızla ve dramatik olarak artışı nedeniyle iyi bir akut faz reaktanı olan bir proteindir. Özellikle gebelik sırasında, uterustaki temel immun mekanizmalardan biri olan kompleman sistemiyle önemli etkileşimleri olan bir patern tanıma molekülüdür (10).

Bu çalışmayla; nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan endometrial ve plasental örneklerdeki PTX3 ekspresyon değişiklikleri araştırılmıştır. PTX3'ün immunitede rol alan birçok ligandla etkileşim özelliği sayesinde nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı etyolojisinde, otoimmünitenin rolü belirlenmeye çalışılmıştır. Dokuya spesifik olarak saptanmış olan PTX3 düzeyindeki değişiklikler, bu hasta grubunda sonraki gebeliklerin takibinde ve bu klinik durumun önlenmesinde önemli katkı sağlayacaktır.

GENEL BİLGİLER

ABORTUS ve TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI

Tanımlar

Abortus veya düşük, gestasyonun 20. haftasından önce klinik olarak tanımlanmış gebeliğin kaybı olarak tanımlanır (1,2). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), ağırlığı 500 gram veya daha az olan embriyo veya fetus ve eklerinin tamamının veya bir kısmının uterus kavitesi dışına atılması olarak tanımlamıştır (11).

Tekrarlayan gebelik kaybı ise, klasik olarak gestasyonun 20. haftasından önce klinik tanı almış gebeliklerden 3 veya daha fazlasının kaybı olarak tanımlanır (2). Bu tanımda ektopik, molar ve biyokimyasal gebeliklerin kaybı yer almaz. Amerika Üreme Tıbbi Derneği (The American Society for Reproductive Medicine) tekrarlayan gebelik kaybını, 2 veya daha fazla olan ve ultrason veya histopatolojik değerlendirmeyele dökümante edilmiş gebeliğin kaybı olarak tanımlar (12). Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK), primer ve sekonder olarak ikiye ayrılır: Primer TGK'nda, 20. gebelik haftasının ötesine ulaşabilmiş bir gebelik yokken, sekonder TGK'nda ise 20. gebelik haftasından sonra canlı doğum, ölü doğum veya neonatal ölümlle sonuçlanmış bir gebelik bulunmaktadır. Birçok çalışmada, primer ve sekonder TGK'lı hastalarda ayırım yapılmamakta ve bu iki durumun benzer hastalıklar olduğu düşünülmektedir (13).

Epidemiyoloji

Spontan abortus, gebeliğin en sık görülen komplikasyonudur (1). Oluşan gebeliklerin yaklaşık %13-26'sı tanı alamadan kaybedilmektedir (14). Preimplantasyon kayıplar da düşünüldüğünde fertilize oositlerin yaklaşık %50'si kaybedilir (14). Klinik tanı alan gebeliklerde ise 20. gestasyonel haftadan önce spontan abortus insidansı %8-20 arasındadır. Ancak bu oran daha önce çocuğu olan kadınlar arasında %5'e düşer (14, 15). 15. haftadan sonra ise kromozomal ve yapısal olarak normal fetuslarda spontan abort riski oldukça düşük (%0.6) olmasına rağmen, bu oran maternal yaş, etnisite gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilir (16).

Bir kez spontan gebelik kaybı oluşma riski %8-20 iken, iki kez ardarda spontan gebelik kaybı oluşma riski %2-3, üç kez ardarda spontan gebelik kaybı oluşma riski ise %0,4-1 oranındadır. (17)

Risk Faktörleri

İleri anne yaşı, artmış parite sayısı, önceki gebeliklerin sonuçları, gebelik kaybının olduğu gestasyonel zaman gibi çeşitli faktörler bu oranları etkiler.

1. Maternal yaş

Hem normal hem de anormal konseptuslarda, obstetrik hikayeden bağımsız olarak spontan kayıp riski yaşla artmaktadır (18,19)(Tablo1).

Tablo 1. Yaşa göre spontan abortus oranları (18)

Maternal yaş	Spontan abortus oranı(%)
12-19	13.3
20-24	11.1
25-29	11.9
30-34	15
35-39	24.6
40-44	51
45 ve üstü	93.4

Sağlıklı kadında artmış maternal yaş, spontan düşük için en önemli risk faktörüdür. Bu durum, temel olarak kötü oosit kalitesinden kaynaklanmaktadır. Artan yaşla over rezervinin azalmasına bağlı gebelikte overyan steroid hormonlar azalmaktadır. Otoantikörlerin ve T helper 2 (Th2) sitokinlerin üretimi gibi immun parametreler, hem artan yaşla direk olarak hem de overyan steroidlerin sekresyonundaki azalmaya bağlı olarak indirekt olarak etkilenecek gebelik kaybı sürecine katkıda bulunmaktadır (20).

2. Önceki gebelik kaybı sayısı

Önceki gebelik kaybı sayısı, TKG'nın en önemli prognostik faktörlerinden birisidir. Abortus sayısı arttıkça bir sonraki gebeliğin canlı doğum ile sonuçlanma olasılığı azalmaktadır. İlk abortusu izleyen bir gebeliğin canlı doğumla sonuçlanma olasılığı %80 iken, bu olasılık iki ardışık gebelik kaybından sonra %70-80, üç ardışık gebelik kaybından sonra %50-60, dört ardışık gebelik kaybından sonra %45, beş ardışık gebelik kaybından sonra %41, altı ardışık gebelik kayıbdan sonra %13 olmaktadır (21). Etiyolojisi kesin olarak aydınlatılamasa da anne yaşı ve anne yaşıyla ilişkili risk faktörlerinin varlığı önceki gebelik kaybı sayısı ile pozitif korelasyon göstermektedir (22).

3. Canlı doğum varlığı

Canlı doğum ile biten bir gebelik varlığının, sonraki gebelikte düşük riskini azalttığı düşünülmektedir (23). Gebelik haftasının ilerlemesiyle (özellikle 3. trimesterde), plasental kaynaklı fetal antijenlerin artan miktarda maternal sirkülasyona geçişine bağlı olarak, paternal antijenlere karşı alloimmunizasyonla daha uzun süre mücadele edilmekte ve bu durumun sonraki gebelikte immunolojik toleransa fayda sağladığı düşünülmektedir (24).

4. Önceki gebelik kayıplarının zamanı

Gestasyonel hafta ilerledikçe spontan gebelik kaybı riski azalmaktadır. Ancak, özellikle bir veya daha fazla 2. trimester gebelik kaybı varlığı sonraki gebelik için güçlü bir negatif prognostik faktördür (25). Erken TKG olan kadınlarda, takip eden gebeliğin canlı doğumla sonuçlanma olasılığı %70 iken, 16-27. gebelik haftaları arasında gerçekleşen fetal kaybın varlığı rekürens riskini 20 kat arttırdığı bulunmuştur (23). Gebelik kaybının gerçekleştiği gebelik haftası, etyolojinin ve tekrarlama riskinin belirlenmesinde dikkate alınmalıdır. Birinci trimester tekrarlayan gebelik kayıplarının ise ardışık gebeliklerde, benzer gebelik haftalarında meydana geldiği saptanmıştır (26).

5. Yaşam tarzı faktörleri

Gebelikte kahve, sigara ve alkol tüketimi ile obezite gibi bazı yaşam tarzı faktörlerinin, tekrarlayan gebelik kaybı riskini etkilediğine yönelik çalışmalar mevcuttur (27). Yapılan çalışmalarda dört veya daha fazla fincan kahve tüketiminin, genel popülasyona göre düşük riskini arttırdığı bildirilmiştir (28). Haftada bir kez alkol kullanımının bile, düşük riskini 2 kat arttırdığı, düşük olmadığında ise fetusta fetal alkol sendromu açısından riski arttırdığı bilinmektedir (29). Sigara kullanımı ile ilgili erken dönemdeki düşük riskini arttırdığına yönelik kanıtlar yoktur. Ancak geç gebelik komplikasyonları olan IUGG, preterm doğum ve plasental abrupsiyon sigara içimi ile ilişkili bulunmuştur. Doza bağımlı olarak sigaradaki nikotin, karbondioksit ve siyanid gibi ajanların, vazokonstriktif ve antimetabolik etkileriyle plasental yetersizliğe yol açtığı düşünülmektedir (30). Abortus dahil obeziteyle ilişkilendirilen birçok gebelik komplikasyonu vardır. Yapılan çalışmalarda vücut kitle indeksi (BMI) ≥ 25 kg/m² olan kadınlar, BMI < 25 kg/m² ile karşılaştırıldığında düşük oranlarında anlamlı artış saptanmıştır (31).

6. TGK olan aile bireyleri varlığı

Normal parental karyotipi olan TGK'lı kadınlarla yapılmış çalışmalarda, 1. derece akrabalarında ve özellikle kız kardeşte, anlamlı düzeyde TGK öyküsünde artış saptanmıştır. Bunun nedeni olarak ise, çeşitli polimorfizmlerin (HLA-G geni ekson 8'deki 14 baz çiftlik insersiyonu gibi) mevcut TGK riskine katkıda bulunduğu düşünülmüştür (32).

Etiyoloji

Tekrarlayan gebelik kayıpları heterojen komponentler içeren bir durumdur ve zemininde birden fazla neden bulunabilir. Bu nedenle multidisipliner yaklaşım gerektirir. Tekrarlayan gebelik kayıplarının etyolojisine ışık tutması açısından birçok çalışma yapılmasına rağmen günümüzde halen çoğunun nedeni bilinmemektedir.

Etiyolojide yer alan başlıca faktörler ise;

- 1) Genetik faktörler
- 2) Anatomik faktörler
- 3) Endokrin faktörler
- 4) Koagülasyon sistemine ait patolojiler
- 5) Enfeksiyöz faktörler
- 6) Çevresel faktörler
- 7) İmmunolojik faktörler olarak sınıflandırılmıştır.

Kwak-Kim ve arkadaşlarının 2009 yılındaki yayınlarında yaptıkları detaylı sınıflandırma Tablo 2'de gösterilmiştir (33).

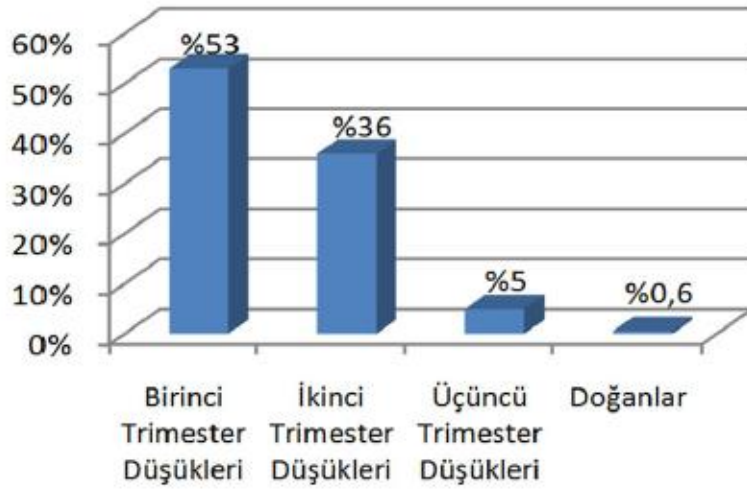
1. Genetik Faktörler

Tüm spontan abortusların yaklaşık %50'sinin nedenini kromozomal anomaliler oluşturmaktadır (34). Kromozomal anomalilerin çoğunu anöploidiler oluştururken, yapısal anomaliler ve mozaizim ise küçük bir oranı oluşturmaktadır (35). 2014 yılında, 2389 düşük materyalinden tek nükleotid polimorfizm (SNP) mikroarray platformu kullanılarak yapılmış bir çalışmada, sitogenetik anomali %59 oranında saptanmıştır. Saptanan bu anomalilerin %85'ini anöploidi, %10'unu triploidi, %4'ünü ise yapısal anomaliler veya tetraploidiler oluşturmaktadır (36).

Tablo 2. Tekrarlayan gebelik kaybı etyolojisinde yer alan faktörler (33)

Etiyoloji	Hastalık
Epidemiyolojik	Hasta yaşı Hastanın üreme öyküsü
Beslenme	Hiperhomosisteinemi Folat eksikliği Vitamin B12 eksikliği
Jinekolojik	Servikal yetmezlik Miyoma uteri Uteris yapısal bozuklukları (uterin septum, uterus didelphis, bikornuat uterus) In utero DES maruziyeti Primer endometriyal bozukluk (Asherman send, endometriyal fibrozis)
Enfeksiyon	Ureoplasma urealyticum Myocoplasma hominis Toxoplasmosis Cytomegalovirus Listeria monocytogenes Parvovirus B19 Klebsiella pneumoniae
Endokrin	Hipertiroidizm Hipotiroidizm Diabetes mellitus Hiperglisemi ve insülin rezistansı LH hipersekresyonu Hiperandrojenemi Hiperprolaktinemi Polikistik over sendromu
Genetik	Fetus veya düşük materyaline ait kromozomal anomaliler (dengeli translokasyonlar, inversiyon) SYCP3 gen mutasyonu Oosit mitokondri mutasyonu ABO uyumsuzluğu HLA G polimorfizmi Annexin A5 gen polimorfizmi Sitokin gen polimorfizmi TNF alfa gen polimorfizmi IFN gama gen polimorfizmi IL-1 beta gen polimorfizmi IL-1 reseptör antagonist polimorfizmi IL-4 gen polimorfizmi IL-6 gen polimorfizmi IL-10 gen polimorfizmi TGF beta gen polimorfizmi
İmmunolojik Otoimmün	Antifosfolipid antikor sendromu Otoimmün tiroiditis Romatoid artrit SLE Sjögren hastalığı Psoriasis Çölyak hastalığı Behçet hastalığı Otoimmün trombositopenik purpura Otoimmün hemolitik anemi Miyasentia gravis Ig M gamopatisi
Alloimmün	Rh uyuşmazlığı ABO uyuşmazlığı
Hematolojik	Trombofili (akkiz ve konjenital) Homozigot orak hücreli anemi

Erken abortuslarda, kromozomal anomali daha sık görülmektedir. Abortus materyalinde anormal karyotip saptanma oranı boş kese gebeliklerinde %90 iken, gestasyonun 8-11 haftası arasındaki düşüklerde %50 ve 16-19 haftası arasında olanlarda %30'dur (37). Abortuslarda, kromozomal anomali görülme oranlarının gebelik trimesterine göre dağılımları Şekil 1'de gösterilmiştir (38). Gestasyonel haftaya göre tekrarlayan gebelik kayıplarındaki kromozom anormallik dağılımı, genel popülasyonda görülenden farklı değildir (39). Ancak bir kişide gebelik kaybı sayısı arttıkça, bu kayıpların öploid olma olasılığı artmaktadır (40).



Şekil 1. Düşüklerde trimesterlerine göre kromozomal anomali görülme oranları (38)

Anöploidiler

Abortuslarda en sık görülen anöploidi trizomiler olup bunlardan da en sık trizomi 16 görülmektedir. Bunu sırasıyla 22, 21 ve 15 numaralı kromozomların trizomileri izlemektedir (Tablo 3)(41). Trizomilerden sonra monozomi X ve poliploidiler gelmektedir. En sık görülen anomali olan anöploidilerin oluşma sıklığı, maternal yaş arttıkça artmaktadır. Yaşın artmasıyla, mayotik iğ formasyonu ve işlevini oluşturan hücresel mekanizmalardaki bozukluklar mayotik bölünmedeki hata oranını arttırmakta ve daha sonraki yıllarda anöploid oosit sayısında artışa neden olmaktadır. 35 yaşından önce anöploid oosit sıklığı düşükken (%10'un altında), 40 yaşında bu oran %30, 43 yaşında %50 ve 45 yaşından sonra yaklaşık %100'dür (42).

Tablo 3. Klinik tanı almış birinci trimester spontan abortuslarda kromozomal anomali dağılımı (41)

Kromozomal yapı	yüzde
Normal karyotip	51.1
Triploidi	6.0
69,XXX	1.7
69,XYY	0.1
69,XXY	4.0
diğer	0.2
Tetraploidi	2.6
92,XXX	1.5
92,XXYY	0.55
Diğer	0.55
Monozomi X	16.4
Yapısal anormallikler	1.5
Seks kromozom trizomileri	0.2
47,XXX	0.05
47,XXY	0.15
Otozomal monozomi	0.1
Otozomal trizomi	20.4
1.kromozom	0
2.kromozom	1.11
3.kromozom	0.25
4.kromozom	0.54
5.kromozom	0.04
6.kromozom	0.14
7.kromozom	0.79
8.kromozom	0.69
9.kromozom	0.62
10.kromozom	0.26
11.kromozom	0.04
12.kromozom	0.18
13.kromozom	1.07
14.kromozom	0.72
15.kromozom	1.68
16.kromozom	6.17
17.kromozom	0.18
18. kromozom	1.15
19. kromozom	0.01
20. kromozom	0.61
21. kromozom	2.01
22. kromozom	2.16
Çift trizomi(otozomal+cinsiyet)	0.2
Mozaik trizomi	1.1
Diğer anomaliler	0.4
	100

Anöploidi riski, önceki anöploid düşük sayısı arttıkça artar (43). Bazı çalışmalarda, kromozomal anormal abortus varlığında, sonraki gebelikte yine kromozomal anormallikle ilişkili kayıp riskinde artış saptanmıştır (44, 45). İlk abortusta anöploid veya öploidi karyotip varlığında, ikinci abortusta anormal karyotip

sıklığı sırasıyla %70 ve %20 olarak saptanmıştır. Ancak hangi anomalilerin tekrarlayan gebelik kaybına neden olduğunu belirlemek için ileri çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (46).

Kromozomal yeniden düzenlenmeler

Tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftlerin %3-5'inde major kromozomal yeniden düzenlenme mevcuttur. Genel toplumda ise bu oran %0.7'dir. TGK'lı olgularda sıklıkla dengeli translokasyon (%60'ı resiprokal, %40'ı Robertsonian) ve daha nadir olarak inversiyon görülmektedir (47).

Dengeli translokasyonlar erkeklere nazaran kadınlarda daha sık görülmektedir ve translokasyon maternal orjinliyse gebelik kaybıyla sonuçlanması daha olasıdır (48).

Genç maternal yaş, üç veya daha fazla gebelik kaybı hikayesi ve kardeş veya annede tekrarlayan gebelik kaybı varlığında tekrarlayan gebelik kaybı etyolojisinde anormal parental karyotip olasılığı artmaktadır (49). Aile hikayesinde, ölü doğum öyküsü veya konjenital anomalili canlı doğum varlığı da bir risk faktörüdür. Bazen anormal parental karyotip olması TGK'nın nedeni olmayabilir. Bu nedenle TGK'lı olgulara multisistematik yaklaşarak tam bir değerlendirme yapılmalıdır (50).

Diğer

Sitokin polimorfizmleri ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasında çelişkili sonuçlar mevcuttur. Progesteron reseptör ve HLA-G gen polimorfizmleri, TGK ile ilişkili bulunduysa da, TGK'da rolünün kesinleşmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (51).

Geçmişte TGK'lı olgularda, düzensiz X-inaktivasyonu görülme sıklığının arttığı düşünülmektedirken son yıllarda yapılan çalışmalarla TGK olan olgular ile düzensiz X-inaktivasyonu arasında ilişki saptanmamıştır (52).

Açıklanamayan TGK'lı kadınların eşlerinin spermlerinde, anormal morfoloji, kromozom anöploidi ve DNA fragmantasyonu sıklığı yüksek bulunmuştur. Paternal yaşla, sperm anöploidi insidansı artmaktadır ve yaşlı partnerleri olan genç kadınlarda gebelik kayıp sıklığı, genç partneri olan kadınlardan yüksektir. Düşük over rezervi gibi kötü sperm kalitesinin de infertilite ve erken gebelik kaybına neden olacağı düşünülmektedir. Oosit anöploidisi ile karşılaştırıldığında anormal sperm kromozomlarının tekrarlayan gebelik kaybındaki önemi fazla değildir (2).

2. Anatomik Faktörler

Uterusun anatomik bozuklukları tekrarlayan gebelik kayıplarının yanında, infertilite, erken doğum, anormal prezentasyon gibi kötü reproduktif sonuçlar doğurmakla birlikte, anormal vajinal kanama gibi jinekolojik bozukluklara da yol açmaktadır. Kazanılmış ve konjenital uterus anomalileri TGK'ların %10-50'sinden sorumludur (53).

Anomaliler

Konjenital uterus anomalileri, tüm kadınlar arasında %7 sıklıkla görülmekte iken, TGK'lı kadınların ise %10-15'inde mevcuttur (54). Bu durum, konjenital uterus malformasyonlarının tekrarlayan gebelik kayıpları üzerinde küçük de olsa bir payının olduğuna işaret etmektedir. Nedeni ise bozulmuş uterus dokusundan veya uterus septumunda azalmış vasküleriteden kaynaklanan anormal implantasyon, artmış inflamasyon veya steroid hormonlara sensitivitede azalma olduğu düşünülmektedir (55).

Septat uterus, kötü reproduktif sonuçlara neden olan bir uterus anomalisidir ve tekrarlayan gebelik kaybı ile en sık ilişkilendirilmiş uterus anomalisidir. Tedavisiz septat uterusu olan kadınlarda fetal survi oranı %6-28 iken, bu olgulardaki düşük oranı %60'dan fazladır (56). Septumun uzunluğu arttıkça prognoz kötüleşmektedir. Ancak septat uterus anomalisi düzeltilebilen bir patoloji olması nedeniyle tedavi sonrası prognoz iyidir.

Unikornuat uterusu reproduktif prognoz, septat uterusu gibi kötüdür. Septat uterusu göre daha nadir görülmektedir. Üriner sistem ve renal anomaliler daha sık eşlik etmektedir. Bu olgularda tüm gebeliklerin üçte biri düşükle sonuçlanmaktadır (57).

Uterus didelfiste reproduktif sonuçlar, birleşmiş iki kornu arasındaki kollateral kan dolaşımı daha iyi olduğundan unikornuat uterusu daha iyidir. Bununla birlikte, uterusu didelfisli kadınlardaki gebeliklerinin %20'si spontan kayıpla sonuçlanmaktadır (58).

Üreme yolu anomalilerinin gebelik üzerine etkilerine ilişkin veriler, nispeten küçük gözlemsel çalışmalarda elde edildiği için, daha büyük çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Leiomyom

Submukoz leiomyomalar, endometrial kaviteye çıkıntı yaparak normal implantasyonu engellediği, myomu örten desiduanın endometrial reseptivitesini azalttığı, artan sitokin üretimiyle dejenerasyona yol açtığı düşünülmektedir. Bununla beraber submüköz myomların alınmasının düşük oranlarını azalttığına dair bulgular mevcuttur (56). Gebelik kaybı ile intramural veya subseröz myomlar arasındaki ilişki ise açık değildir.

İntrauterin Adezyonlar

İntrauterin adezyonların ana nedeni, gebelik komplikasyonları nedeniyle küretajdır. Uterus duvarında, granülasyon dokusu oluşumu sonucu kavitedeki parsiyel veya komplet obliterasyonlar, menstruel düzensizliklere, siklik pelvik ağrılara, infertiliteye ya da TGK'ya neden olmaktadır. Gebelik kaybı, fetoplasental büyümeyi sağlayacak yetersiz endometrium nedeniyle oluşmaktadır. Bu hastalarda, %40-80 oranında spontan gebelik kaybı, %25 oranında preterm doğum gerçekleşmekte, adezyolizis sonrası prognozlarında düzelme olmaktadır (59).

Bozuk endometrial reseptivite

Östrojen ve progesteron endometriumu gebelik için hazırlar. Normal endometrial reseptivite, embriyonun implantasyonuna, invazyonuna ve plasentanın gelişimine izin verir. Endometriyal reseptivite defektif olduğunda bu süreç bozulmuştur ve bu durum açıklanamayan infertilite ve TGK ile sonuçlanır. Bozuk endometrial reseptivitenin nedeni ve endometriyal reseptivitenin değerlendirilmesi için belirteçler hala üzerine çalışılan bir konudur (60).

3. Endokrin Faktörler

TGK etyolojisinin %15-60'ında endokrin faktörler yer alır.

Luteal Faz Defekti

Progesteron, başarılı bir implantasyon ve gebeliğin devamı için gereklidir. Bu nedenle bozulmuş progesteron üretimi ve etkinliği, gebelik başarısını etkileyebilmektedir. Korpus luteum fonksiyonundaki bir defekt, bozulmuş progesteron üretiminin potansiyel nedeni olarak düşünülmektedir, ancak böyle bir defektin gerçekten var olup olmadığı ve düşükle ilişkili olup olmadığı tartışmalıdır. Luteal faz defektinin tanı ve tedavisine yönelik henüz konsensus oluşmamıştır.

Serum progesteron konsantrasyonları, abortus için prediktif olarak düşünülmezken, erken düşüğü önlemek için eksojen progesteron verilmesini destekleyen büyük çalışmalar yoktur (61).

Diabetes Mellitus

Kötü kontrollü Diabetes Mellitus, erken ve geç gebelik kaybıyla ilişkili bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda, erken gebelikteki yüksek hemoglobin A1c değerleri, abortus ve konjenital malformasyon sıklığını arttırdığı gösterilmiştir. HbA1c seviyeleri <%9.3 olduğunda ilk trimester abortus oranları %12.4 iken, >%14.4 olduğunda ise bu oranın %37.5 olduğu gösterilmiştir. Major malformasyon oranları ise sırasıyla %3 ve %40 olarak bulunmuştur (62). Kötü kontrollü diyabetik kadınlarda saptanan abortus açısından artmış risk, hiperglisemi, maternal vasküler hastalık ve olası immunolojik faktörlere sekonder olduğuna inanılmaktadır. Normal veya normale yakın glisemik kontrol sağlandığında, abortus oranlarının artmadığı genel olarak kabul edilen görüştür (63). Polikistik ovaryen kadınlarda görüldüğü gibi insülin rezistansı, gebelik kaybı için bir neden oluşturabilmektedir.

Azalmış over rezervi

Açıklanamayan TGK olan bazı kadınlarda görülen azalmış üreme performansı, azalmış over rezervi ile açıklanabilmektedir. Bu kadınlardaki 3. gün FSH ve estradiol düzeyleri, nedeni bilinen TGK'lı kadınlara göre daha çok artmış olarak bulunmuştur (64). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, ileri derecede overyan foliküler azalma olan kadınlarda, yaşlarından bağımsız olarak gebelik kayıp riski yüksektir. Normalde 37 yaşında başlayan gebelik kaybı sıklığındaki keskin artış, over rezervi azaldığında daha erken başlamaktadır. Artmış FSH konsantrasyonları nedeniyle fertilizasyon sonrası gelişim kusuru gösteren, kötü kalite oositler meydana gelmektedir. TGK'lı olgulara overyan testlerin yapılması ile hem TGK kaybının etyolojisini aydınlatan bilgiler sağlanacak hem de sonraki gebeliklerinde yaş nedeniyle prenatal testler için aday gruba girmeyen kadınlarda fetal anöploid riskini belirlenecektir (2).

Polikistik Over Sendromu (PCOS)

Polikistik over sendromu olan kadınlarda düşük oranı %20-40 olarak saptanmıştır ve bu oran genel obstetrik popülasyondan yüksektir (%10-20) (65). Bu hastalarda artmış gebelik kaybının mekanizması bilinmemektedir, ancak artmış serum Luteinizan hormon, testosteron ve androstenedion konsantrasyonları veya

insülin rezistansı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu seks hormon anormallikleri, erken veya gecikmiş ovulasyona, kötü endometriyal reseptiviteye veya ovaryen büyüme faktör ve sitokinlerin anormal sentez, sekresyon ve hareketlerine neden olduğu düşünülmektedir (66).

Tiroid antikorları ve hastalıkları

Bazı çalışmalarda ötiroid olsalar bile serum tiroid antikorlu (tiroid peroksidaz veya tiroglobulin) kadınlarda fetal kayıp oranının arttığı, tiroid otoimmunitésinin aynı zamanda açıklanamayan infertilite ve implantasyon kusuruna yol açtığı bildirilse de bunun mekanizması net olmadığı gibi bu çalışmalara karşıt görüşte olan çalışmalar da mevcuttur. Bununla birlikte kötü kontrollü hipotirodizm veya hipertroidizm ise infertilite ve gebelik kaybıyla ilişkili bulunmuştur (67). Bir çalışmada hipotiroidik kadınlarda abortus oranları %31.4 iken, T4 tedavisi verilen ve ötiroid olan kadınlarda bu oran %4 olarak bulunmuştur (68) .

4. Koagülasyon Sistemine Ait Patolojiler

Gebelikte protein C seviyelerinde düşme, aktive protein C'ye karşı rezistans, pıhtılaşma faktörlerinde artış, fibrinolizde bozulma gibi fizyolojik değişiklikler sonucunda hiperkoagulabilite durumu meydana gelmektedir. Herediter ve edinilmiş (akkiz) trombofili olarak 2 gruba ayrılan durumlarda ise venöz tromboz riski artmaktadır (Tablo 4) (69).

Tablo 4. Herediter ve edinilmiş (akkiz) trombofili nedenleri

Konjenital Trombofili	Akkiz Trombofili
Faktör V Leiden mutasyonu Protrombin gen mutasyonu Protein S eksikliği Protein C eksikliği Antitrombin eksikliği Disfibrinojenemi Hiperhomosisteinemi	Malignite Santral venöz katater varlığı Cerrahi (özellikle ortopedi) Travma ilaçlar İmmobilizasyon Konjestif yetmezlik Antifosfolipid antikor sendromu Miyeloproliferatif hastalıklar Polisitemi vera Esansiyel trombositemi Paroksizmal noktürnal hemoglobinüri İnflamatuar barsak hastalıkları Nefrotik sendrom

Her iki trombofili şeklinin de gebelik komplikasyonlarındaki patofizyolojileri benzerdir. Plasentadaki intervillöz alanının ve spiral arterlerin trombozu, yetersiz plasental perfüzyona yol açar. Uteroplasental sirkülasyonda ortaya çıkan bu

perfüzyon azlığı, geç fetal kayıp, IUGG, plasental abrupsiyon veya preeklampsiye neden olabilmektedir. İlk trimesterde oluşan maternal trombofili ve TGK arasındaki ilişki üzerine çok sayıda çalışma olmasına rağmen ilişki açık değildir (69). Prospektif çalışmalarda, erken veya geç fetal kayıp ile trombofili arasında ilişki bulunmazken, vaka-kontrol ve retrospektif çalışmalarda ise özellikle geç fetal kayıpla ilişki bulunmuştur.

Faktör V Leiden ve Protrombin gen mutasyonu, protein C, S ve antitrombin III eksikliği, geç fetal kayıpla ilişkilendirilen konjenital trombofili nedenleridir. Homosistein düzeyleri, TGK olgularında yüksek saptandığı halde, bu yolda yer alan MTHFR polimorfizmleri ile TGK ilişkisine yönelik kesin bilgiler yoktur. Bu konuda farklı sonuçlar bildiren çalışmalar mevcuttur (70,71). Faktör XII eksikliğinin TGK riskini arttırdığı düşünülmektedir (72), plazminojen aktivatör inhibitör-1 4G/5G polimorfizmi, artmış plazminojen aktivatör inhibitör aktivitesi, faktör XII C46T polimorfizmi veya faktör XIII polimorfizmleri tek başına direkt TGK nedeni olarak düşünülmemektedir.

Maternal trombofili varlığı, erken gebelik kaybının nedeni olmaktan çok koruyucu olduğu düşünülmektedir. Çünkü erken gebelikte, normalde düşük oksijen çevresi ve uteroplazental sirkülasyonda düşük doppler akımı vardır ve bu durum, hücre proliferasyonunu ve damarlanmayı artırarak plasental gelişimi indüklemektedir. Bu nedenle, erken gebelik kayıplarıyla maternal trombofili arasındaki ilişki, geç gebelik kayıplarıyla ilişkisi kadar net değildir (73, 74).

5. Enfeksiyöz Faktörler

Listeria monocytogenes, toxoplasma gondii, cytomegalovirus, ve primer genital herpes gibi enfeksiyöz etkenlerin sporadik gebelik kaybına neden olduğu bilinmektedir ancak hiçbir enfeksiyöz ajan ile TGK ilişkisi ispatlanamamıştır.

Maternal-fetal yüzün enfeksiyonu direkt olarak trofoblastları, desidual stromayı veya koryoamniyotik membranları aktive ederek proinflamatuvar ve proapoptotik yanıt oluşturduğu, böylece desidual immün hücrelerin normal dağılım ve fonksiyonlarını bozduğu düşünülmektedir. Buna bağlı üretilen toksik metabolik ürünlerin verdiği hasar ve fetusun kendi enfeksiyonu ile abortus gerçekleşmektedir. Etyolojide yer aldığı düşünülen mikroorganizmalar şunlardır (75):

Bakteriler; Listeria monositogenez, Chlamidya Trachomatis, Ureoplasma urealiticum, M.hominins, G.vajinalis , Brusella

Viruslar; CMV, HSV, HIV, Parvovirus Rubella

Parazitler; Toxoplasma gondii, Plasmodium falciparum

Spiroketler; Trepanema pallidum

6. Çevresel Faktörler

Nitrit oksit gibi anestezi gazları, arsenik, anilin içeren boyalar, benzen, etilen oksit, formaldehit, tarım ilaçları, kurşun, civa ve kadmiyum sporadik spontan gebelik kaybıyla ilişkili bulunmuştur (76).

7. İmmunolojik Faktörler

Normal gebelik sürecinin her adımında, immün aracılı olası bir ilişki gösterilmiştir. Buna bağlı olarak hem alloimmün hem de otoimmün mekanizmaların tekrarlayan gebelik kaybı etyolojisinde yer aldıkları bildirilmektedir. Bir annenin semiallojenik konseptusunun tolerasyonuna izin veren mekanizmaların tam olarak aydınlatılamaması nedeniyle, üreme sorunları olduğunda immunolojik faktörlerin rolünü değerlendirmek zordur (77).

Otoimmün bozukluklarda özel bir immün yanıt oluşmaktadır. Sistemik lupus eritematozis ve antifosfolipit sendromu gibi otoimmün hastalıklar tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkili, tanı ve tedavisi olan immunolojik bozukluklardır. Alloimmün bozukluklarda ise fetal veya plasental antijenlere karşı anormal maternal immün yanıt oluşmaktadır. Bu yanıtlar, maternal sitotoksik antikor, maternal bloker antikorların yokluğu, naturel killer hücre fonksiyon ve dağılımlarındaki anormallikler şeklinde özetlenebilir.

Otoimmün Bozukluklar

Çeşitli otoimmün hastalıklar kötü obstetrik prognozla ilişkilendirilmiş olsa da sadece antifosfolipid sendromunda (AFS), gebelik kaybı varlığı hastalık tanısı için bir kriterdir. Klinik tanı kriterlerini, tromboembolik olaylar (arteryel, venöz veya küçük damarlar) ve gebelik kaybı varlığı (10 haftadan küçük ve 3 veya daha fazla kayıplar, 10. haftadan sonraki fetal ölüm, ciddi preeklampsi veya plasental yetersizlik nedeni ile 34. haftadan küçük prematür doğum) içerir.

AFS ve antifosfolipit antikoru olan kadınlar, TGK dışında preeklampsi, plasental yetmezlik ve İUGG açısından da büyük risk altındadırlar. TGK'lı olguların ise % 5-15'inde AFS vardır (78).

AFS'de 1.trimester sonrası görülen gebelik komplikasyonlarının etyolojisinde tromboza bağlı uteroplazental yetmezlik ana neden iken, 1. trimesterde gelişen gebelik kayıpları, trombozla tek başına açıklanamamaktadır. *In vivo* hayvan çalışmalarında, antifosfolipid antikorumun trofoblast ve desiduaı hedef alarak lokal ve sistemik tümör nekrosis faktör alfa (TNF-alfa) artışına ve desiduada kompleman C3 birikimine neden olduğu, doku faktörünün ekspresyonunu ve nötrofilik infiltrasyonu tetiklediği gösterilmiştir (79). Ayrıca kompleman yolağının veya doku faktörünün blokajı sağlandığında, antifosfolipid antikor aracılı gebelik kaybının ve ilişkili inflamasyonunun önlendiği gösterilmiştir (80).

Böylece AFS'deki erken gebelik kaybının nedeninin, maternal-fetal yüzdeki trombozdan ziyade buradaki inflamasyona bağlı olduğu düşünülmüştür. Birinci trimester insan trofoblastları kullanılarak yapılan çalışmalarda, antifosfolipid antikorumun Toll like reseptör 4 sinyal yolları aracılığı ile inflamatuvar cevabı tetiklediği, trofoblastın göç etme yeteneğini inhibe ettiği ve hücrelerin anjiogenik faktör üretimini değiştirdiği gösterilmiştir (81). Özetle, antifosfolipid antikor direkt olarak trofoblast fonksiyonunu değiştirip plasental inflamasyonu indükleyerek ve maternal-fetal yüzde doğal immun yollar yoluyla immun hücre profilini değiştirerek, erken gebelikte abortusa neden olmaktadır.

Sistemik lupus eritematozis de gebelik kayıplarıyla ilişkili otoimmun bir hastalıktır. Çeşitli çalışmalardan elde edilen verilerde, kayıp riskinin yaklaşık %17-45 olduğu belirtilmektedir ve bu kayıplar 2. ve 3. trimesterde olmaktadır (82).

SLE'li olgularda, hipertansiyon, aktif lupus veya lupus nefriti olanlar ile hipokomplementemi, trombositopeni, artmış anti-DNA ve antifosfolipit antikorumları olanlarda gebelik kaybında artmış risk bulunmuştur (83). SLE'deki fetal ölümlerin çoğu özellikle antifosfolipit antikorumlarla ilişkili bulunmuştur. Bu antikorumların varlığı fetal distres ve ölümden en duyarlı belirteç olarak kabul edilmektedir (83).

SLE' de görülen anti-DNA antikorumların, implantasyon için kritik bir molekül olan laminin ile çapraz reaksiyon vermesi nedeniyle gebelik kaybını arttırdığı düşünülmektedir (84).

Alloimmun Bozukluklar

Gebe bir kadında maternal-fetal yüzeyde immün sistemin lokal adaptasyonu sayesinde anne ile hem maternal hem de paternal genleri eksprese eden semiallograft başarılı bir şekilde bir arada yaşayabilmektedir (85). Semiallojenik konseptusun başarılı implantasyonu için uterus programlanmasına, hem paternal antijenler içeren, hem de PGE2 ve TGF beta gibi immunomodulatorları içeren semenle karşılaşmayla başladığı düşünülmektedir (86). Sonrasında implante blastokistin sağlam ve fetusa dönüşmek için yeterli olduğu varsayılırsa, embriyo çeşitli mekanizmalar yoluyla trofoblastlarla tamamen korunmaktadır. Maternal-fetal yüzeyde anormallik olduğunda ise graft rejeksiyonuna benzer bir mekanizmayla gebelik kaybı gerçekleşecektir.

Normal gebelik sürecinde plasentada, sitotoksik adaptif immün yanıt azalmaktayken veya tamamen kaybolurken, düzenleyici adaptif immün yanıt artmaktadır (87). Doğal bağışık yanıt ise infeksiyona karşı konak savunmasını sağlamaya devam etmek ve başarılı plasantasyon ve fetal dokularla iletişim için bozulmadan kalır (88).

İmmün hücreler

Embriyoya karşı maternal immünojenik cevapta ilk göze çarpan değişiklik endometriyal natural killer (NK) hücrelerin, desidual NK hücrelere (CD56⁺CD16⁻) dönmesidir. Fetal trofoblast hücrelerin invazyonu ile desidualdaki immün hücre popülasyonu, desidual NK hücreler, (%70), makrofajlar (%20) ve dendritik hücreler (%2) şekline dönüşmektedir (89). Desidual NK hücreleri, sitotoksiteleri azalmış hücrelerdir. Desidual NK hücrelerin trofoblast çekimi ve invazyonunu sağladığı, plasenta ve trofoblast büyümesini regüle ettiği, desidual ve plasental anjiogenezise yardım ettiği ve lokal immünmodülasyonu sağladığı düşünülmektedir (88,89). Desidual NK hücre sayı ve aktivitelerindeki değişiklikler, immünojenik infertilite, tekrarlayan spontan gebelik kaybı ve preeklampsi gibi gebelik komplikasyonlarında rol oynadığı düşünülmektedir. Bu nedenle, fertilitte ve abortus tedavisinde, NK hücreleri hedefleyen çalışmalar yapılmaktadır (90).

Uterusta çoğu regülatuar olan T (Treg) hücre popülasyonu genişler (tüm hücrelerin yaklaşık %10-20). CD4⁺CD25⁺ regülatuar T hücrelerin, normal gebe kadının desidualındaki varlıkları ve artışı, hem alloantijen bağımlı ve hem de bağımsız yollarla tetiklendiği düşünülmektedir. Bu fetal spesifik Treg hücreler doğumdan sonra da kalır ve sonraki gebelikte hızla tekrar çoğalır (91). Bu hücrelerin

seçici öldürme işlevi nedeniyle, embriyoya karşı daha az immun yanıtı sağlamaktadır. Normal gebelere kıyasla preeklampsili kadınlarda, hem periferik kanda hem de desiduada, daha az Treg hücreleri görülmüş ve fetusa karşı maternal toleransta Treg hücrelerin bir rolü olduğunu düşünülmüştür (92).

CD4⁺/CD8⁻ gama delta T lenfositleri ise gebe uterusunda tanımlanmış ancak rolleri açıklanamamıştır. İmmunsupresif etkili gama delta T hücrelerin, maternal-fetal yüzü immun yanıtıdan koruyabilmek için maternal immun sistemi regüle ettiği düşünülmektedir (93) Gebelikte aynı zamanda, IL-17 üreten CD4⁺ T hücreleri (Th17) tanımlanmıştır. Th17 sayısında ve/veya Th17'nin Treg'e oranında değişme spontan abortus, preeklamsi ve preterm doğum gibi gebelik komplikasyonlarıyla ilişkili bulunmuştur (94).

Desiduada yer alan makrofajlar, gebe kadınlardaki uterin enfeksiyonları önlemek için görev almaktadır. Ancak desidual makrofajlar, M2 (antiinflamatuvar) fenotiple karakterizedir. Bu nedenle bu makrofajların, maternal-fetal yüzde inflamatuvar yanıtı sınırlayan immunsupresif faktörleri üreterek, maternal immun toleransta, vasküler remodelingi arttırmada ve doku homeostasiste daha çok rol aldığına yönelik çalışmalar mevcuttur (89,95). Sonuç olarak, anormal makrofaj aktivasyonu olduğunda, preeklampsisi, İUGG veya preterm doğum gibi gebelik komplikasyonlarının gerçekleşebileceği düşünülmektedir.

Fare çalışmalarında desidual dendritik hücrelerin başarılı implantasyonda ve maternal vaskülarizasyon remodelinginde yer alabileceği gösterilse de insandaki rolü net değildir (96). Dendritik hücreler fetal antijenleri desidua içine saklayarak, periferik T hücrelerine maruz kalmasını önlediği düşünülmektedir. Preeklampsili olguların desidualarında dendritik hücrelerde artış saptanması nedeniyle preeklampsisi patogenezinde bu hücrelerin yer aldığı tartışılmıştır (97)

Trofoblastlar ve HLA

Trofoblast hücreleri, blastokistin eksternal trofoektoderm tabakasından oluşur ve sonra plasenta haline dönüşür. Trofoblast prekürsör hücreleri 3 gelişimsel yoldan birini seçerler: Ya villuslarda hücre havuzu olarak sessiz kalırlar(villöz sitotrofoblast hücreleri) , ya prolifer olup desiduya göç ederek invaze olur ve koryon membranları oluştururlar(ekstravilloz sitotrofoblast hücreleri). Ekstravillöz trofoblast hücreleri, aynı zamanda endotelial tabakanın yerini alarak maternal spiral arterleri invaze ederler(endovasküler trofoblastlar). Son olarak da, gelişen

sinsityotrofoblast hücre tabakası içine karışırlar. Bunlardan ekstravillöz sitotrofoblast hücreleri ve endovasküler trofoblastlar, fetal yüzeye doğru olan kan akımı yoluyla değişken düzeyde, maternal hematopoitik elemanlara maruz kalırken, sadece villöz sitotrofoblast hücreleri, nadiren anne kanına maruz kalır.

Trofoblast hücre membranlarındaki HLA proteinlerinin, diğer hücre tiplerinden farklılıkları mevcuttur. Desiduaya göç eden ekstravillöz trofoblastların hiçbiri, graft rejeksiyonunun primer stimulatörü olan HLA-A veya HLA-B class Ia antijenlerini eksprese etmezken; HLA-E, HLA-F ve HLA-G nin ekspresyonuyla HLA class Ib moleküllerinin benzersiz bir şeklini göstermektedir. Trofoblastlarda HLA moleküllerinin ekspresyonunun sıkı regülasyonu sayesinde, yabancı (paternal) HLA class I antijeni eksprese eden hücrelere saldırmak için programlanmış maternal immun hücrelere karşı fetusun korunduğu düşünülmektedir (98). HLA-G ve HLA-E'nin, makrofaj ve natural killer hücrelerindeki lökosit inhibitör reseptörleri (LIRs) ve CD8+ T hücrelerindeki reseptörler ile etkileşime girerek immun yanıtı azalttığı (99), bu etkileşimlerde herhangi bir bozulmanın da gebelik komplikasyonlarına neden olabileceği bildirilmiştir (100). Paternal kaynaklı HLA class II -D bölge moleküllerini (DR, DP, DQ) kodlayan genler ise tamamen trofoblast hücrelerinde baskılıdır (98).

Solubl ajanlar

Sitokinler, gebeliği sürdürmede immun ve endokrin sistemleri düzenleyerek önemli bir rol oynamaktadır. Proinflamatuvar (Th-1) ve antiinflamatuvar (Th-2) sitokinlerin dengeli salınımının, gebeliğin devam eden gelişiminde önemli olduğu düşünülmektedir. Progesteronla stimüle edilen trofoblast, IL-4 ve IL-10 üreterek desiduada Th0 hücrelerini Th2 hücrelerine dönüştürmektedir bu nedenle progesteron maternal immun yanıtı baskılamaya yardım etmektedir (101). Th1/Th2 sitokinlerinin dengesi, desiduadaki NK hücreleri tarafından regüle edildiği bildirilmiştir.

Gebe farelerle yapılan çalışmalarda, yüksek miktarda Th2 tip sitokinlerin varlığı saptanmıştır. İnsanda ise Th2 antiinflamatuvar hakimiyetinin olabileceğine yönelik bir çok çalışma vardır. Th1 sitokinlere doğru herhangi bir nedenle kaymanın, abortus ve diğer gebelik komplikasyonlarına neden olması beklenmektedir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda servikovajinal veya amniotik sıvıdaki IL-1b, TNF alfa veya IL-6'nın artmış düzeyleri preterm doğumla ilişkili bulunmuştur (102) Ayrıca antiinflamatuvar sitokin olan IL-10'un ise HLA-G üretimini arttırdığı saptanmıştır.

Bir dizi plasental proteini içeren mikrovesiküller ve eksozomlar gibi plasentadan derivate olmuş mikropartiküllerin de gebelikte maternal immün sistemin regülasyonunda rol oynadığı düşünölmektedir. Salınımları ve içeriğindeki değışikler preeklampsi gibi gebelik komplikasyonlarının patogeneğinde yer alabileceğine yönelik çalışmalar mevcuttur (103).

Kompleman Proteinleri

Trofoblast hücreleri, CD46 (membrane cofactor protein [MCP]), CD55 (decay accelerating factor [DAF]), ve CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis [MIRL]) gibi kompleman regülatuar proteinlerini yüksek miktarda eksprese eder (104). Kompleman regülatuar proteinler, maternal sitotoksik antikörlerden ekstraembriyonik dokuları korumak için oldukça önemlidir.

Anne rutin olarak paternal kaynaklı HLA'ya ve trofoblast antijenlerine karşı yüksek miktarda antikor üretir. Bu yolla, immunolojik hedefin (fetal hücre) opsonizasyonu ve destrüksiyonu meydana gelebilir. Oysa bu kompleman aracılı lizis, trofoblast hücrelerinde yüksek miktarda CD46 ve DAF ekspresyonuyla önlenir. Farelerde Crry geninden eksprese olan kompleman regülatuar proteinin yokluğunda, plasentada kompleman birikimi olarak implantasyon bölgesindeki hücrelerin lizisi gerçekleştiğı, bunu ise yoğun inflamatuvar reaksiyon ve fetal ölüm izlediğı saptanmıştır (105). IUGG, TKG gibi gebelikte ilişkili birçok hastalıkta, kompleman aktivasyonu önemli bir mekanizma olarak ortaya çıkmaktadır. Kompleman aktivasyonu ile, desidual dokuya inflamatuvar hücrelerin göçü ve aktivasyonu olmakta, çeşitli faktörlerin salınımlarıyla anjiogenezisi ve fetal büyümeyi riske atan plasental disfonksiyon gerçekleşmektedir.

Şu ana kadar başarılı gebeliğı sağlayan birçok immunolojik mekanizma öğrenilmiş olsa da hala öğrenilecek çok şey vardır. Anjiogenez, HLA-G ve kompleman sistemi disregülasyonlarının gebelik sürecine etkileri en çok üzerinde durulan alanlardır. Herhangi bir immunolojik mekanizmanın TKG'na direkt neden olduğuna yönelik kesin bir kanıt yoksa da açıklanamayan TKG'lı kadınlarda, çeşitli immunolojik tedaviler canlı doğum oranını arttırmak için denenmiş, ancak şu ana kadar hiçbirinin etkili olduğu kanıtlanamamıştır (106).

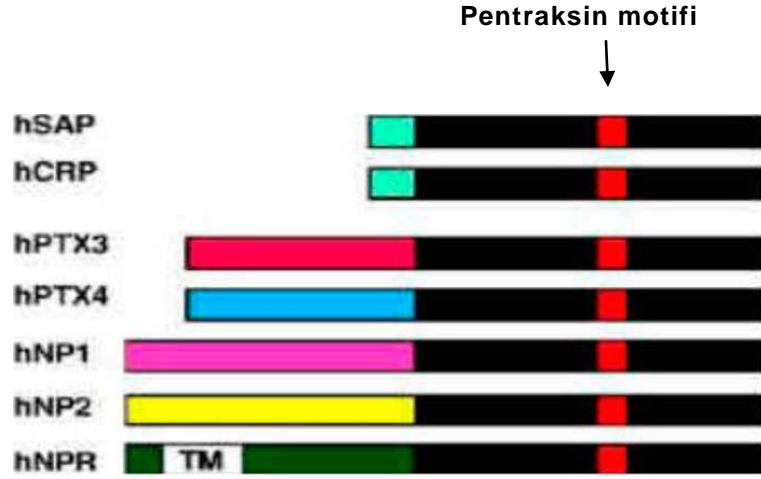
PENTRAKSİN 3 (PTX3)

Doğal bağışıklık, yabancıya karşı filogenetik olarak en eski savunma mekanizmasıdır ve adaptif immun yanıtın aktivasyonu ve oryantasyonunda anahtar rol oynamaktadır. Doğal immun sistem tarafından patojen tanınması, patern tanıma molekülleri (Pattern recognition molecules=PRM) olarak bilinen reseptörlere dayanır (107). Hücrel lokalizasyon ve fonksiyonuna göre, PRM'ler iki ana gruba ayrılır: Hücre ilişkili reseptörler (çöpçü reseptörleri, TLR ve NOD benzeri reseptörler gibi sinyal reseptörleri) ve sıvı faz tanıma molekülleri diğer adıyla opsoninlerdir.

Sıvı faz patern tanıma molekülleri (sPRM) doğal savunmanın önemli efektörleri ve modülatörleridir. Kollektin, fikolin ve pentraksinleri içeren heterojen bir grup molekülden oluşur. sPRM'ler, molekül yapıları açısından heterojenite gösterebilirler de sPRM'lerin kompleman aktivasyonu, opsonizasyon, aglütinasyon ve inflamasyon regülasyonu gibi ortak ve evrimsel korunmuş fonksiyonları vardır (108).

Pentraksinler multimerik bir yapıyla karakterize evrimsel olarak korunmuş bir protein ailesidir. Promotorlarının yapısına göre kısa pentraksinler ve uzun pentraksinler olarak iki gruba ayrılırlar. C-reaktif protein (CRP) ve serum amiloid A (SAP) kısa pentraksinlerin prototipleriyken, pentraxin 3 (PTX3) ve diğer tanımlanmış üyeler uzun pentraksinleri oluşturur (nöronal pentraksin1, nöronal pentraksin 2, nöronal pentraksin reseptör ve PTX4) (109).

PTX3 geni, 3. kromozomda q25'de lokalizedir ve 3 eksondan oluşmaktadır. İlk 2 ekson sırasıyla sinyal peptid ile N-terminal bölgeyi kodlarken, 3. ekson Pentraksinler için klasik olan C-terminal kısmını oluşturur. Bu karboksiterminal bölgelerindeki ((HxCxS/TWxS, x herhangi bir aminoasit) primer dizinin oldukça korunmuş motiflerini içeren yaklaşık 200 aminoasit uzunluğundaki domainlerin varlığı, tüm pentraksinler için klasiktir ve pentraksin imzası olarak bilinir (şekil-2). N terminal bölgelerindeki sistein rezidüleri ise birleşip oktomerler oluşturarak PTX3'ün benzersiz yapısını meydana getirmektedir (110).



Şekil 2. İnsan kısa ve uzun pentraksinlerinin şematik gösterilmesi (111)

Pentraksinlerdeki mevcut olan yapısal benzerliğe rağmen, PTX3'ün gen organizasyonu, kromozomal lokalizasyonu, hücresel kaynağı, indükleyen uyarılar ve tanıdığı ligandlar açısından diğer pentraksinlerden ayrılmaktadır.

Myeloid dendritik hücreler, PTX3'ün major kaynağıdır ancak monosit, makrofaj, endotelial hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri, böbrek epitelyal hücreleri, sinoviyal hücreler, kondrositler, adipositler, alveoler epitel hücreleri, granüloza hücreleri ve glial hücrelerden de eksprese edilmektedir (108, 109). Bu hücrelerde PTX3, uyarıyla eksprese edilmesine karşılık, lenfatik endotelial hücrelerde yapısal olarak eksprese edilmektedir (112). Matür nötrofillerin spesifik granüllerinde ise hazır halde depolanır ve uyarıyla salınımı gerçekleşmektedir (113).

Diğer adı TNF-alfa ile indüklenen protein-14 (TSG14) olan PTX3'ün ekspresyonu, primer proinflamatuvar sitokinler olan IL-1-beta ve TNF-alfa, mikroorganizmalar ve TLR agonistleri, mikrobiyal yapılar (LPS, OmpA, lipoarabinomannan) ve yüksek dansiteli lipoprotein gibi çeşitli uyarılarla hızla indüklenmektedir. IL-10, monosit ve dendritik hücrelerde, PTX3 üretimini artırırken (114), IFN-gama, aynı hücrelerde PTX3 üretimini inhibe etmektedir (115). Myeloid dendritik hücrelerde ise PTX3 ekspresyonu, IL-4, deksametazon, 1alfa,25-dihidroksivitamin D3 and prostoglandin E2 ile inhibe edilir. Glukokortikoidler, hematopoitik hücrelerde (dendritik hücre ve makrofaj) PTX3 üretimini inhibe ederken, non hematopoitik hücrelerde (fibroblast ve endotelial) indüklemektedir (116).

PTX3'ün çok sayıda hücrel ve moleküler hedefleri vardır (Tablo-5) Bu pentraksin 3'e multifonksiyonel bir özellik sağlamaktadır.

PTX3 ligandlarından FGF2, inter- α -tripsin inhibitör (IaI) ve A. Fumigatus, PTX3'ün N-terminal bölgesine bağlanırken, C1q ve P-selektin pentraksin benzeri domaine bağlanmaktadır. Faktör H'nin ise, her iki domainle ilişkisi gösterilmiştir (117).

Tablo 5. Pentraksin 3'ün ligandları (110)

Mikroorganizmalar	Kompleman bileşenleri
Bakteriler	C1q
Pseudomonas aeruginosa	Faktor H
Klebsiella pneumoniae	C4BP
Salmonella typhimurium	M-, L-fikolin
Mantarlar	MBL
Aspergillus fumigatus	Ekstraselüler matriks proteinleri
Saccharomyces cerevisiae	TNF-ile uyarılan gen-6 (TSG-6)
Paracoccidioides brasiliensis	Inter- α -tripsin-inhibitör (IaI)
Virusler	Büyüme faktörleri
Influenza virus	FGF2
CMV	Adezyon molekülleri
Membran bileşenleri	P-selektin
Klebsiella pneumoniae ait dış membran proteini A (KpOmpA)	

PTX-3'ün ilk tanımlanmış ve en iyi karakterize edilmiş ligandı, kompleman yolağının klasik komponenti olan C1q'dur (110). Klasik pentraksinlerden farklı olarak PTX-3, öncesinde protein agregasyonu olmaksızın, kalsiyumdan bağımsız olarak C1q ile etkileşime girer. Nauta ve ark.'nın (118) yaptığı deneysel çalışmada, klasik kompleman kaskatlarının aktivasyonuna neden olan mikroorganizma veya yabancı madde yüzeyine benzetilerek plastik yüzey oluşturulmuş ve bu yüzeye sabitlenmiş

C1q oluşturulmuştur. PTX3'ün plastik yüzeye sabitlenmiş C1q'e bağlandığı saptanmıştır. Sıvı faz PTX3'ün ise, C1q bağımlı kompleman aktivasyonunun belli etkileşim bölgelerini, yarışmalı bloke ederek inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu çalışma ile PTX3'ün kompleman aktivasyonu birbirinden farklı iki etkisi olduğu gösterilmiştir. İlkinde PTX3, mikrop ya da yabancı madde gibi PTX3 bağlayabilen materyalin temizlenmesini sağlarken, sıvı faz halinde olan ikincisinde ise istenmeyen kompleman aktivasyonuna karşı koruyucu rol üstlenmektedir.

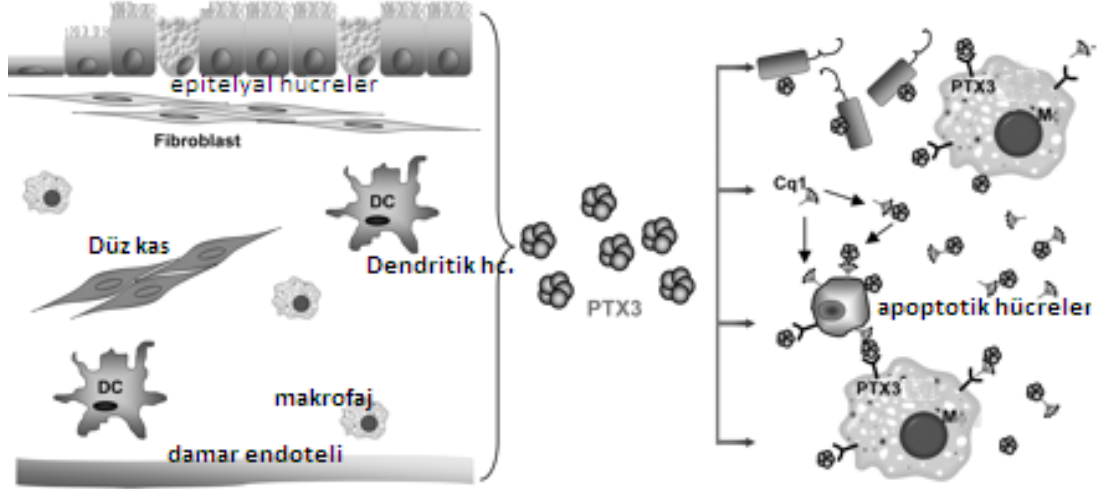
PTX3, komplemanın lektin yolağını, *Aspergillus fumigatus* veya *Candida albicans* gibi mikroorganizmaların yüzeyinde fikolin1, fikolin2 veya mannoz bağlayan lektinle(MBL) etkileşerek bu mikroorganizmaların temizlenmesine yardımcı olmaktadır (119).

PTX3, alternatif yolağın ana solubl regülatörü olan faktör H ile etkileşerek, alternatif kompleman yolağını baskılamaktadır (117). Ekstraselüler matrikste ve apoptotik hücrelerde, yine bu yolaktaki C4BP proteinine bağlanıp C4b inaktivasyonunu artırarak litik C5b-9 birikimini azaltmaktadır (120).

PTX3 aynı zamanda adezyon molekülü olan P selektine bağlanarak, endotelde lökosit dönmesini inhibe etmektedir. Böylece inflamasyon alanına lökosit göçünü azaltmaktadır (121).

PRM'ler, apoptotik hücreleri opsonize ederek fagositler tarafından tanınmalarını module etmektedirler. CRP ve SAP, apoptotik hücreleri opsonize edip temizlenmesini artırırken, PTX3 ise ölen hücrelere bağlanarak bu hücrelerin eliminasyonunu inhibe eder. PTX3'ün C1q ile etkileşimi, C1q'nun apoptotik hücrelere bağlanmasını engellemektedir. Böylece fagositler tarafından, bu hücresel hedeflerin defektif tanınmasına neden olmaktadır (Şekil-3) (122). Dahası PTX3; apoptotik self, viral veya tümöral hücre kaynaklı antijenlerin CD8 + T hücrelerine sunumunu inhibe ederek sitotoksik yanıtı azaltmaktadır (123). Faktör H'nin, apoptotik hücrelerin yüzeyine toplanmasını sağlayarak hasarlı dokuda, komplemanın alternatif yolağının negatif regülatörü olarak bir rol oynamaktadır (117). Ancak nötrofillerin apoptoz sürecinde sitoplazmalarında bulunan PTX3, plazma membranına doğru yer değiştirir. Plazma membran bleblerindeki bu yer değiştirmiş PTX3, fagositler tarafından apoptotik nötrofillerin temizlenmesini arttıran bir molekül gibi davranmaktadır. Membran bağlı PTX3, apoptotik hücrelerin membran permeabilitesini kaybetmeden ve selfantijenlerini salmadan önce eliminasyonlarını arttırmaktadır. İnflamasyon sırasında PTX3'ün hızlı üretimi ve

salınımı sayesinde, selfantijenlere karşı immun yanıtın tetiklenme olasılığı olan proinflatuar bir ortamda, apoptotik hücrelerin yakalanmasını önlediği düşünülmektedir (124).



Şekil 3: PTX3'ün, C1q'ye bağlanarak apoptotik hücrelerin temizlenmesini inhibe etmesi (122)

PTX3, ekstraselüler matriks birikimi ve anjiogenezisi içeren doku remodelingi sürecinde görev almaktadır. Varani ve ark'nın (125) yaptığı çalışmada *Ptx3*^{-/-} dişi farelerde infertilite durumu görülmüştür. Nedeni olarak ise, preovulatar foliküldeki oosit çevresini oluşturan, viskoelastik hiyaluronik asitten oluşan matriksin hatalı oluşumuna bağlanmıştır. Sonrasında yapılan çalışmalarda ise, kümülüs ooforus hücreleri tarafından üretilen PTX3'ün viskoelastik matrikste yer alarak, TNF-alfa ile indüklenen protein 6 ve inter-alfa-tripsin inhibitör gibi ekstraselüler matriks proteinlerine bağlandığı böylece PTX3'ün, kümülüslerin viskoelastik organizasyonu için önemli olduğu düşünülmüştür (126).

PTX3, yüksek afinite ve spesifite ile FGF2'ye bağlanmaktadır. FGF2, yara iyileşmesi, inflamasyon, tümör büyümesi ve aterosklerozis sırasında hücre proliferasyonu, kemotaksisi ve proteaz üretimini arttıran önemli bir anjiogenik indükleyicidir (127). PTX3 inflamasyon sırasında, damar duvarındaki hem endotelial hücreler tarafından hem de düz kas hücreleri tarafından üretilmektedir. PTX3'ün FGF2'ye bağlanmasıyla, *in vitro* düzeyde FGF2 bağımlı ekstraselüler proliferasyonun, *in vivo* düzeyde ise anjiogenezin inhibe edildiği gösterilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda ise PTX3-FGF2 etkileşimi yoluyla anjioplasti sonrası

neovaskularizasyon ve restenoz sürecini dengeleyerek düz kas hücre aktivasyonu ve proliferasyonunun inhibe edildiği düşünülmektedir (127).

PTX3, iyi bir akut faz proteindir. PTX3 kan düzeyleri, normal şartlarda <2ng/ml gibi oldukça düşük düzeyde saptanırken, endotoksik şok, sepsis ve diğer inflamatuvar ve enfeksiyöz koşullarda hızla ve dramatik olarak (6-8 saatte pik yapar) (200-800ng/ml) arttığı görülmüştür (128). Üstelik kan düzeyleri, hastalığın şiddetiyle korele olarak yükselmektedir.

Gebelik Sürecinde PTX3

Her üreme siklusunda, endometriyumun blastokist implantasyonuna açık olduğu implantasyon penceresi denilen dönemdeki değişiklikler, östrojen pikini izleyen progesteron varlığında gerçekleşen, endometriyumun transformasyonunu, desidualizasyon denilen endometrial stromal hücrelerin differansiyasyonunu, çok sayıda lökositin buraya infiltrasyonunu, ekstraselüler matriksin modifikasyonunu ve vasküler permeabilite artışını içermektedir. Sağlam blastokistin trofoektodermine, uterusun luminal epiteliyle iletişime girmesiyle implantasyon başlar. İmplantasyon penceresindeki selektinler (L-selektin), integrinler (alfa5beta1), EGF, CSF-1, LIF gibi çok sayıda molekül ile adezyon sağlanır. Bu fazı, implantasyon aşaması izler ve 20. gestasyon haftasına kadar sürer. İmplantasyon aşamasında başta trofoblastlar olmak üzere çok sayıda hücre görev almaktadır. Başta metalloproteinazların kontrollü üretimi sayesinde, interstisyel trofoblastlar desiduayı invaze eder. Trofoblastlar, spiral arter ve arteriollerini penetre ederek endovasküler sitotrofoblastlar haline gelir ve bu damarların endotel ve düz kas tabakalarını transforme ederler. Normal plasental gelişim, vasküler endotelial büyüme faktörü ve plasental büyüme faktörü gibi anjiogenik plasental faktörlerin ve invazif trofoblastlardaki reseptörlerin koordineli ekspresyonunu gerektirmektedir (2).

Desidualize stromal hücrelerin önemli immunmodulatuvar rolleri vardır ve birçok inflamatuvar mediatör üretir. Özellikle IL-1beta ve TNFalfa ise fetomaternal yüzdeki proinflamatuvar kaskadın aktivasyonundan sorumlu aday genler olarak ortaya çıkmaktadır. Bu primer proinflamatuvar sitokinler ile kemokinler, COX-2, prostaglandinler, LIF, metalloproteinazlar, pentraxin 3 gibi sekonder mediatörlerin ve çeşitli adezyon moleküllerinin ekspresyonu aktive edilmektedir (129).

PTX3, amniyotik epitel, koryonik mesoderm, trofoblast terminal villuslarda ve plasentanın perivasküler stromasında eksprese edilmekte ve gebelik boyunca artarak doğumda pik yapmaktadır (130).

Farelerde ve insanda yapılmış gen ekspresyon çalışmalarında gösterilmiştir ki, çok sayıda immunolojik genin ekspresyonu, blastokistin implantasyon bölgesinde baskılanmış halde iken, PTX3 ve DAF1 (decay accelerating factor 1) gibi çok az genin ekspresyonu artmaktadır (131). Bu genlerin upregülasyonu sayesinde, embriyonun maternal immunolojik yanıtta veya diğer zararlı uyarılardan korunduğu düşünülmüştür. İmplantasyon sırasındaki trofoblastlar tarafından indüklenen lokal immun çevre değişimine benzer şekilde, PTX3 ekspresyonunun da trofoblastlar tarafından indüklendiği gösterilmiştir (132). *PTX3*^{-/-} farelerde gözlenen hatalı desidualizasyon ve implantasyon nedeniyle PTX3'ün, blastokist invazyonu için endometrial diferansiyasyonda ve hazırlık aşamasında önemli bir rol oynadığı düşünülmüştür (133). Popovici ve ark.'nın (132) yaptığı çalışmada ise, PTX3 ekspresyonunun uterin stromal hücrelerde progesteron varlığında ve trofoblast içeren ortamda upregüle edildiği gösterilmiştir. Trofoblastlardan üretilen IL-1, önemli derecede stromal PTX3 üretimini arttırırken, hCG'nin etkisi olmadığı gösterilmiştir. İmmunhistokimyasal çalışmalarda ise, PTX3'ün perivasküler bağ dokusunda, endotelial hücrelerde, gebe olmayan uterusun interstisyumunda bulunduğu, 1. trimester desiduasında özellikle trofoblastlara yakın kısmında ekspresyonun arttığı saptanmıştır. PTX3 ayrıca, terminal villus ve fetal membranlarda da gözlenmiştir (130).

GEREÇ ve YÖNTEM

OLGULARIN SEÇİMİ

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim dalı arşivinde bulunan Ocak 2008- Haziran 2014 yılları arasındaki düşük materyallerine ait dosyalar incelenmiştir. Kromozom analizi normal olan düşük materyallerine sahip hastalardan, daha önce nedeni açıklanamamış iki veya daha fazla gebelik kaybı öyküsü olan hastalar değerlendirilmiştir. Bunlardan parental kandan yapılan kromozom analizi normal olan, maternal trombofili panelinde TGK etyolojisini açıklayacak patoloji saptanmayan, yapılan USG veya histerosalpingografisinde maternal uterin anomalisi olmayan, bilinen sistemik hastalığı bulunmayan ve düşük materyalinin histolojik incelemesinde patolojik bulguları olmayan 50 plasenta ve endometrium küretaj materyali hasta grubu olarak çalışmaya alınmıştır.

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na Ocak 2013- Ocak 2014 yılları arasında plasentaları histopatolojik inceleme için gönderilmiş, bilinen hastalığı olmayan, bilinen gebelik kaybı öyküsü olmayan, preeklampsi, eklampsi, preterm doğum gibi gebelik komplikasyonu olmadan doğumunu gerçekleştiren, doğan bebekte IUGG saptanmayan ve plasentasının histolojik incelemesinde patolojik bulgu saptanmayan 50 olgunun plasentaları ise kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır.

Çalışma için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilip, %10 formaldehit solusyonu ile tespit edilen ve sonrasında parafin bloklara gömülen endometrial veya plasental arşiv doku örnekleri kullanılmıştır. Arşivden hastalara ait örnekler çıkarılarak, daha önce alınmış kesitler mikroskopta incelenmiş ve maternal yüze ait çalışmaya uygun en iyi kesitler çalışma için seçilmiştir.

Çalışma öncesinde Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 13.01.2014 tarihinde 2014/1-1 karar numarası ile onay alınmıştır. Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonu tarafından desteklenmiştir.

YÖNTEM

Çalışma materyali eldesi için arşiv doku örneklerine ait kesitlerden desidua ve ekstrasvillöz trofoblastların en iyi şekilde yer aldığı maternal kısma ait olan dokular seçildi ve dokular 10 mikronluk 2-3 kesit halinde 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alındı.

Doku Örneklerinin Deparafinizasyon İşlemi

1. Ependorf tüp içerisindeki parafine gömülü dokunun deparafinizasyon işlemi için, önce ependorf içerisine 800 µl ksilen konuldu.
2. 56 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Sonrasında 4'er saniye 3 kez vortekslenerek 56 °C'de 2 dakika inkübe edildi. Yine 4'er saniye 3 kez vorteksleme işleminden sonra 56 °C'de 5 dakika inkübe edildi.
3. 14000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant alınarak önceki basamaklar sırasıyla tekrar edildi.
5. Santrifüj sonrası süpernatant alındıktan sonra pellet üzerine 800 µl %96 etanol konularak 4'er saniye 3 kez vortekslendi.
6. 14000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
7. Süpernatant alındıktan sonra pellet üzerine 800 µl %70 etanol konularak 4'er saniye 3 kez vortekslendi.
8. 14000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
9. Süpernatant alındıktan sonra 5-15 dakika alkol buharlaşana kadar 55°C'de inkübe edildi.

Total RNA İzolasyonu

Deparafinizasyon işleminden geçmiş olan dokulardan RNA izolasyonu için RNeasy FFPE kit (Qiagen) kullanıldı.

1. Ependorf içindeki dokular oda sıcaklığına geldiğinde üzerine 150 µl buffer PKD eklendi.
2. 10µl proteinaz K eklenerek hafifçe pipetaj yapılarak karışması sağlandı.
3. 56°C'de 15 dakika ve 80°C'de 15 dakika inkübe edildi.

4. Ardından buz bloklarında 3 dakika bekletildikten sonra 20000xg'de 15 dakika santrifüj edildi.
5. Süpernatant yeni 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alınarak üzerine 16 µl DNase Booster Buffer ve 10 µl DNase I stok solüsyonu eklendi. Tüpler hafifçe alt üst yapılarak karışması sağlandı.
6. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrası örneklerin üzerine önce 320 µl buffer RBC, sonra 720 µl %100 etanol eklenerek pipetaj yapıldı.
8. Örnekten 700 µl alınarak RNeasy MinElute spin kolonlara konuldu ve 15 saniye 10000xg'de santrifüj edildi. Süzülen kısım atılarak kalan örnekle aynı işlem yapıldı.
9. 500 µl buffer RPE kolonlara yüklenerek 15 saniye 10000xg'de santrifüj edildi. Süzülen kısım atılarak yine 500 µl buffer RPE ile 2 dakika 10000xg'de santrifüj edildi.
10. Santrifüj sonrası RNeasy MinElute spin kolonlar yeni 2 ml lik toplama tüplerine yerleştirilerek son hızda kapak ağzı açık şekilde 5 dakika santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonrası RNeasy MinElute spin kolonlar yeni 1.5 ml lik toplama tüplerine yerleştirilerek 20 µl RNase free water eklenerek 1 dakika son hızda santrifüj edilerek RNA izolasyonu tamamlandı.

Total RNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının ve Saflık Derecelerinin Belirlenmesi

Olgu ve kontrol grubuna ait örneklerden izole edilen total RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesiyle değerlendirilen spektrofotometrik yöntemle (NanoDrop, Thermo Sci. USA) belirlendi. A260/A280 absorbans oranınının 1,8-2,0 dışındaki ve düşük konsantrasyondaki RNA eldesi olan örneklerden tekrar kesit alınarak izolasyon işlemi tekrarlandı. Konsantrasyon ve saflık düzeyleri belirlenen RNA'lar PCR işlemine kadar -80°C'de saklandı.

Gerçek-Zamanlı Kantitatif PCR

PTX3 (hedef gen) ve *β-aktin* (referans gen) için relatif kantitasyon analizi, gerçek-zamanlı PCR sistemi (LightCycler 480 Gerçek-zamanlı PCR Sistemi, Roche Diagnostics) kullanılarak yapıldı. Hedef genlerin ve referans genin mRNA düzeyinde ekspresyon analizi için kullanılan primer ve prob setleri “Universal Probe Library (UPL)”den (Roche) seçildi. Gerçek-zamanlı PCR analizinde kullanılan bu setlere ait diziler ve UPL numaraları Tablo 6’de verildi.

Tablo 6. RT-PCR’da kullanılan primer setleri ve UPL numaraları

<i>PTX3</i>		
Primer seti	GCGGTGCTAGAGGAGCTG GGAATAAAATAGCTGTTTCACAACCT	(Forward) (Reverse)
UPL numarası	Probe no: #23 (04686977001)	
<i>β-aktin</i>		
Primer seti	CGACAGGATGCAGAAGGAG AGGAGGAGCAATGATCTTGATCT	(Forward) (Reverse)
UPL numarası	Probe no: #37 (04687957001)	

PTX3 geninin mRNA düzeyinde relatif ekspresyonunu değerlendirebilmek için, öncelikle örnek başına total hacim 25 µl olacak şekilde tablo 6’daki şekilde optimize edilen Qiagen OneStep RT-PCR kit ile gerçek-zamanlı PCR karışımı hazırlandı. Bu protokol, her bir örneğe ait RNA başına, hem hedef gen olan *PTX3* ve hem de referans gen olan *β-aktin* için uygulandı.

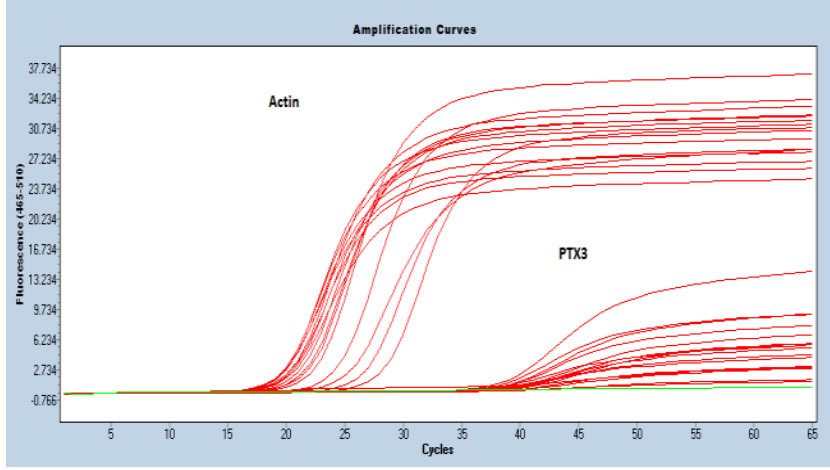
Tablo 7. OneStep RT-PCR kit ile optimize edilen gerçek-zamanlı PCR karışımı

One Step RT- PCR		
Tek reaksiyon (hacim)	Tek reaksiyon (konsantrasyon)	Bileşenler
10.775 µl	-	Su, PCR- grade
1.25 µl	3 mM	25 mM Mg ⁺² solüsyonu
1.25 µl	0.5 µM	Forward Primer (ara stok 10 µM)
1.25 µl	0.5 µM	Reverse Primer (ara stok 10 µM)
0.375 µl	0.15 µM	UPL probe (ara stok 10 µM)
0.1 µl		RNAse inhibitör
1 µl		Enzim Karışımı
5 µl		Buffer 5x
1 µl		dNTP mix
1 µl		Q solution

Karışım spin ettirilerek bu karışımdan kapilerlere her bir reaksiyon için 23 µl transfer edildi. Örneğe ait RNA'dan 2 µl, son reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan kapilerler, soğuk bloktaki adaptörleri ile birlikte 2000 rpm' de 15 saniye santrifüjlendi. LightCycler 480II cihazına yerleştirildi (Şekil-4). Optimize edilen reaksiyon şartları tablo 8' de gösterilmektedir.

Tablo 8. Optimize edilen reaksiyon şartları

Program	cDNA	Denaturasyon	Amplifikasyon			Cooling
Analiz modu	yok	Yok	Kuantifikasyon modu			yok
Döngü	1	1	45			1
Hedef (°C)	50	95	95	60	72	40
Süre (hh:mm:ss)	00:30:00	00:15:00	00:00:10	00:00:30	00:00:01	00:00:30
Kazanım Modu	Yok	Yok	Yok	Yok	Tek okuma	Yok



Şekil 4: LightCycler 480II cihazında değerlendirilen örneklere ait amplifikasyon eğrileri

Sonuçlar Comparative Ct yöntemi ile hesaplandı. Hasta ve kontrollere ait her bir örneğin eşik döngü (C_T =threshold cycle) değerleri hem *PTX3* hem de β -*aktin* genleri için LightCycler Relatif Kantitasyon Yazılım Programı kullanılarak iki kez hesaplandı.

Her örneğin hedef gen ekspresyonu, referans gen olan β -*aktin* ekspresyonuna göre normalize edildi. Bunun için $\Delta C_T = C_{T\ PTX3} - C_{T\beta\text{-aktin}}$ denklemi kullanıldı. Hasta grubunun ekspresyon düzeylerini kontrol grubunkilerle karşılaştırmak için her bir grubun ortalama ΔC_T değerleri aşağıdaki hesaplama kullanılarak ayrı ayrı yapıldı. $\frac{\Delta C_{T-H1} + \Delta C_{T-H2} + \dots + \Delta C_{T-H50}}{50}$

50

Hasta ve kontrollere ait ortalama ΔC_T oranlanarak ekspresyon miktarları arasında kaç kat fark olduğu hesaplandı.

İmmünohistokimyasal (İHK) Analiz:

Seçilen % 10 formalinde fikse edilmiş parafine gömülü dokulardan kesilen 5 mikron kalınlığındaki dokular, adeziv (polilizin) kaplı lamlara alındı. Bu lamlar, deparafinizasyon için 60°C'lik etüvde 2 saat bekletildikten sonra boyama için Ventana BenchMarkXT 8 (Ventana, Tuscon, AZ) cihazına yerleştirildi. Deparafinize dokular, antijen ortaya çıkarma işlemi için 60 dakika CC2 solüsyonunda (sitrata buffer (pH 6)- Ventana) bekletildikten sonra, anti-PTX3 antikorlar kesitler üzerine damlatıldı ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Karşıt boyama için 4 dakika Ventana'nın hematoksilen solüsyonunda ve 4 dakika Bluing reagent solüsyonunda bekletildi. Cihazdan çıkarılan örnekler sırası ile % 70, % 80 ve %100'lik alkollere

daldırılıp çıkarılarak 1 dakika ksilende bekletildi. Kurutulduktan sonra lamelle kapatıldı.

Kesitlerdeki PTX3 ekspresyonunun semikantitatif skorlandırması, hücrelerin ve sitoplazmanın pozitif/negatif boyanmasına göre, Willeke F ve ark. (124) tarafından belirtildiği şekilde yapıldı .

- 0 immunreaktif hücreler/sitoplazma yok,
- 1 hücreler/sitoplazmanın %1-10'u boyanmış,
- 2 hücreler/sitoplazmanın %11-25'i boyanmış,
- 3 hücreler/sitoplazmanın %26-50'si boyanmış,
- 4 hücreler/sitoplazmanın >%50'si boyanmış olarak değerlendirildi.

Analiz edilen dokulardaki ekstravillöz trofoblast, desidua, endotel, villöz stroma bölgeleri yukarıdaki boyanma oranlarına göre ayrı ayrı değerlendirildi.

İstatiksel Analiz

Veriler SPSS 21 paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, ortanca (minimum - maksimum değerler) olarak verildi. Bağımsız grup karşılaştırmaları için parametrik test varsayımlarının sağlanması durumunda iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi olan Mann Whitney U testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki korelasyonlar ise Spearman korelasyon analizi ile incelendi.

BULGULAR

Hasta grubu olarak 50 plasenta ve endometriyum küretaj örneği, kontrol grubu olarak 50 plasenta örneği alındı.

Nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan hasta grubunun abortus sırasındaki maternal yaşları, en küçüğü 22, en büyüğü 40, ortalaması ise $29.76 \pm 5,04$ idi. Özgeçmişlerinde bilinen en az 2, en fazla 5, ortalama 2.34 düşüğü mevcuttu. Bu olguların ortalama canlı doğum sayısı 0.46 idi. 30 hastanın hiç canlı doğum öyküsü yokken (%60), 17 hastanın bir tane sağlıklı canlı doğum öyküsü (%34), 3 hastanın ise iki canlı doğum öyküsü (%6) vardı. Çalışılan plasenta ve endometrium küretaj örneklerinin abortus zamanları 5 ve 20 hafta arasında değişmekteyken, ortalaması 10.16 haftaydı (Tablo-9).

Tablo 9. Hasta grubunun genel bilgileri

	Ortalama \pm Std. Sapma	Ortanca (min – maks)
Yaş (n=50)	29,76 \pm 5,04	29 (22 - 40)
Düşük sayısı (n=50)	2,34 \pm 0,77	2 (2 - 5)
Düşük haftası (n=50)	10,16 \pm 3,58	9 (5 - 20)
Canlı doğum sayısı (n=50)	0,46 \pm 0,61	0 (0 - 2)
İmmunohistokimya skorlama (n=50)	3,04 \pm 0,97	3 (1 - 4)
ΔC_T değerleri (n=50)	0,0014 \pm 0,0059	0,0001 (0,000-0,0418)

Daha önce bilinen abortus veya patolojik tıbbi öyküsü olmayan, gebelik komplikasyonu gelişmemiş ve zamanında doğum yapan kontrol grubunun yaşları en küçüğü 19 ve en büyüğü 41 iken ortalama yaş $29.34 \pm 4,51$ 'dü. Bu olguların en az 1, en fazla 4 defa canlı doğum öyküsü mevcuttu. Ortalama canlı doğum sayısı 1,68 saptandı. Hasta ve kontrol gruplarının genel bilgileri aşağıdaki gibidir (Tablo 10).

Tablo 10. Kontrol grubunun genel bilgileri

	Ortalama \pm Std. Sapma	Ortanca (min – maks)
Yaş (n=50)	29,34 \pm 4,51	29 (19 - 41)
Canlı doğum sayısı (n=50)	1,68 \pm 0,74	2 (1 - 4)
İmmunohistokimya skorlama (n=50)	1,66 \pm 0,87	1 (1 - 4)
ΔC_T değerleri (n=50)	0,000012 \pm 0,000038	0,000002 (0,000 - 0,000264)

Hasta grubunun yaş ortalaması 29,76, kontrol grubunun yaş ortalaması 29.34 olarak saptandı. Yaşları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (p değeri 0,819) (tablo-11).

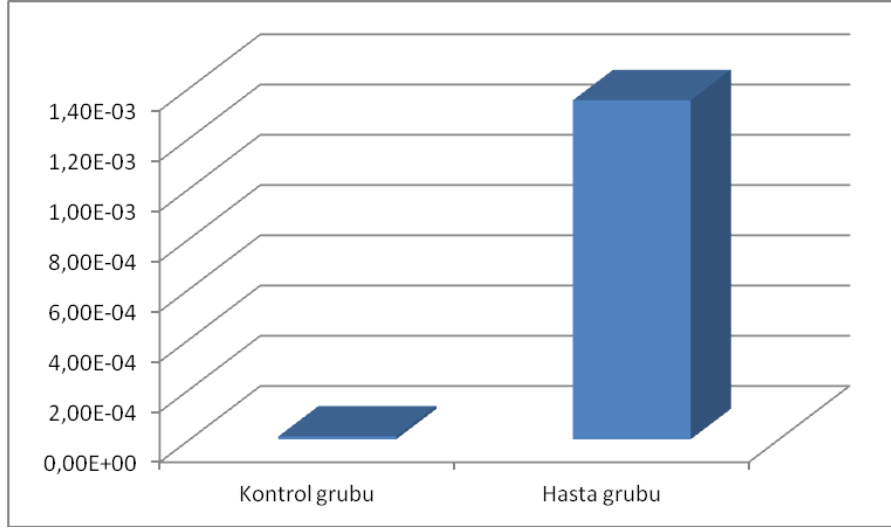
Hasta ve kontrol grubunun sağlıklı gebelik sayısı karşılaştırıldığında, hasta grubunun ortalama önceki sağlıklı gebelik sayısı 0,46 iken kontrol grubunda bu değer 1,68'di ve istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık bulunmuştur (p değeri 0,0001) (Tablo 11).

Tablo 11. Hasta ve kontrol gruplarının yaş, canlı doğum sayısı, ΔC_T değerleri ve immunhistokimyasal analiz sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması

		Ortalama \pm Std. Sapma	Ortanca (min – maks)	p
Yaş	hasta	29,76 \pm 5,04	29 (22 - 40)	0,819
	kontrol	29,34 \pm 4,51	29 (19 - 41)	
Canlı doğum sayısı	hasta	0,46 \pm 0,61	0 (0 - 2)	0,0001*
	kontrol	1,68 \pm 0,74	2 (1 - 4)	
ΔC_T değerleri (normalize ekspresyon değerleri)	hasta	0,0014 \pm 0,0059	0,0001 (0,000-0,0418)	0,0001*
	kontrol	0,000012 \pm 0,000038	0,000002 (0,000 - 0,000264)	
İmmunohistokimya skorlama	hasta	3,04 \pm 0,97	3 (1 - 4)	0,0001*
	kontrol	1,66 \pm 0,87	1 (1 - 4)	

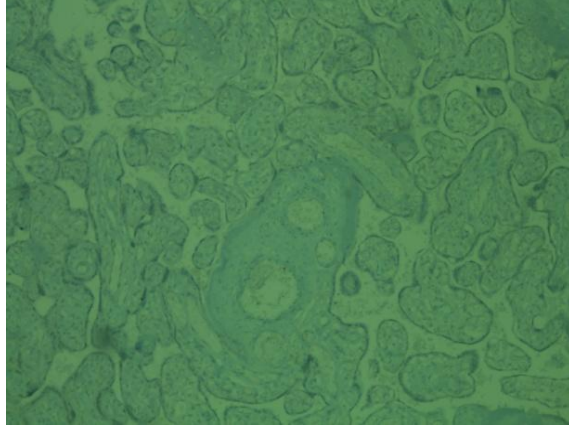
Her örnek için $C_{T\ PTX3} - C_{T\beta\text{-aktin}} = \Delta C_T$ şeklinde hesaplanarak normalize edilen ekspresyon değerlerinin hasta ve kontrol grubunda ayrı ayrı aritmetik ortalaması alındı. Hasta grubunun ortalama ΔC_T değeri 0,0014 \pm 0,0059 iken kontrol grubunun ortalama ΔC_T değeri 0,000012 \pm 0,000038 saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (p değeri 0,0001) (Tablo 11).

Hasta grubunun ortalama *PTX3* gen ekspresyon "fold change" değeri $\Delta\Delta C_t$ değeri hesaplanarak ortaya kondu. Hasta/Kontrol $\Delta\Delta C_t$ değeri 116,38 olarak saptandı. Başka bir ifadeyle hasta grubunda kontrol grubuna göre *PTX3* gen ekspresyonu 116 kat artmış bulundu (şekil 5).

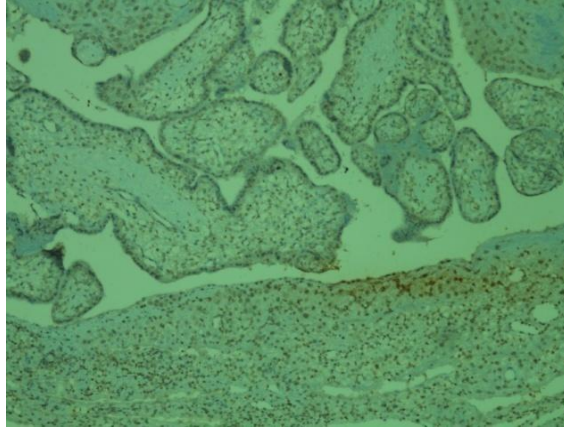


Şekil 5. Hasta ve kontrol grubunun ortalama ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması

Hasta grubundaki 50 plasenta/ endometrium küretaj materyali ve kontrol grubundaki 50 plasentanın maternal yüzlerinden alınan kesitlerinin PTX3'ün immünohistokimyasal boyamasında, hücrelerin boyanma yüzdesi ve boyanma lokalizasyonuna göre (villöz stroma, desidua, terminal villuslar, endotelial hücreler, trofoblastlar) semikantitatif skorlandırılarak değerlendirildi. (1=hücrelerin %1-10'u, 2=hücrelerin %11-25'i, 3=hücrelerin %26-50'si, 4=hücrelerin >%50'si boyanmış olarak değerlendirildi). Hasta grubunda ortalama boyanma pozitifliği $3,04 \pm 0,97$ saptandı. Kontrol grubunda bu değer $1,66 \pm 0,87$ idi. Boyanma miktarı açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (p değeri 0,0001) (Tablo 10). Boyanma dağılımına bakıldığında ise hasta ve kontrol grubunda anlamlı farklılık yoktu. Şekil 6 ve 7'te boyanma düzeyi 1+ ve +4 olarak değerlendirilen olgular yer almaktadır.



Şekil 6. PTX3 için immün boyama uygulanmış ve '+' olarak değerlendirilen plasental kesite ait bir görünüm (x40).



Şekil 7. PTX3 için immün boyama uygulanmış ve '++++' olarak değerlendirilen plasental kesite ait bir görünüm (x40). (Sitoplazmik düzeyde ve kahverengi olarak görünen, desidua ve ekstravilloz trofoblast hücrelerinde şiddetli pozitif reaksiyon izlenmektedir)

Tüm kişiler incelendiğinde, normalize ekspresyon değerleri ile immunhistokimyasal skorlandırma arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde hafif düzeyde bir ilişki gözlenmiştir ($p=0,023$; $r=0,227$). Tüm popülasyonda, önceki canlı doğum sayısı ile normalize ekspresyon değerleri ve immunhistokimya skorlandırması arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif yönde hafif düzeyde bir ilişki gözlenmiştir (sırasıyla $p=0,000$; $r=-0,399$ ve $p=0,000$; $r=-0,397$). Canlı doğum sayısı ile maternal yaş karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde hafif düzeyde bir ilişki gözlenmiştir ($p=0,001$; $r=0,318$) (Tablo-12). Yapılan diğer karşılaştırmalarda ise istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmamıştır.

Tablo 12.Tüm kişiler için maternal yaş, canlı doğum sayısı, normalize ekspresyon düzeyi ve immunohistokimyasal skorlandırma parametrelerinin karşılaştırılması (*istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur)

		Yaş	Canlı doğum sayısı	İmmuno histokimya	ΔC_T değerleri
Yaş	r	1,000	0,318	0,110	0,009
	p	-	0,001*	0,276	0,933
Canlı doğum sayısı	r		1,000	-0,397	-0,399
	p			0,000*	0,000*
İmmunohistokimya skorlandırma	r			1,000	0,227
	p				0,023*
ΔC_T değerleri	r				1,000

Hasta grubunun normalize ekspresyon değerleri ile maternal yaş, canlı doğum sayısı, önceki düşük sayısı, düşük haftası, immunohistokimya boyama skorlandırması karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmamıştır (Tablo-13). Maternal yaşın artmasına bağlı canlı doğum sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde hafif düzeyde bir ilişki gözlenmiştir (Tablo-14).

Tablo 13. Hasta grubu için maternal yaş, canlı doğum sayısı, önceki düşük sayısı, düşük haftası, immunohistokimyasal skorlandırma ile normalize ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.

	HASTA GRUBU ΔC_T DEĞERLERİ
YAŞ	r= -0,112 p= 0,437
CANLI DOĞUM SAYISI	r= -0,057 p= 0,693
ÖNCEKİ DÜŞÜK SAYISI	r= -0,157 p= 0,275
DÜŞÜK HAFTASI	r= -0,144 p= 0,320
İHK SKORLANDIRMA	r= -0,123 p= 0,393

Tablo 14. Hasta grubu için maternal yaş, canlı doğum sayısı, immunhistokimyasal skorlandırma, normalize ekspresyon düzeyi, düşük sayısı ve düşük haftası parametrelerinin karşılaştırılması. (*istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur)

		Yaş	Canlı doğum sayısı	İmmuno histokimya	ΔC_T değerleri	Düşük sayısı	Düşük haftası
Yaş	r	1,000	0,432	0,000	-0,112	0,239	-0,273
	p		0,002*	0,999	0,437	0,094	0,056
Canlı doğum sayısı	r		1,000	0,087	-0,057	0,158	0,122
	p			0,550	0,693	0,273	0,400
İmmuno histokimya skorlandırma	r			1,000	-0,123	0,232	0,156
	p				0,393	0,105	0,278
ΔC_T değerleri	r				1,000	-0,157	-0,144
	p					0,275	0,320
Düşük sayısı	r					1,000	0,029
	p						0,842
Düşük haftası	r						1,000

Hasta grubunun normalize ekspresyon değerleri ile bu grupta daha önce canlı doğumu olmayanlar ve olanlar karşılaştırıldığında, daha önce canlı doğum sayısı 1 veya daha fazla olanlarda istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon artışı gözlenmiştir (Tablo-15).

Tablo 15. Hasta grubu için normalize ekspresyon düzeylerinin daha önce canlı doğum olup olmamasına göre karşılaştırılması

		Ortalama \pm Std. Sapma	Ortanca (min –maks)	p değeri
ΔC_T değerleri (normalize ekspresyon değerleri)	Canlı doğumu olmayanlar	0,000635 \pm 0,00099	0,000153 (0,00000 - 0,00334)	0,0001
	1 veya daha fazla canlı doğumu olanlar	0,000704 \pm 0,00500	0,000004 (0,00000 - 0,0418)	

Kontrol grubunun normalize ekspresyon değerleri maternal yaş, canlı doğum sayısı ve immunohistokimyasal skorlandırma ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmamasına rağmen, maternal yaşın artmasıyla canlı doğum sayısı ve immunohistokimyasal skorlandırma arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde hafif düzeyde bir ilişki gözlenmiştir (Tablo 16)

Tablo 16. Kontrol grubu için maternal yaş, sağlıklı gebelik sayısı, immunhistokimyasal skorlandırma, normalize ekspresyon düzeyi parametrelerinin karşılaştırılması. (*istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur)

		yaş	Canlı doğum sayısı	İmmuno histokimya	ΔC_T değerleri
yaş	r	1,000	0,498**	0,288*	-0,118
	p		0,000	0,043	0,415
Canlı doğum sayısı	r		1,000	0,077	-0,028
	p			0,593	0,845
İmmuno histokimyasal skorlandırma	r			1,000	-0,164
	p				0,256
ΔC_T değerleri	r				1,000

TARTIŞMA

Pentraksin 3, doğal immun sistemin sıvısal kısmını kompleman sistemiyle birlikte oluşturan, inflamasyonda efektör ve modulatör olarak anahtar rol oynayan, çok sayıda farklı ligandla etkileşim kapasitesiyle multifonksiyonel özelliği olan, normal koşullarda kan düzeyinin düşük olması ve inflamatuvar koşullarda hastalığın şiddetiyle korele olarak, düzeylerinin hızla ve dramatik olarak artışı nedeniyle iyi bir akut faz reaktanı olan patern tanıma molekülüdür. Şu ana kadar birçok hastalıkta, doku ve kanda çalışılmış, farklı mekanizmalarla hastalığın patogenezinde ve kliniğinde önemi vurgulanmıştır. Bu çalışmada ise; nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olan olgularda literatürde ilk kez, endometrial küretaj ve plasenta örneklerinden PTX3 düzeyleri, qRT-PCR ve immunhistokimyasal yöntemlerle araştırıldı. Literatürde benzeri olmadığı için yakın hastalıklar ve hipotezlerle karşılaştırdı.

Uterusta, implantasyon sırasında ve tüm gebelik boyunca meydana gelen immun sistem modifikasyonları sayesinde semiallojenik fetus, maternal immun sistemden korunur. Birçok gebelik komplikasyonunun ise maternal immun sistemdeki problemler veya anormal fetomaternal immun ilişkiler nedeniyle oluştuğunun kanıtları her geçen gün artmaktadır (135, 136). Özellikle fetal allograft rejeksiyonunu önlemek için doğal immun yanıtın regülasyonu önemlidir ve doğal immun yanıtındaki anormallikler, spontan abortus, tekrarlayan gebelik kaybı, preeklampsi, intrauterin gelişme geriliği gibi birçok gebelik komplikasyonu ile ilişkili bulunmuştur.

PTX3, implantasyon bölgesinde ekspresyonu artmış halde bulunan nadir genlerden biridir (137, 138). Farelerde yapılan bir çalışmada, implantasyon dışındaki bölgelerle karşılaştırıldığında, implantasyon bölgelerinde daha çok eksprese edildiği saptanmıştır (139). PTX3 özellikle, trofoblastlar, doğal öldürücü ve antijen sunan hücrelerin oluşturduğu inflamatuvar duruma yanıt olarak desidualize stromal hücrelerden eksprese edilir (131,137,138). Popovici ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, PTX3 ekspresyonunun insan stromal hücrelerde, progesteronla ve trofoblast içeren ortamda upregüle edildiği gösterilmiştir. Bu upregülasyon sayesinde PTX3 embriyoyu, maternal immunolojik yanıtın veya diğer zararlı uyarılardan korumaktadır (129, 137). *PTX3-/-* farelerde gözlenen hatalı

desidualizasyon ve implantasyon, PTX3'ün blastokist invazyonu için endometrial diferansiyasyon ve implantasyon aşamasında önemli bir rol oynadığı, maternal immunolojik veya diğer kandan gelen zararlı uyarılara karşı embriyoyu koruduğu, FGF2 üzerine etkisi sayesinde FGF2 bağımlı anjiogenezi regüle ettiği düşünülmüştür (133).

PTX3 ile ilgili farklı bir noktada gebelikteki kan düzeyleridir. Yapılan çalışmalarda gebelikte kan PTX3 düzeyleri, gebe olmayan kadınlara göre yüksek bulunmuştur (140). Larsson ve ark. (141) yaptığı çalışmada; normal gebelik sürecinde PTX3 seviyeleri, gebeliğin 7. haftasından doğum anına kadar belirli aralıklarla serumdan ölçüldüğünde, doğum anı ve doğumdan 14 gün öncesi zaman aralığında en yüksek düzeyde saptanmıştır [936-10719pg/ml]. Doğum sonrası dönemde ise vücuttan plasentanın ayrılması nedeniyle kan seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir. Cetin ve ark.'nin (142) yaptığı çalışmada ise; gebelikte PTX3 düzeyleri, gebe olmayan kadınlara göre (0.6-1.4 ng/ml) anlamlı düzeyde yüksek saptanmış, ancak bu olguların 1., 2. ve 3. trimesterdeki maternal plazma PTX3 düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (sırasıyla 1.4-4.6, 1.4-2.2 ve 1.2-3.8 ng/mL) .

Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, sağlıklı gebelik süreci geçirmiş herhangi bir patolojik tıbbi öyküsü olmayan term plasentalar, sadece gebeliğe bağlı yüksek PTX3 ekspresyon düzeyi beklenmesi nedeniyle kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Normal gebelikte PTX3 düzeylerinin yükseldiği gösterilmekle birlikte, preeklampsi ve tekrarlayan gebelik kaybında PTX3 kan düzeylerinin, normal gebeliklerde saptanan yüksekliğe göre daha fazla artmış olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Çetin ve ark. (142) yaptığı çalışmada 20 gebe olmayan, 1. trimesterdeki 8, 2. trimesterdeki 10, 3. trimesterdeki 26, preeklampsili 20, İUGG'li fetusa sahip olan 16 kadından periferik kan alınarak elisa testi ile PTX3 düzeylerine bakılmış, preeklampsili olgulardaki PTX3'ün plazma düzeyleri, sağlıklı gebelere göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır. İUGG olgularda ise, sağlıklı gebelere göre PTX3 düzeylerinde yükseklik görülürken bu yükseklik, anlamlı düzeyde bulunmamıştır. Normal, preeklampsi ve İUGG olan plasentalarda PTX3 varlığı, immunhistokimyasal olarak incelendiğinde, üç grupta anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Tüm bu elde edilen bilgiler doğrultusunda preeklampside görülen

PTX3 yüksekliği, plasentanın maternal yüzünde gözlenen plasental debrislere karşı artmış inflamatuvar duruma bağlanmıştır. Bir çok çalışmada ise, PTX3 artış miktarının, preeklampsi şiddetiyle korele olduğu saptanmıştır (143,144). Cozzi ve ark.'nın (143) yaptığı plasental ekspresyon çalışmasında, hastalık şiddetiyle PTX3 artışındaki korelasyon yanında; IUGG olan gebelerin PTX3 plasental ekspresyon ve plazma düzeyleri, normal gebelere göre anlamlı yüksek saptanırken, preeklampitik gebelerde ise hem IUGG olan hem de normal gebelere göre PTX3 plasental ekspresyon ve maternal plazma düzeyleri anlamlı yüksek bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada, gebelerin umbilikal venöz PTX3 düzeyleri karşılaştırılmış, normal ve preeklampitik olanlarda anlamlı fark bulunmazken, IUGG olanlarda istatistiksel anlamlı PTX3 yüksekliği saptanmıştır. Bu durum ise plasental yetmezliğin fetal kısmının göstergesi olan IUGG ile PTX3 ilişkisini göstermiştir. Başka çalışmalarda ise normal gebelere göre preeklampitik gebelerde kan PTX3 düzeyinde yaklaşık 6 kat artış saptanmıştır (144, 145). Cetin ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise, 11-14. gestasyon haftalarında hastalardan kan alınarak daha sonra preeklampsi gelişenler, IUGG gelişenler ve gelişmeyenlerin PTX3 düzeyleri karşılaştırıldığında, preeklampsi gelişenlerde gelişmeyenlere göre PTX3 düzeylerinin anlamlı yüksek bulunurken, IUGG gelişen grupta görülen yükseklik anlamlı bulunmamıştır (146). Ayrıca gestasyonun 11-13 haftalarında, serumda yüksek düzey PTX3 saptananlarda, erken dönem preeklampsi gelişmesi nedeniyle, maternal risk faktörleri ve uterin arter doppler ultrasonun yanında, PTX3 yüksekliğinin saptanması plasental disfonksiyonu değerlendirmek için önemli ve erken bir belirteç olabileceği düşünölmüştür (147, 148, 149).

Tip 1 Diabetes Mellituslu gebeler ile sağlıklı gebelerdeki PTX3 düzeylerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise PTX3 düzeyleri, Tip 1 Diabetes Mellituslu gebelerde anlamlı düzeyde yükseklik saptanırken, aynı zamanda nefropatisi önceden var olanlarda daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca belirgin düzeyde yüksek saptanmış olan grupta, sonradan preeklampsi gelişmesi nedeniyle preeklampsinin erken tanısında önemli bir belirteç olabileceği düşünölmüştür (150).

Assi ve ark.'nın yaptığı (151) farklı bir çalışmada ise plazma ve vajinal PTX3 düzeyleri değerlendirildiğinde, spontan preterm doğum, uteroplental damar anormallikleri, fibrinoid nekroz, abrupsiyon, villus infartüsü veya fibrinozis ve hipovaskölarite varlığı gibi plasental vaskölopati durumlarında da artmış olarak saptanmıştır.

Bu konu ile ilgili literatürde yayınlamış çalışmalarda elde edilen veriler PTX3 preeklampsi ilişkisini açıklamaya yönelik toparlandığında; gebeliğin önemli bir komplikasyonu olan preeklampside, maternal-fetal immun toleransın parsiyel bozulmasıyla, yetersiz trofoblast invazyonu oluşmakta (152) ve buna bağlı yetersiz plasentasyon görülmektedir (145,146). Plasentanın perfüzyonunun bozulmasıyla hipoksi ilişkili trofoblast ölümü ve inflamatuvar faktörlerin salınımı gerçekleşmektedir. Bu inflamatuvar durum, endotelial disfonksiyona neden olmakta ve hastalığın klinik bulguları ortaya çıkmaktadır (143, 155). PTX3'ün, ölen veya apoptotik hücrelere bağlanarak immun yanıtı baskılama görevi nedeniyle, preeklampsili hastalarda görülen PTX3 düzeylerindeki artış, hasarlı plasentaya karşı artmış immunolojik bir yanıtın göstergesi olduğu düşünülmektedir (155).

Literatürde yer alan, tekrarlayan gebelik kaybı, PTX3 ilişkisinin araştırıldığı tek çalışma Ibrahim ve ark çalışmasıdır. Bu çalışmada abortus nedeniyle gebelik terminasyonu için başvuran, primer tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalar ile aynı gebelik haftasındaki en az bir sağlıklı canlı doğumu olan gebelerde kan PTX3 değerleri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma neticesinde, iki grup arasında yaş ve diğer demografik bilgiler açısından istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır. Bununla birlikte, çalışmada plazma PTX3 düzeyleri, tekrarlayan kaybı olan olgularda anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır. Hasta grubunda PTX3 düzeyleri ile daha önceki gebelik kaybı sayısı ile pozitif korelasyon saptanırken kontrol grubunda herhangi bir korelasyon saptanmamıştır.

Çalışmamızda ise literatürde ilk kez, nedeni açıklanamamış tekrarlayan gebelik kaybı olan olgularda plasenta ve endometrium küretaj materyalinde yani doku düzeyinde PTX3 çalışılarak, normal gebelikte en yüksek düzeyde olduğu düşünülen term plasenta ile karşılaştırılmıştır. Hasta grubundaki PTX3 ekspresyonu kontrol grubuna göre 116 kat fazla gözlenmiştir ($p=0.0001$). Bu durum, immunhistokimyasal olarak da gösterilmiştir ($p=0.0001$). PTX3 ekspresyon artışı ile yaş, önceki düşük sayısı, mevcut düşüğün haftası ve önceki canlı doğum sayısı arasında istatistiksel anlamlı herhangi bir korelasyon bulunmamıştır.

Nedeni açıklanamamış tekrarlayan gebelik kaybı olgularında PTX3 ekspresyon artışının saptanması ya anormal immunolojik sürecin dolaylı bir göstergesi ya da PTX3 'ün gebelik kaybına direkt kendisinin etkisi nedeniyle olduğu düşünülebilir.

Normal gebelikte apoptoz implantasyon bölgesindeki trofoblastlarda, plasentanın uygun şekilde büyümesi ve fonksiyonu için düşük düzeyde mevcuttur (157, 158). Apoptotik sinsityal nükleer agregatlar ve trofoblast debrisleri, sistemik maternal sirkülasyona sürekli olarak dökülmekte ve uterin NK hücreler, monosit ve makrofajlar bunları temizlemekte, böylece desidua, trofoblast invazyonunu arttırabilmek için yeniden yapılandırılmaktadır (159). Bu nedenle, desidua ve plasental villuslarda hücre proliferasyonu ve apoptoz denge halindedir. Fagositler tarafından apoptotik hücre ve materyallerin hızlı ve etkili temizlenmesi gereklidir. Aksi halde nekrozla komplike olarak, ölen hücrelerden proinflamatuvar içeriğin salınımı ve bunu izleyen hücre bütünlüğünün kaybı, inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu, endotelin aktivasyonu ve doku hasarı gerçekleşir (160). Bu süreçte herhangi bir bozukluk, patolojik gebeliklere ve spontan abortuslara neden olmaktadır (161). Son yıllarda, spontan abortus ve açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı ile hücre apoptozisi arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma sayısı artmaktadır (162, 163).

Çalışmamızda saptadığımız nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıplı ve daha önce canlı doğumu olmayanlardaki PTX3 ekspresyonunun (0,000153 (0,00000 - 0,00334)), canlı doğumu olan tekralayan gebelik kaybı olan olgulara göre (0,000004 (0,00000 - 0,0418)) anlamlı düzeyde yüksek olması, yine apoptoz ile ilişkilendirilmiştir. Canlı doğumu olmayan olgularda meydana gelen artmış apoptotik sürecin dolaylı göstergesi olarak PTX3 ekspresyonunun artmış olduğu düşünülmektedir.

PTX3 ise, apoptotik hücrelere bağlanıp bu hücrelerin dendritik hücreler tarafından tanınmalarını ve fagositler tarafından temizlenmelerini inhibe ederek (122,164), C1q'nun apoptotik hücrelere bağlanmasını engelleyerek (165), apoptotik antijenlerin CD8 + T hücrelerine sunumunu inhibe edip sitotoksik yanıtı azaltarak (123), apoptotik hücrelerde C4BP proteinine bağlanıp litik C5b-9 birikimini azaltarak (166), alternatif yolağın regülatörü olan faktör H'nin apoptotik hücrelerin yüzeyine toplanmasını sağlayarak (167) apoptotik süreçte modülasyon görevi üstlenir. Bu nedenle spontan abortus veya tekrarlayan gebelik kaybı sürecinde PTX3 artışı, apoptoz ve anormal inflamatuvar duruma karşılık doğal immun yanıtın bir parçası olarak yükseliyor olabilir.

PTX3 - apoptoz ilişkisi, farklı birçok hastalıkta gösterilmiştir. PTX3 düzeylerinde artış, romatoid artrit, küçük damar vaskülitleri gibi birçok otoimmün hastalıkta gözlenmiştir (168). Bu hastaların deri biyopsilerinden yapılan

immunhistokimyasal çalışmalarda, endotel hücrelerinin PTX3 üretiminden sorumlu olduğu ve lökositoklastik vaskülit bölgelerinde PTX3 ekspresyonunun yüksek olduğu görülmüştür ve PTX3'ün, makrofajlar tarafından apoptotik polimorfonükleer lökositlerin alınımını inhibe ettikleri (169) ve küçük damar vaskülitinde gözlenen apoptotik ve sekonder nekrotik PNL'nin yetersiz temizlenmesinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (170).

Ayrıca çalışmamızda saptadığımız tekrarlayan gebelik kaybı olgularında PTX3 ekspresyon artışının abortus sürecinde yer aldığı düşünülebilir. PTX3'ün apoptotik hücreler üzerindeki immunmodulator etkisi yanında, FGF2 üzerine etkileri de mevcuttur. FGF2'ün; yara iyileşmesi, inflamasyon, tümör büyümesi ve aterosklerozis sırasında hücre proliferasyonu, kemotaksisi ve proteaz üretimini arttıran önemli bir anjiogenik indükleyici olduğu saptanmıştır (171). Farelerde yapılmış çalışmalarda, hCG artışı ile gebelik endometriumunda diğer sitokin ve büyüme faktörleri gibi FGF2 ekspresyonu artmakta ve bunun implantasyon sırasında blastokist yapışmasını arttırmak için endometriyal reseptivite sağladığı düşünülmektedir (172). PTX3 ise, FGF2'ye yüksek afinite ve spesifite ile bağlanıp, FGF2 bağlı endotelial hücre proliferasyonunu ve neovaskülarizasyonu inhibe ederek antianjiogenik bir faktör gibi davranmaktadır. Shirai ve ark.'ın (173) yaptığı çalışmada sistemik sklerozlu hastalarda PTX3 artışı, sağlıklı gruba göre yüksek bulunurken, hastalığın komplikasyonu olan pulmoner arteriyel hipertansiyon meydana gelenlerde ise FGF2 düzeyleri ve endotelial öncü hücre sayımı ise anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır. Buna göre yüksek PTX3 konsantrasyonlarının, pulmoner arteriyel hipertansiyon gibi vasküler problemlerin ortaya çıkma olasılığını arttırabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca başka bir çalışmada ise, PTX3'ün FGF2 ilişkili antianjiogenik etkisi nedeniyle tümör büyümesi ve tümör anjiogenezini inhibe edeceği ve buna bağlı olarak anti-VEGF kullanıp direnç gelişen kanserli hastalarda kullanılabileceği düşünülmektedir (174). Çalışmamızda saptadığımız tekrarlayan gebelik kaybı olan olgularda PTX3'ün aşırı ekspresyonu, bu olası mekanizmalarla vaskülariteyi ya da implantasyonu bozarak düşük sürecinde yer alıyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu farklı mekanizmalarla yer aldığı düşünülen tekrarlayan gebelik kaybı olan olgularda PTX3 ekspresyon artışının, abortusun neden olduğu inflamatuvar duruma mı, abortusa neden olan inflamatuvar patolojiye mi bağlı olduğu yada abortus sürecinde yer alıp almadığının saptanması için konu ile ilgili farklı çalışmalara ihtiyaç duyulsa da, PTX3 bir çok hastalıkta kanıtlanmış çok iyi bir akut faz reaktanı olması

ve tekrarlayan gebelik kaybı sürecinde plasental ekspresyonunun belirgin yüksek olması nedeniyle bu sürecin erken tanısında kullanılmasında ve klinik sürecin takibinde fayda sağlayacaktır.

SONUÇLAR

Tekrarlayan gebelik kaybı olan vakalarda pentraksin 3 ekspresyon profilinin belirlenmesi amacıyla yapılan tez çalışmamız sonuçlarına göre;

- Nedeni açıklanamamış tekrarlayan gebelik kaybı olan olgularda plasenta ve endometrium küretaj materyalindeki PTX3 ekspresyonu ile maternal yaş, önceki düşük sayısı, mevcut düşüğün haftası, önceki canlı doğum sayısı, immunohistokimyasal analiz sonuçları, immunohistokimyasal analizde ekstravillöz trofoblast, desidua, endotel, villöz stroma bölgeleri açısından hücrel boyanma dağılımı arasında istatistiksel anlamlı herhangi bir korelasyon saptanamamış olup; normal gebelikte en yüksek düzeyde olduğu düşünülen term plasenta ile karşılaştırılmış ve ekspresyon düzeyinin anlamlı şekilde 116 kat fazla olduğu gözlenmiştir.
- Bir çok hastalıkta kanıtlanmış çok iyi bir akut faz reaktanı olan PTX3, nedeni açıklanamamış tekrarlayan gebelik kaybı olan olgularda da plasental ekspresyonunun belirgin yüksek bulunması nedeniyle, gebelik kaybı sürecinin erken tanısında ve klinik sürecin takibinde önemli bir belirteç olabileceği düşünülmektedir.
- PTX3 plasental ekspresyon artışının gösterilmesiyle PTX3-apoptozis yakın ilişkisine bağlı olarak tekrarlayan gebelik kaybı patogenezinde apoptozisin önemi artmış ve mekanizmayı açıklamaya yönelik daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır.
- Özellikle, PTX3 ekspresyon artışının abortus sürecinde yer alıp almadığının aydınlatılması için PTX3'ün ligandları üzerinedaha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Regan L, Rai R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2000;14(5):839.
2. Speroff L, Glass RH, Kase NG. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility.* 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011;1191-1211.
3. Gibbs RS, Karlan BY, Haney AF, Nygaard IE. *Danforth's obstetrics and gynecology,* 10th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia: 2008: 705–715.
4. Abramson J, Stagnaro-Green A. Thyroid antibodies and fetal loss: an evolving story. *Thyroid.* 2001;11(1):57.
5. Laufer MR, Ecker JL, Hill JA. Pregnancy outcome following ultrasound-detected fetal cardiac activity in women with a history of multiple spontaneous abortions. *J Soc Gynecol Investig.* 1994;1(2):138.
6. Robertson SA. Immune regulation of conception and embryo implantation-all about quality control? *J Reprod Immunol.* 2010;85(1):51.
7. Tamblyn JA, Lissauer DM, Powell R, Cox P, Kilby MD. The immunological basis of villitis of unknown etiology. *Placenta.* 2013 Oct;34(10):846-55.
8. Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G. Inflammation and implantation. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(1):17.
9. Locati M, Mantovani A, Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol.* 2013;120:163-84
10. Inforzato A, Doni A, Barajon I, Leone R, Garlanda C, Bottazzi B, Mantovani A. PTX3 as a paradigm for the interaction of pentraxins with the complement system. *Semin Immunol.* 2013 Feb;25(1):79-85.
11. World Health Organization. Recommended definitions; terminology and format for statistical tables related to the perinatal period. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1977;56:247–53.
12. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2008;89(6):1603.

13. Ansari AH, Kirkpatrick B. Recurrent pregnancy loss. An update. *J Reprod Med.* 1998;43(9):806.
14. Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J. Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. *Fertil Steril.* 2003;79(3):577.
15. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med.* 1988;319(4):189.
16. Wyatt PR, Owolabi T, Meier C, Huang T. Age-specific risk of fetal loss observed in a second trimester serum screening population. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192(1):240.
17. Salat-Baroux J. Recurrent spontaneous abortions. *Reprod Nutr Dev.* 1988;28(6B):1555.
18. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ.* 2000 Jun 24;320(7251):1708-12.
19. Hatasaka HH. Recurrent miscarriage: epidemiologic factors, definitions, and incidence. *Clin Obstet Gynecol.* 1994;37(39):625.
20. Raghupathy J, Al-Mutawa E, Al-Azemi M, Makhseed M, Azizieh H, Szekeres-Bartho J. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm birth. *J Reprod Immunol* 2009;80:91–9.
21. Christiansen OB, Pedersen B, Rosgaard A, Husth M. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intravenous immunoglobulin in the prevention of recurrent miscarriage: Evidence for a therapeutic effect in women with secondary recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2002;17:809–16.
22. Cauchi MN, Coulam CB, Cowchock S, Ho HN, Gatenby P, Johnson PM et al. Predictive factors in recurrent spontaneous abortion—A multicenter study. *Am J Reprod Immunol* 1995;33:165–70.
23. Clifford K, Rai R, Regan L. Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod.* 1997;12(2):387.

24. Nielsen HS, Witvliet MD, Steffensen R et al. The presence of HLA-antibodies in recurrent miscarriage patients is associated with a reduced chance of live birth. *J Reprod Immunol* 2010;87:67–73.
25. Goldenberg RL, Mayberry SK, Copper RL, Dubard MB, Hauth JC. Pregnancy outcome following a second-trimester loss. *Obstet Gynecol* 1993;81:444–6.
26. Heuser C, Dalton J, Macpherson C, Branch DW, Porter TF, Silver RM. Idiopathic recurrent pregnancy loss recurs at similar gestational ages. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203(4):343.
27. Armstrong BG, McDonald AD, Sloan M. Cigarette, alcohol and coffee consumption and spontaneous abortion. *Am J Public Health* 1992;49:82.
28. Bech BH, Nohr EA, Vaeth M, Henriksen TB, Olsen J. Coffee and fetal death: a cohort study with prospective data. *Am J Epidemiol.* 2005;162:983–990.
29. Andersen AM, Andersen PK, Olsen J, Gronbaek M, Strandberg-Larsen K. Moderate alcohol intake during pregnancy and risk of fetal death. *Int J Epidemiol.* 2012;41:405–413.
30. Wisborg K, Kesmodel U, Henriksen TB, Hedegaard M, Secher NJ. A prospective study of maternal smoking and spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82:936–941.
31. Metwally M, Ong KJ, Ledger WL, Li TC. Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence. *Fertil Steril.* 2008;90:714–726.
32. Kolte AM, Nielsen HS, Moltke I, Degn B, Pedersen B, Sunde L et al. A genome-wide scan in affected sibling pairs with idiopathic recurrent miscarriage suggests genetic linkage. *Mol Hum Reprod* 2011;17:279–85.
33. Kwak-Kim J, Yang KM, Gilman-Sachs A. Recurrent pregnancy loss: a disease of inflammation and coagulation. *J. Obstet Gynaecol Res.* 2009 Aug; 35(4):609-622.
34. Hsu LYF. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis. *Genetic disorders and the fetus*, 4th ed, Milunsky A (Ed), The Johns Hopkins University Press, Baltimore 1998; 179.
35. Philipp T, Philipp K, Reiner A, Beer F, Kalousek DK Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Hum Reprod* 2003;18:1724.

36. Levy B, Sigurjonsson S, Pettersen B, Maisenbacher MK, Hall MP, Demko Z, Lathi RB. Genomic imbalance in products of conception: single-nucleotide polymorphism chromosomal microarray analysis. *M Obstet Gynecol.* 2014 Aug;124:202-9.
37. Klein J, Stein Z. Epidemiology of chromosomal anomalies in spontaneous abortion: prevalence, manifestation and determinants. In: Spontaneous and recurrent abortion, Bennett MJ, Edmonds DK (Eds), Blackwell Scientific Publications, Oxford 1987; 29.
38. Cunningham FG., Leveno KJ. Williams Obstetrics. McGraw-Hill. 22nd Edition. 2005; 232-236.
39. Gueneri S., Bettio D., Simoni G., Brambat B. Prevalence and Distribution of chromosome abnormalities in a sample of first trimester internal abortions. *Hum Reprod*1987;2: 735.
40. Ogasawara M., Aoki K., Okada S. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril* 2000;73:300
41. Carp H.J.A. Recurrent Pregnancy Loss: Causes, Controversies, and Treatment. Second Edition. Series in maternal-fetal medicine. 2015:31
42. Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet* 2003; 112: 195.
43. Bianco K, Caughey AB, Shaffer BL, Davis R, Norton ME. History of miscarriage and increased incidence of fetal aneuploidy in subsequent pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2006;107(5):1098.
44. Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, RemohíJ. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod.* 2003;18(1):182.
45. Vidal F, Giménez C, Rubio C, Simón C, Pellicer A, SantalóJ. FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet.* 1998;15(5):310.
46. Hassold TJ. A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions. *Am J Hum Genet.* 1980;32(5):723.

47. Reindollar RH. Contemporary issues for spontaneous abortion. Does recurrent abortion exist? *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2000;27(3):541.
48. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod* 1990;5(5):519–28.
49. Franssen MT, Korevaar JC, Leschot NJ, Bossuyt PM, Knecht AC, Gerssen-Schoorl KB et al. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ.* 2005;331(7509):137.
50. Goddijn M, Joosten JH, Knecht AC, van derVeen F, Franssen MT, Bonsel GJ. Clinical relevance of diagnosing structural chromosome abnormalities in couples with repeated miscarriage, *Hum Reprod.* 2004;19(4):1013
51. Bombell S, McGuire W. Aust N Z. Cytokine polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss: meta-analysis. *J Obstet Gynaecol.* 2008;48(2):147
52. Hogge WA, Prosen TL, Lanasa MC, Huber HA, Reeves MF. Recurrent spontaneous abortion and skewed X-inactivation: is there an association? *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(4):384
53. Hill JA. Recurrent pregnancy loss. In: *Kistner's Gynecology and Women's Health*, 7th ed, 1999;396
54. Acién P, Acién M, Sánchez-Ferrer M. Complex malformations of the female genital tract. New types and revision of classification. *Hum Reprod.* 2004;19(10):2377.
55. Devi Wold AS, Pham N, Arici A. Anatomic factors in recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 2006;24(1):25.
56. Heinonen PK, Saarikoski S, Pystynen P. Reproductive performance of women with uterine anomalies. An evaluation of 182 cases. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1982;61(2):157.
57. Fedele L, Bianchi S, Tozzi L et al. Fertility in women with unicornuate uterus. *Br J Obstet Gynaecol* 1995;102:1007–9.
58. Heinonen P. Clinical implications of the didelphic uterus: Long-term follow-up of 49 cases. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;91:183–90.
59. Deans R, Abbott J. Review of intrauterine adhesions. *J Minim Invasive Gynecol.* 2010 Sep;17(5):555-69.

60. Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril*. 2011;96(3):522.
61. Daya S, Ward S, Burrows E. Progesterone profiles in luteal phase defect cycles and outcome of progesterone treatment in patients with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol*. 1988;158(2):225.
62. Greene MF, Hare JW, Cloherty JP, Benacerraf BR, Soeldner JS. First-trimester hemoglobin A1 and risk for major malformation and spontaneous abortion in diabetic pregnancy. *Teratology*. 1989;39(3):225.
63. Mills JL, Simpson JL, Driscoll SG, Jovanovic-Peterson L, Van Allen M Mills JL, et al. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N Engl J Med*. 1988;319(25):1617.
64. Trout SW, Seifer DB. Do women with unexplained recurrent pregnancy loss have higher day 3 serum FSH and estradiol values? *Fertil Steril*. 2000;74(2):335
65. Glueck CJ, Wang P, Goldenberg N, Sieve-Smith L. Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin. *Hum Reprod*. 2002;17(11):2858
66. Bonney RC, Franks S. The endocrinology of implantation and early pregnancy. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1990;4(2):207
67. Bellver J, Soares SR, Alvarez C, Muñoz E, Ramírez A, Rubio C, et al. The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod*. 2008;23(2):278
68. Abalovich M. Overt and subclinical hypothyroidism complicating pregnancy. *Thyroid*. 2002;12(1):63-8
69. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet*. 2003;361(9361):901
70. Rai V. Methylenetetrahydrofolate reductase gene A1298C polymorphism and susceptibility to recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Cell Mol Biol*. 2014 Jun 27;60(2):27-34.
71. CaoY, Zhang Z, ZhengY, Yuan W, Wang J. The association of idiopathic recurrent early pregnancy loss with polymorphisms in folic acid metabolism-related genes. *Genes Nutr*. 2014 May;9(3):402

72. Sotiriadis A, Makrigiannakis A, Stefos T, Paraskevaïdis E, Kalantaridou SN. Fibrinolytic defects and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2007;109(5):1146.
73. Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1992;80(2):283
74. Watson AL, Skepper JN, Jauniaux E, Burton GJ. Susceptibility of human placental syncytiotrophoblastic mitochondria to oxygen-mediated damage in relation to gestational age. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(5):1697.
75. Nigro G, Mazzocco M, Mattia M. Role of the infections in recurrent spontaneous abortion. *J Matern Fetal Neonatal Med.* August 2011;24(8):983–989.
76. Simpson JL. Causes of fetal wastage. *Clin Obstet Gynecol.* 2007;50(1):10.
77. Kallen CB, Arici A. Immune testing in fertility practice: truth or deception? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2003;15(3):225.
78. Reindollar RH. Contemporary issues for spontaneous abortion. Does recurrent abortion exist? *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2000;27(3):541.
79. Tinçani A, Cavazzana I, Ziglioli T, Lojacoño A, De Angelis V, Meroni P. Complement activation and pregnancy failure. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010;39(3):153.
80. Girardi G, Berman J, Redecha P, Spruce L, Thurman JM, Kraus D. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest.* 2003;112(11):1644
81. Carroll TY, Mulla MJ, Han CS, Brosens JJ, Chamley LW, Giles I, Pericleous C. Modulation of trophoblast angiogenic factor secretion by antiphospholipid antibodies is not reversed by heparin. *Am J Reprod Immunol.* 2011 Oct;66(4):286-96
82. Petri M, Allbritton J. Fetal outcome of lupus pregnancy: a retrospective case-control study of the Hopkins Lupus Cohort. *J Rheumatol.* 1993;20(4):650.
83. Clowse ME, Magder LS, Witter F, Petri M. Early risk factors for pregnancy loss in lupus. *Obstet Gynecol.* 2006;107(2 Pt 1):293
84. Qureshi F, Yang Y, Jaques SM, Johnson MP, Naparstek Y, Ulmansky R, Schuger L. Anti-DNA antibodies cross-reacting with laminin inhibit trophoblast

- attachment and migration: implications for recurrent pregnancy loss in SLE patients. *Am J Reprod Immunol.* 2000;44(3):136.
85. Robertson SA. Immune regulation of conception and embryo implantation-all about quality control? *J Reprod Immunol.* 2010;85(1):51.
86. Robertson SA, O'Leary S, Armstrong DT. Influence of semen on inflammatory modulators of embryo implantation. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2006;62:231.
87. Leber A, Teles A, Zenclussen AC. Regulatory T cells and their role in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(6):445.
88. Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G. Inflammation and implantation. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(1):17.
89. Bulmer JN, Pace D, Ritson A. Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. *Reprod Nutr Dev.* 1988;28(6B):1599
90. De Carolis C, Perricone C, Perricone R. NK cells, autoantibodies, and immunologic infertility: a complex interplay. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010;39(3):166.
91. Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update.* 2009;15(5):517.
92. Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol.* 2007;149(1):139.
93. Mincheva-Nilsson L. Pregnancy and gamma/delta T cells: taking on the hard questions. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:120.
94. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2010 Jun;63(6):601-10.
95. Renaud SJ, Graham CH. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. *Immunol Invest.* 2008;37(5):535-64.

96. Plaks V, Birnberg T, Berkutzki T, Sela S, BenYashar A, Kalchenko V. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(12):3954.
97. Huang SJ, Chen CP, Schatz F, Rahman M, Abrahams VM. Pre-eclampsia is associated with dendritic cell recruitment into the uterine decidua. *J Pathol*. 2008;214(3):328.
98. Shakhawat A, Shaikly V, Elzatma E, Mavrakos E, Jabeen A. Interaction between HLA-G and monocyte/macrophages in human pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2010;85(1):40.
99. Interaction between HLA-G and monocyte/macrophages in human pregnancy...*J Reprod Immunol*. 2010;85(1):40.
100. Ponte M, Cantoni C, Biassoni R, Tradori-Cappai A, Bentivoglio G. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999; 5674–5679.
101. Shakhawat A, Shaikly V, Elzatma E, Mavrakos E, Jabeen A, Fernández N Progesterone in pregnancy; receptor-ligand interaction and signaling pathways. *J Reprod Immunol*. 2009;83(1-2):60.
102. Wei SQ, Fraser W, Luo ZC. Inflammatory cytokines and spontaneous preterm birth in asymptomatic women: a systematic review. *Obstet Gynecol*. 2010;116:393.
103. Mincheva-Nilsson L, Baranov V. The role of placental exosomes in reproduction. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):52.
104. Holmes CH, Simpson KL, Okada H, Okada N, Wainwright SD, Purcell DF, Houlihan JM. Complement regulatory proteins at the feto-maternal interface during human placental development: distribution of CD59 by comparison with membrane cofactor protein (CD46) and decay accelerating factor (CD55). *Eur J Immunol*. 1992;22(6):1579.
105. Xu C, Mao D, Holers VM, Palanca B, Cheng AM, Molina H. A critical role for murine complement regulator *crry* in fetomaternal tolerance. *Science*. 2000;287(5452):498.

106. Stephenson MD, Fluker MR. Treatment of repeated unexplained in vitro fertilization failure with intravenous immunoglobulin: a randomized, placebo-controlled Canadian trial. *Fertil Steril.* 2000;74(6):1108.
107. Inforzato A, Bottazzi B, Garlanda C, Valentino S, Mantovani A. Pentraxins in humoral innate immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2012;946:1-20.
108. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annual Review of Immunology* 2010;28:157–83.
109. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annual Review of Immunology* 2005;23:337–66.
110. Mantovani A, Valentino S, Gentile S, Inforzato A, Bottazzi B. The long pentraxin PTX3: a paradigm for humoral pattern recognition molecules. *AnnNY Acad Sci.* 2013 May;1285:1-14.
111. Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B, Peri G. The long pentraxin PTX3 in vascular pathology. *Vascul Pharmacol.* 2006 Nov;45(5):326-30.
112. Sironi M, Conti A, Bernasconi S, Fra A.M, Pasqualini F, Nebuloni M. Generation and characterization of a mouse lymphatic endothelial cell line. *Cell Tissue Res.* 2006; 325, 91-100.
113. Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Fremaux I, Doni A, Moalli F. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med.* 2007;204, 793-804.
114. Doni A, Michela M, Bottazzi B, Peri G, Valentino S, Polentarutti N. Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. *J Leukoc Biol.* 2006;79,797-802.
115. Maina V, Cotena A, Doni A, Nebuloni M, Pasqualini F, Milner C.M. Coregulation in human leukocytes of the long pentraxin PTX3 and TSG-6. *J Leukoc Biol.* 2009;86, 123-132.
116. Doni A, Mantovani G, Porta C, Tuckermann J, Reichardt HM, Kleiman A, et al. Cell-specific regulation of PTX3 by glucocorticoid hormones in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Journal of Biological Chemistry* 2008;283:29983–92.

117. Deban L, Jarva H, Lehtinen M.J, Bottazzi B, Bastone A. Binding of the long pentraxin PTX3 to Factor H: Interacting domains and function in the regulation of complement activation. *J. Immunology*. 2008; 181, 8433-8440.
118. Nauta A.J., Bottazzi B., Mantovani A., Salvatori G., Kishore U. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur J Immunol*. 2003;33, 465-473.
119. Ma Y.J., Doni A., Skjoedt M.O., Honore C., Arendrup M., Mantovani A. Heterocomplexes of mannose-binding lectin and the pentraxins PTX3 or SAP trigger crossactivation of the complement system. *J Biol Chem*. 2010;23, 223
120. Braunschweig, A. Jozsi. Human pentraxin 3 binds to the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS One*. 2011;6:e23991
121. Deban L., Castro Russo R., Sironi M., Moalli F., Scanziani M., Zambelli V. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat. Immunol*. 2010;11,328-334.
122. Van Rossum A.P, Fazzini F, Limburg P.C, Manfredi A.A, Rovere-Querini P. The prototypic tissue pentraxin PTX3, in contrast to the short pentraxin serum amyloid P, inhibits phagocytosis of late apoptotic neutrophils by macrophages. *Arthritis Rheum*. 2004; 50, 2667-2674.
123. Baruah P, Propato A, Dumitriu I.E, Rovere-Querini P, Russo V. The pattern recognition receptor PTX3 is recruited at the synapse between dying and dendritic cells, and edits the cross-presentation of self, viral, and tumor antigens. *Blood*. 2006; 107, 151-158.
124. Jaillon S., Jeannin P., Hamon Y., Fremaux I., Doni A. Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages. *Cell Death Differ*. 2009;16, 465-474.
125. Varani S, Elvin J.A, Yan C, DeMayo J, DeMayo F.J, Horton H.F. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol Endocrinol*. 2009; 16, 1154-1167.
126. Salustri A. PTX plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in vivo fertilization. *Development*. 2004;131:1577-1586.
127. Presta M, Camozzi M, Salvatori G. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. *J Cell Mol Med*. 2007; 11, 723-738.

128. Garlanda C, Maina V, Cotena A, Moalli F. The soluble pattern recognition receptor pentraxin-3 in innate immunity, inflammation and fertility. *J Reprod Immunol.* 2009 Dec;83(1-2):128-33.
129. Garlanda C, Maina V, Martinez de la Torre Y, Nebuloni M, Locati M. Inflammatory reaction and implantation: the new entries PTX3 and D6. *Placenta.* 2008 Oct;29 Suppl B:129-34.
130. Rovere-Querini P, Antonacci S, Dell'Antonio G, Angeli A, Almirante G, Cin ED. Plasma and tissue expression of the long pentraxin 3 during normal pregnancy and preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2006; 108:148–155
131. Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, et al. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002;143:2119–2138.
132. Popovici RM, Krause MS, Jauckus J, Germeyer A, Brum IS, Garlanda C. The long pentraxin PTX3 in human endometrium: regulation by steroids and trophoblast products. *Endocrinology.* 2008 Mar;149(3):1136-43.
133. Tranguch S, Chakrabarty A, Guo Y, Wang H, Dey SK. Maternal pentraxin 3 deficiency compromises implantation in mice. *Biol Reprod.* 2007;77:425–32.
134. Willeke F, Assad A, Findeisen P, Schromm E, Grobholz R. Overexpression of a member of the pentraxin family (PTX3) in human soft tissue liposarcoma. *Eur J Cancer.* 2006 Oct;42(15):2639-46.
135. Calleja-Agius J, Jauniaux E, Pizzey AR, Muttukrishna S. Investigation of systemic inflammatory response in first trimester pregnancy failure. *Hum Reprod.* 2012 Feb;27(2):349-57
136. Christiansen OB, Kolte AM, Dahl M, Larsen EC, Steffensen R. Maternal homozygosity for a 14 base pair insertion in exon 8 of the HLA-G gene and carriage of HLA class II alleles restricting HY immunity predispose to unexplained secondary recurrent miscarriage and low birth weight in children born to these patients. *Hum Immunol.* 2012 Jul;73(7):699-705.
137. Popovici RM, Betzler NK, Krause MS, Luo M, Jauckus J, Germeyer A. et al. Gene expression profiling of human endometrial–trophoblast interaction in a coculture model. *Endocrinology.* 2006;147:5662–75.

138. Hess AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegaard M, Nayak N, et al. Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol Reprod.* 2007;76:102–17.
139. Reese J, Das SK, Paria BC, Lim H, Song H, Matsumoto H, et al. Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation. *J Biol Chem.* 2001;276:44137–45.
140. Wan, H., C.G. van Helden-Meeuwsen, C. Garlanda, L.M. Leijten, V. Maina, N.A. Khan, H.A. Drexhage, A. Mantovani, R. Benner, and M.A. Versnel. Chorionic gonadotropin up-regulates long pentraxin 3 expression in myeloid cells. *Journal of Leukocyte Biology.* 2008,84: 1346–1352.
141. Larsson A, Palm M, Helmersson J, Axelsson O. Pentraxin 3 Values During Normal Pregnancy. *Inflammation.* 2011; Vol.34, No.5.
142. Cetin I., Cozzi V., Pasqualini F., Nebuloni M., Garlanda C., Vago L., Pardi G., Mantovani A. Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX3) in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 May;194(5):1347-53.
143. Cozzi V., Garlanda C., Nebuloni M., Maina V., Martinelli A. Calabrese S. PTX3 as a potential endothelial dysfunction biomarker for severity of preeclampsia and IUGR. *Placenta* 33. 2012, 1039e1044
144. Zhou P, Luo X, Qi HB, Zong WJ, Zhang H, Liu DD, et al. The expression of pentraxin 3 and tumor necrosis factor-alpha is increased in preeclamptic placental tissue and maternal serum. *Inflamm Res.* 2012;61:1005e12.
145. Rovere-Querini P, Antonacci S, Dell'Antonio G, Angeli A, Almirante G, Cin ED. Plasma and tissue expression of the long pentraxin 3 during normal pregnancy and preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2006;108:148e55.
146. Cetin I, Cozzi V, Papageorghiou AT, Maina V, Montanelli A, Garlanda C, Thilaganathan B. Acta. First trimester PTX3 levels in women who subsequently develop preeclampsia and fetal growth restriction. *Obstetricia et Gynecologica.* 2009; 88: 846849.
147. Akolekar, R., D. Casagrandi, P. Livanos, A. Tetteh, and K.H. Nicolaides. Maternal plasma pentraxin 3 at 11 to 13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. *Prenatal Diagnosis.* 2009. 29: 934–938.

148. Baschat AA., Kasdaglis TL., Aberdeen GW., Turan OM., Kopelman JL., Atlas R., Jenkins C., Blitzer M., Harman CR. Serum pentraxin-3 levels at 11 to 14 weeks' gestation: association with maternal and placental characteristics. *Am J Obstet Gynecol.* 2009 Sep;201(3):298.e1-6
149. Papageorgiou AT., Cetin I., Maina C., Garlanda C., Thilaganathan B. Elevation of pentraxin (PTX3) levels in the first trimester of pregnancy in women with subsequent preeclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;30:460.
150. Castiglioni MT., Scavini M., Cavallin R., Pasi F., Rosa S., Sabbadini MG., Rovere-Querini P. Elevation of plasma levels of the long pentraxin 3 precedes preeclampsia in pregnant patients with type 1 diabetes. *Autoimmunity.* 2009 May;42(4):296-8.
151. Assi F., Fruscio R., Bonardi C., Ghidini A., Allavena P., Mantovani A., Locatelli A. Pentraxin 3 in plasma and vaginal fluid in women with preterm delivery. *BJOG.* 2007 Feb;114(2):143-7.
152. Redman CW., Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2010 Jun;63(6):534-43.
153. Young BC., Levine RJ., Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:173-92.
154. Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *Am J Hypertens.* 1991 Aug;4(8):700-8. Review.
155. Ranjit Akolekar, Davide Casagrandi, Panagiotis Livanos, Amos Tetteh, Kypros H Nicolaides. Maternal plasma pentraxin 3 at 11 to 13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. *Prenat Diagn.* 2009; 29: 934–938.
156. Ibrahim MI, Harb HM, Ellaithy MI, Elkabarity RH, Abdelgwad MH. First trimester assessment of pentraxin-3 levels in women with primary unexplained recurrent pregnancy loss. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012 Nov;165(1):37-41.
157. Abrahams VM., Kim YM., Straszewski SL., Romero R., Mor G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2004;51:275–282..

158. Jerzak M., Bischof P. Apoptosis in the first trimester human placenta: The role in maintaining immune privilege at the maternal-foetal interface and in the trophoblast remodelling. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002;100:138–142.
159. Abumaree MH., Chamleyb LW., Badria M., El-Muzaini MF. Trophoblast debris modulates the expression of immune proteins in macrophages: a key to maternal tolerance of the fetal allograft? *J Reprod Immunol.* 2012;94(2):131e41.
160. Pascale Jeannin, Sébastien Jaillon, Yves Delneste. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr Opin Immunol.* 2008 Oct;20(5):530-7.
161. Mi YY. Study on the pathogenesis of unexplained spontaneous abortion. *China Med Pharm.* 2011;1:24-25.
162. Meresman GF., Olivares C., Vighi S., Alfie M., Irigoyen M., Etchepareborda JJ..Apoptosis is increased and cell proliferation is decreased in out-of-phase endometria from infertile and recurrent abortion patients. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010 Oct 22;8:126.
163. Cinar O, Kara F, Can A. Potential role of decidual apoptosis in the pathogenesis of miscarriages. *Gynecological Endocrinology.* 2012; 28(5): 382–385.
164. Rovere P., Peri G., Fazzini F., Bottazzi B., Doni A., Bondanza A., Zimmermann VS., Garlanda C., Fascio U., Sabbadini MG., Rugarli C., Mantovani A., Manfredi AA. The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood.* 2000 Dec 15;96(13):4300-6.
165. Baruah P., Dumitriu IE., Peri G., Russo V., Mantovani A., Manfredi AA., Rovere-Querini P. The tissue pentraxin PTX3 limits C1qmediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2006, 80:87-95.
166. Braunschweig, A. Jozsi. Human pentraxin 3 binds to the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS One.* 2011; 6:e23991
167. Trouw LA., Okroj M., Kupreishvili K., Landberg G., Johansson B., Niessen HW., Blom AM. C4b-binding protein is present in affected areas of myocardial infarction during the acute inflammatory phase and covers a larger area than C3. *PLoS One.* 2008 Aug 6;3(8):e2886

168. Mantovani A., Garlanda C., Bottazzi B., Peri G., Doni A., Martinez de la Torre Y., Latini R. The long pentraxin PTX3 in vascular pathology. *Vascular Pharmacology*. 2006; 45,326–330
169. Van Rossum AP., Fazzini F., Limburg PC., Manfredi AA., Rovere- Querini P., Mantovani A., Kallenberg CG. The prototypic tissue pentraxin PTX3, in contrast to the short pentraxin serum amyloid P, inhibits phagocytosis of late apoptotic neutrophils by macrophages. *Arthritis Rheum*. 2004;50:2667–74.
170. Fazzini F., Peri G., Doni A., Dell'Antonio G., Dal Cin E., Bozzolo E., D'Auria F., Praderio L., Ciboddo G., Sabbadini MG., Manfredi AA., Mantovani A., Querini PR. PTX3 in small-vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation. *Arthritis Rheum*. 2001. Dec;44(12):2841-50.
171. Presta M., Camozzi M., Salvatori G., Rusnati M. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. *J Cell Mol Med*. 2007. Jul-Aug;11(4):723-38
172. Paiva P., Hannan NJ., Hincks C., Meehan KL., Pruyers E., Dimitriadis E., Salamonsen LA. Human chorionic gonadotrophin regulates FGF2 and other cytokines produced by human endometrial epithelial cells, providing a mechanism for enhancing endometrial receptivity. *Hum Reprod*. 2011. May;26(5):1153-62.
173. Shirai Y., Okazaki Y., Inoue Y., Tamura Y., Yasuoka H., Takeuchi T., Kuwana M. Elevated pentraxin 3 in systemic sclerosis: Associations with vascular manifestations and defective vasculogenesis. *Arthritis Rheumatol*. 2014; Nov 10.
174. Patrizia Alessi, Daria Leali, Maura Camozzi, AnnaRita Cantelmo, Adriana Albini, Marco Presta. Anti-FGF2 approaches as a strategy to compensate resistance to anti-VEGF therapy: long-pentraxin 3 as a novel antiangiogenic FGF2-antagonist.. *Eur. Cytokine Netw*. 2009, Vol. 20 n° 4, 225-34.