



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MAJÖR HİSTOKOMPATİBİLİTE
KOMPLEKSİNİN FETUSUN YAŞAMINDAKİ
ROLÜ**

MEHMET ONUR ELBAŞI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emel EKŞİOĞLU-DEMİRALP

İSTANBUL-2008



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MAJÖR HİSTOKOMPATİBİLİTE
KOMPLEKSİNİN FETUSUN YAŞAMINDAKİ
ROLÜ**

MEHMET ONUR ELBAŞI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emel EKŞİOĞLU-DEMİRALP

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : İa Hastalıkları / İmmünoloji

Tez Sahibi : Mehmet Onur Elbaşı

Tez Başlığı : Majör Histokompatibilite Kompleksinin Fetüs Yaşamındaki Rolü

Sınav Yeri : M.Ü. İa Hastalıkları A.B.D.

Sınav Tarihi : 08.08.2008 / saat: 10:00

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/~~Doktora~~ Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emel Demiralp
Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

M.Ü. Tıp Fak.
Kurumu

İmza

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı,
Soyadı)

Prof. Dr. Emel Demiralp

Prof. Dr. Haner Direskeneli

Prof. Dr. Sule Yavuz

İmza

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 20.08.2008 tarih ve 5. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Sevim ROLLAS

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

MEHMET ONUR ELBAŞI



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince sabır ve hoşgörülerini ile bana destek veren aileme, nişanlım MSc. Esra Akbeniz'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamda emeği geçen Stj. Dr. Hüseyin Bilgin'e, Biyolog Berna Mehtap Demirel'e, Biyolog Rayfe Pehlivan'a Biyolog İmren Aydın-Tatlı'ya teşekkür ederim. Metodun geliştirilmesinde, tezimin her aşamasında ve immünoloji eğitimim boyunca bana yardımcı olan Araştırma Görevlisi Aysin Tulunay'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda büyük katkıları bulunan Sayın Prof.Dr. Semra Kahraman ve Sayın Prof.Dr. Mithat Erenus'a, Dr. Hale Karagözoğlu'na, Dr. Gökçe Anık'a ilgileri için teşekkür ederim.

Beni immünoloji ile tanıştıran, tezimin planlanma, yürütülme ve yazım aşamalarında benden desteğini esirgemeyen; bilimsel ve sosyal alanda bana yol gösteren; bilgisi, deneyimleri ve kişiliği ile her zaman örnek aldığım danışmanım Sayın Prof.Dr. Emel Ekşioğlu-Demiralp'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-YLP-060308-0035 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Teşekkür.....	i
İçindekiler	ii
Kısaltmalar	iv
Tablolar Listesi.....	vi
Şekiller Listesi.....	vii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Majör Doku Uyum Kompleksi (Major Histocompatibility Kompleks-MHK)...	5
4.2. İnsan Lökosit Antijeni (Human Leucocyte Antigen-HLA).....	5
4.2.1. HLA genlerinin kalıtımı.....	6
4.2.2. HLA antijenleri.....	7
4.2.3. HLA antijenlerinin fonksiyonları.....	8
4.3. Öldürücü İmmünoglobulin Benzeri Reseptör (KIR-Killer Ig-Like Receptor)..	9
4.3.1. KIR genleri.....	10
4.3.2. KIR molekülleri.....	13
4.3.3. KIR haplotipleri.....	16
4.4. KIR Ligandı Olan Klasik HLA Sınıf I Molekülleri.....	17
4.4.1. HLA-C1 ve HLA-C2 Grupları.....	17
4.5. Hamilelik ve İmmünite.....	18
4.5.1. Allograft olarak fetus.....	19
4.5.2. Plasenta.....	20
4.5.2.1. Plasenta'nın gelişimi.....	20
4.5.2.2. Semi-Allograft olarak plasenta.....	23
4.5.3. Spontan abortus.....	24
5. GEREÇ ve YÖNTEM	27
5.1. Hasta Seçimi.....	27
5.2. DNA İzolasyonu.....	27
5.3. HLA Doku Grubu Tiplendirilmesi.....	29
5.4. KIR Allellerinin Belirlenmesi.....	29
5.5. İstatistiksel Analizler.....	30
6. BULGULAR.....	31
6.1. RSA Hastalarında HLA Doku Grubu Dağılımları.....	31
6.1.1. RSA' lı Bayanlarda En Sık Rastlanan HLA Allelleri	31
6.1.2. RSA' lı Erkeklerde En Sık Rastlanan HLA Allelleri.....	32
6.1.3. En Sık Rastlanan HLA Allellerinin Karşılaştırması.....	32
6.2. RSA Hastalarında Eşler Arası HLA Doku Grubu Uyumları.....	34
6.3. KIR Allellerinin Dağılımları.....	35
6.4. KIR Haplotipi ve HLA-C Grup Dağılımları.....	37
6.4.1. RSA' lı Bayanlarda ve Sağlıklı Kontrollerde KIR Haplotip Dağılımları.....	37
6.4.2. RSA' lı Bayanlarda ve Erkeklerde HLA C Grup Dağılımları.....	37
6.4.3. RSA' lı Bayanlarda ve Erkeklerde KIR haplotip ve HLA-Cw*07 ilişkisi...	37
6.5. RSA' lı Bayan KIR ile RSA' lı Erkek HLA Korelasyonları	38
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	40

8. KAYNAKLAR	45
9. ÖZGEÇMİŞ.....	51
10. ETİK KURUL ONAYI.....	52

KISALTMALAR

APAS: Antifosfolipid Antikor Sendromu

APC: Antigen Presenting Cell(Antijen sunucu hücre)

Asn: Asparjin

CD: Cluster of Differentiation

DAP12: DNAX Activating Protein of 12 kDa (DNAX Aktive Edici Protein 12 kDa)

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilendiamin tetraasetikasit

EtBr: Etidyum Bromür

HLA: Human Leucocyte Antigen-(İnsan Lökosit Antijenleri)

IFN- γ : Interferon Gamma

Ig:İmmünglobulin

ILT: İmmünoglobulin Like Transcript (İmmünoglobulin Benzeri Transkript)

ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (İmmün Reseptör Tirozin Bazlı Aktivasyon Motifi)

ITIM: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif (immün reseptör tirozin bazlı inhibisyon motifi)

IVF: İn-vitro Fertilizasyon

KAR: Killer Activation Receptors (Öldürücü Hücre Aktive Edici Reseptör)

KARAP: Killer Cell Activating Receptor Associated Protein (Öldürücü Hücre Aktivatör Reseptör ile İlişkili Protein)

Kb:Kilo baz

KIR: Killer Ig-like Receptors-(Doğal Öldürücü Hücre İmmünoglobulin Benzeri Reseptörler)

KIR: Killer İnhibition Receptors (Öldürücü Hücre İnhibe Edici Reseptör)

KLR: Killer Cell Lectin-like Receptor (Öldürücü Hücre Lektin Benzeri Reseptör)

LAIR: Leukocyte-Associated Inhibitory Receptor (Lökosit İlişkili İnhibitör Reseptör)

LRC: Leukocyte Receptor Complex (Lökosit Reseptör Kompleksi)

Lys: Lizin

Mbp: Mega base pairs (Mega b)az çifti

Met: Metionin

MHK: Majör Histocompatibility Complex-(Majör Doku Uyum Kompleksi)
NK: Natural Killer-(Doğal Öldürücü Hücre)
NKC: Natural Killer Complex (Doğal Öldürücü Hücre Kompleksi)
PCR-SSO: Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Diziye Özgü Oligonükleotid
PCR-SSP: Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Diziye Özgü Primer
RSA: Rekürrent Spontan Abortus
SHP-1: Src-homology 2 domain containing phosphatase-1
TBE: Tris-Borik Asit-EDTA
TCR: T Cell Receptor (T hücre reseptörü)
Th1: Yardımcı T hücre 1
Th2: Yardımcı T hücre 2
TNF- α : Tümör Nekroz Faktör Alfa
UV: Ultraviyole
ZAP70: Zeta (ζ) eşlikçi 70 kDa protein
 β 2m: Beta 2 mikroglobulin

TABLolar LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo 1. KIR moleküllerinin yapısal özellikleri ve bilinen ligandları	13
Tablo 2. HLA-C molekülünün ağır zincirindeki α heliksindeki amino asit farkına göre C1 ve C2 grupları	18
Tablo 3: SSO ile saptanan belli başlı KIR allelleri ve fonksiyonları	30
Tablo 4. RSA' lı Bayanlarda En Sık Rastlanan İlk 3 HLA Alleli.....	31
Tablo 5. RSA' lı Erkeklerde En Sık Rastlanan İlk 3 HLA Alleli.....	32
Tablo 6. RSA'lı bayanlarda ve RSA' lı erkeklerde KIR allel dağılımları.....	35
Tablo 7. RSA'lı Bayanlarda ve Sağlıklı Kontrollerde KIR Haplotip Dağılımları Yüzdesi	37
Tablo 8. RSA'lı Bayanlarda ve Erkeklerde HLA-C Grup Dağılımları Yüzdesi ..	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil 1. HLA gen bölgesinin 6. kromozom üzerinde yerleşimi ve Sınıf I, II, III bölgeleri.....	6
Şekil 2. Anne ve babadan, çocuklara HLA antijenlerinin geçişi	7
Şekil 3. İnsan 12. kromozomda ve fare 6. kromozomda KLR genlerinin organizasyonlarının karşılaştırılması.....	10
Şekil 4. KIR genlerinin 19. kromozom üzerindeki ve LRC içerisindeki yerleşimi	11
Şekil 5. KIR geninin organizasyonu	12
Şekil 6. KIR inhibisyon ve aktivasyon sinyali.....	14
Şekil 7. KIR Moleküllerinin Domain Yapıları.....	15
Şekil 8. KIR haplotiplerini oluşturan gen içerikleri.....	16
Şekil 9. İnsan plasenta oluşumu	22
Şekil 10. RSA' lı bayanlarda (RSA-K), RSA' lı erkeklerde (RSA-E) ve sağlıklı kontrollerde en sık rastlanan HLA sınıf I allellerinin karşılaştırılması	33
Şekil 11. RSA' lı bayanlarda (RSA-K), RSA' lı erkeklerde (RSA-E) ve sağlıklı kontrollerde en sık rastlanan HLA sınıf II allellerinin karşılaştırılması.....	34
Şekil 12. RSA' lı eşler ve sağlıklı doğum yapmış eşler arası HLA doku grubu uyum yüzdeleri	35
Şekil 13. RSA' lı bayanlar ve sağlıklı kontroller arası inhibitör KIR allel yüzdeleri	36
Şekil 14. RSA' lı bayanlar ve sağlıklı kontroller arası aktivatör KIR allel yüzdeleri	36
Şekil 15. RSA' lı bayanlarda KIR2DS5 ile eşlerindeki HLA-Cw06 arasındaki ilişki	39
Şekil 16. RSA' lı bayanlarda KIR2DS2 ile eşlerindeki HLA-B51 arasındaki ilişki	39

1. ÖZET

Semi-allojenik fetustaki gelişme geriliğinin, tekrarlayan düşüklerin ve fetus ölümlerinin immün aracılıklı olduğu ve MHK'nın bu hastalıkta rol oynadığı düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında; RSA'lı eşler arasındaki doku grubu benzerlik ya da farklılıklarının; ayrıca anneye ait KIR repertuarı ile babaya ait MHK sınıf I ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Hastalardan alınan periferik kandan elde edilen DNA'lar ile HLA-A/B/C ve HLA-DR/DQ doku grubu tiplerini düşük rezolüsyonlu SSP-PCR yöntemi ile KIR allel polimorfizmleri ise SSO-PCR yöntemi ile incelenmiştir. RSA tanısı konmuş bayanlar ile eşleri arasındaki HLA doku grubu uyumları sağlıklı doğum yapan bayanlar ve eşleri arasındaki doku grubu uyumları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır. HLA-C allellerinin karşılaştırılmasında; Türk toplumunda en sık rastlanan Cw*04 allelinin, RSA'lı erkeklerde düşük sıklıkta olduğu saptandı ($p=0.005$). Erkeklerde Cw*07 allel sıklığının ise her iki gruba göre ileri derecede yüksek olduğu gösterildi ($p=0.001$). Cw*06 allelinin ise RSA'lı kadınlarda genel populasyona göre düşük sıklıkta olduğu bulundu ($p=0.01$). RSA'lı bayan KIR ile RSA'lı Erkek HLA Korelasyonları incelendiğinde inhibitör özellik gösteren KIR molekülleri ile bu bayanların eşlerinde eksprese edilen herhangi bir sınıf I ve Sınıf II allelinin korrelasyon göstermediği bulundu. RSA'lı kadınlarda aktivatör KIR moleküllerinden KIR2DS5 ile HLA-Cw*06 arasında ($p=0.03$) ve benzer şekilde kadında aktivatör KIR2DS2 ile erkekte HLA-B51 arasında ilişkili gözükmektedir ($p=0.006$). Buna karşın erkeklerdeki HLA-Cw*07 sıklığı ile kadınlardaki aktivatör KIR'lar arasında istatistiksel anlamlılık gösteren bir ilişki saptanmadı. Anneye ait KIR repertuarı ve babaya ait HLA Sınıf I repertuarı fetusun yaşamı için önemli faktörler olabilir.

Anahtar Sözcükler:

HLA, KIR, MHK, NK, Sebebi bilinmeyen tekrarlayan düşük

2. SUMMARY

The Role of Major Histocompatibility Complex in Fetal Survival

The development deficiencies of semi-allogeneic fetus, recurrent abortions and fetal survival are controlled by immune mechanisms including MHC molecules. In this study, we aimed to investigate the matching and mismatching of maternal-paternal HLA molecules, also maternal KIR and paternal MHC class I repertoires in patients with RSA. DNA isolated from peripheral blood mononuclear cells of patients was analyzed for HLA-A/B/C and HLA-DR/DQ genotyping by low resolution SSP-PCR method and KIR allele polymorphism by SSO-PCR method. HLA match between women with RSA and their spouses were evaluated in comparison to healthy women and their spouses. No significant difference was found. The results of HLA-C allele matching showed that; Cw*04, the most frequent allele in Turkish population was found to be lower in men with RSA ($p=0.005$). The frequency of Cw*07 allele in men was found to be significantly higher than both from Turkish population and women with RSA ($p=0.001$). The Cw*06 allele in women with RSA was found lower compared to Turkish population ($p=0.01$). The correlation analysis between KIR from women with RSA and HLA from their spouses revealed that KIR molecules with inhibitory functions from women correlate with neither HLA class I nor class II allele from their spouses. There was a significant correlation between KIR2DS5, the activator KIR molecule, and HLA-Cw*06 in women with RSA ($p=0.03$). Also there was a significant correlation between activator KIRDS2 in women and HLA-B51 in men ($p=0.006$). In contrast, no significant correlation between the frequency of HLA-Cw*07 in men and activator KIRs in women was found. Our study suggests that maternal KIR and paternal HLA class I repertoire are important factors regarding fetal survival.

Key Words:

HLA, KIR, MHC, NK, recurrent spontaneous abortion (RSA)

3. GİRİŞ ve AMAC

Majör Doku Uyum Kompleksi (Major Histocompatibility Complex-MHK), şimdiye kadar çalışılan bütün omurgalılarda bulunan; bağışıklıkla ilgili fonksiyonları olan ve olmayan bir gen grubudur (Trowsdale, J. 1995; Gruen, J.R. et al. 1997). MHK bağışıklığı denetlemekte ve doku uygunluğunda rol oynamaktadır (Snell, G.D. 1981). İnsanda MHK, insan lökosit antijenleri (Human Leucocyte Antigen-HLA) olarak adlandırılır (Dorak M.T. 2002). HLA, plazma membranında yer alan transmembran glikoproteinlerdir. Her bireyin HLA antijenleri birbirinden farklıdır. Bu farklılık ve polimorfizm türlerin çeşitliliğini ve korunmasını sağlamaktadır (Mueller R.F. et al. 1997; Walter B. 1997).

Araştırmalar, klinik olarak belirlenmiş tüm gebelikler arasında düşük sıklığının % 15 kadar olduğunu göstermektedir (Attar N. et al. 1995). Sebebi belli olmayan tekrarlayan düşükler ise populasyonun %1' inde rastlanan bir durumdur (Kruse C. 2004). Birçok vakanın patogenezi bilinmemektedir. Çalışmalar, sebebin immünolojik bozukluklardan da kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (McIntyre J.A. et al. 1983, Patriarca A. et al. 2000, Kruse C. 2004). Çeşitli gruplar, MHK genlerinin ya da moleküllerinin tekrarlayan düşüklerde rol oynadığını ileri sürmüşlerdir (McIntyre J.A. et al. 1983-Sbracia M. et al. 1996). Bazı araştırmacılar, eşler arasındaki HLA uyum artışının, trofoblastlarda immün tanınmanın bozulmasına neden olduğunu ve düşüklerin meydana geldiğini düşünmüşlerdir. Ancak HLA uyumunun artmasının düşüklere neden olduğu net olarak gösterilememiştir (Kruse C. 2004). Çeşitli çalışmalar, tekrarlayan düşük hastalarında çeşitli otoantikör pozitifliklerinin, normal doğum yapan kadınlara oranla daha yüksek olduğunu göstermiştir (Esplin S. et al. 1998). Nedeni açıklanamayan tekrarlayan düşüklerde sistemik ya da lokal otoimmünitenin rolü olması, bozukluğun HLA sınıf II allelleri ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Birçok otoimmün hastalığın bu gen lokusları ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Klein, J. et al. 2000). Bu teori, HLA DRB1*03' ün tekrarlayan düşük hastalarında, antikardiyolipin antikörleri ve antinükleer antikörlerin pozitifliği ile ilişkili olduğunun bulunmasıyla desteklenmiştir (Ole B. et al. 1998).

Evrım sürecinde genetik çeşitliliğin sağlanması, türlerin devamı için önemlidir. HLA antijenlerindeki çeşitlilik de bu süreçte eş seçimi ile ilişkili olabilmektedir (Satar G. 1992, Scott V. 1998).

Allojenik fetusu etkileyebilecek diğer immünolojik faktörler ise doğal öldürücü hücre (natural killer, NK) ve bu hücrelerin aktivasyonundan ya da inhibisyonundan sorumlu moleküllerdir. Hamilelikte uterustaki lenfositlerin % 70 'i NK hücreleridir (Moffett-king-A. 2002). Öldürücü immünoglobulin benzeri reseptörler (Killer Ig-like Receptors, KIR), NK hücreleri, CD4+ $\alpha\beta$, CD8+ $\alpha\beta$ ve $\gamma\delta$ T hücreleri gibi lenfoid hücre alt gruplarında bulunan düzenleyici moleküller grubunun üyeleridir (Carrington M. 2002). KIR reseptörlerinin HLA sınıf I molekülleriyle ilişkileri gösterilmiştir (Parham P. 2005). NK hücre etkileşimleri ile NK hücre aktivitesini inhibe etmede ve sağlıklı hücreleri NK aracılıklı sitotoksiteden korumada rol oynarlar (Carrington M. 2002, Parham P. 2005). NK hücreleri fenotipik ve fonksiyonel özellikleri açısından immün düzenleyici ve sitotoksik etki gösteren alt gruplar oluştururlar. Bu alt grupların oluşmasında hücre yüzey belirteçlerinin yanı sıra KIR moleküllerinin varlığı da önemlidir (Cooper M.A. 2001, Sherif S. 2006).

KIR genine ait çok sayıda allel belirlenmiştir (Carrington M. 2002). KIR gen repertuarları incelendiğinde; sağlıklı doğum yapan kontrol grubundaki bayanlara göre, tekrarlayan düşük yapan bayanlardaki inhibitör KIR genlerinin, daha az olduğu görülmüştür (Varla-Leftherioti M. 2003). Bazı araştırmalar bu verileri desteklemekle birlikte; özellikle inhibitör KIR reseptörlerinden KIR2DL2' nin tekrarlayan düşük yapan bayanlarda, kontrollere göre daha düşük olduğunu bildirmiştir (Flores A.C. 2007).

Bu tez çalışmasında eşler arasındaki doku grubu benzerlikleri ile sebebi belirlenemeyen düşükler arasındaki ilişkinin; ayrıca KIR ile HLA arası ilişkinin hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

HLA-A/B/C ve HLA-DR/DQ doku gruplarının ve KIR allel polimorfiziminin incelenmesi, semi-allojenik fetusun yaşam devamlılığını etkileyen temel immünolojik mekanizmaların anlaşılmasını sağlayarak, ilgili literatüre ışık tutabilir.

4. GENEL BİLGİLER

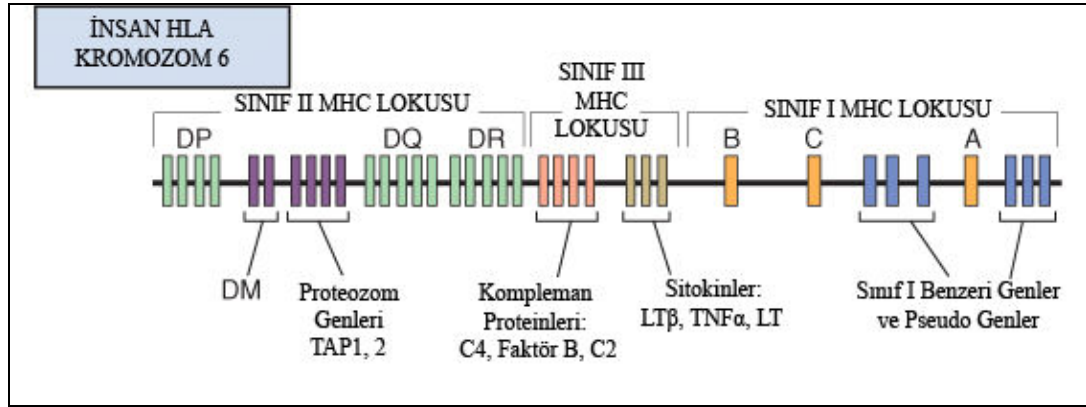
4.1. Majör Doku Uyum Kompleksi (Major Histocompatibility Komplex-MHK)

MHK, şimdiye kadar çalışılan bütün omurgalılarda bulunan; bağışıklıkla ilgili fonksiyonları olan ve olmayan bir gen grubudur (Trowsdale, J. 1995; Gruen, J.R. et al. 1997). Eritrosit antijenleri 1931 yılında Landsteiner tarafından keşfedilmiş ve kan transfüzyonu için grup uyumu gerekliliği, doku/organ transplantasyonu için de doku antijenlerinin uyumunun gerekliliğinden söz etmiştir. 1930'lu yıllarda Peter A. Gorer ve George D. Snell farelerde doku antijenlerinin varlığından söz etmiş ve bunların gen bölgesine Doku Uyum Kompleksi adını vermişlerdir (Schwartz B.D. 1996). Farelerde 17. kromozomdaki bu H-2 gen bölgesinin sentezini sağladığı doku antijenlerine de MHK antijenleri denmiştir (Schwartz B.D. 1996, Çarin M. 1997, Sebik F. 1998). MHK bağışıklığı denetlemekte ve doku uygunluğunda rol oynamaktadır (Snell, G.D. 1981). MHK; insanlarda ve farelerde üreme süreçlerine; ayrıca çiftleşmede seçiciliğe etki ederek üremeyi de etkilemektedir (Satar G. 1992, Scott V. 1998, Milinski M. 2006). İnsan MHK genlerinin proteine çevrilmiş biçimleri İnsan Lökosit Antijeni (Human Leucocyte Antigen-HLA) diye adlandırılır.

4.2. İnsan Lökosit Antijeni (Human Leucocyte Antigen-HLA)

HLA antijenlerinin oluşumundan sorumlu MHK genleri 6. kromozomun kısa kolu üzerine sentromere yakın bir bölgede (6p21.31) yerleşmiş olup, yaklaşık olarak 3,5- 4 Mbp' lik bir yer kaplar (Browning M. et al. 1996, Shankarkumar U. 2004). MHK kompleksi kendi içinde alt bölgelere ayrılır. Sınıf I bölgesi, MHK'nin telomerik ucunda yer alır. HLA -A, -B, -C olarak da tanınan klasik transplantasyon antijenlerini ve HLA -E, -F, -G gibi klasik olmayan Sınıf I antijenleri kodlayan gen lokuslarını, HLA-H, -J, -K, -L, gibi psödogenleri ve gen segmentlerini içerir. Sınıf II bölgesi, sentromere yakın yerleşmiştir. HLA-DR, HLA-DQ ve HLA-DP molekülleri ile "sınıf II benzeri" HLA-DM ve HLA-DO moleküllerinin gen lokuslarını bulundurur. Sınıf III gen bölgesi sınıf I ile sınıf II bölgeleri arasında bulunan doku grubu antijenlerini kodlamayan farklı özellikli bir bölgedir (Abul K. Abbas, 2006).

Tüm sınıf I genler 3-6 kb, sınıf II genler ise 4-11 kb uzunluktadır (Browning M. et al. 1996) (Şekil 1).

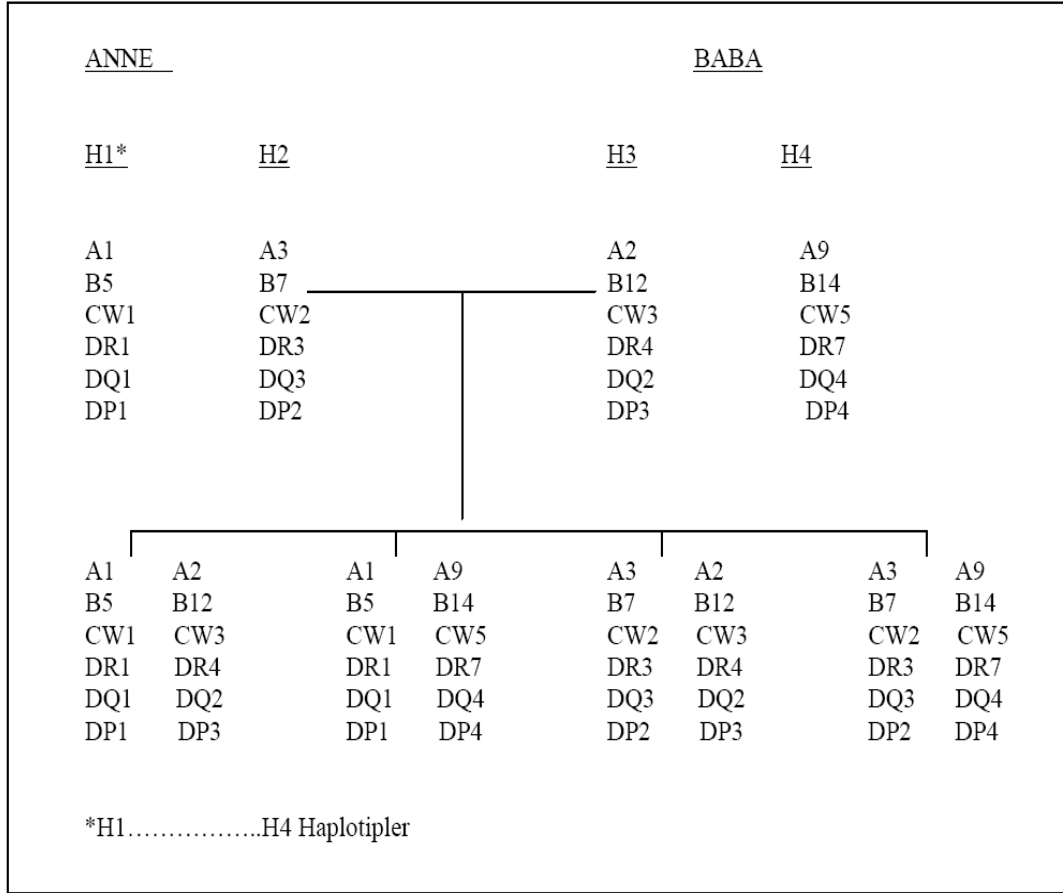


Şekil 1. HLA gen bölgesinin 6. kromozom üzerinde yerleşimi ve Sınıf I, II, III bölgeleri- Abul K. Abbas, 2006)’ dan değiştirilerek.

4.2.1.HLA genlerinin kalıtımı

Tek bir kromozomda yer alan ve birbirine yakın lokuslarda bulunan allel kompleksleri bir haplotip olarak adlandırılır. HLA haplotipleri Sınıf I, II, III allellerinden oluşur. Tüm HLA genleri kodominanttır, böylece herhangi bir HLA lokusundaki her iki allel de eksprese edilir. Bir bireyde bulunan 2 haplotip, o bireyin HLA genotipini oluşturur. Haplotipler, Mendel kurallarına uygun olarak kalıtılır. Her hücrede anne ve baba kökenli homolog kromozomlar üzerindeki genler tarafından kodlanan proteinler birlikte eksprese edilirler (Şekil 2). Homolog kromozomlar arasında bir segment değişimi (crossing-over) olması ile rekombinasyon gerçekleşir; Görülme sıklığı %1-3 olup; en sık HLA-A, HLA-DP bölgelerinde görülür. Her bölgede yer alan allellerin sayısı göz önüne alındığında; toplumlarda beklenen teorik değerden daha az sayıda haplotip bulunduğu görülür. Bu durum, bazı allellerin birlikteliğinin rasgele olmadığını desteklemektedir. Bu durum “Bağlantı Eşitsizliği” (Linkage Disequilibrium) olarak bilinir ve bazı haplotiplerin korunma çabası olarak açıklanmaktadır. Bu eğilim, en çok B-Cw, DRB1-DRB3/4/5, DRB1-DQB1 arasında olmak üzere HLA-B ile HLA-DQB1 arasındaki bölge boyunca görülmektedir. Arada yerleşmiş olan kompleman genlerini de kapsayan bazı haplotipler “genişletilmiş haplotipler” olarak adlandırılır. Hastalık ilişkisi çalışmalarında genişletilmiş haplotipler ile kurulan ilişkiler, allelik farklarla kurulan ilişkilere göre daha anlamlı

bulunmaktadır. Haplotiplerin frekansında etnik farklılıkların önemi büyüktür (Yeğin 0. 1990, Yeşilli O. 1993, Dorak M.T. 2002, Shankarkumar U. 2004).



Şekil 2. Anne ve babadan, çocuklara HLA antijenlerinin geçişi (Yeğin 0. 1990)

4.2.2.HLA antijenleri

HLA antijenleri de eksprese edildikleri gen lokuslarına, yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre 3 sınıfa ayrılır. Sınıf I HLA molekülleri hemen hemen bütün çekirdekli hücrelerin yüzeylerinde bulunurken Sınıf II HLA moleküllerin ekspresyonları daha sınırlıdır. Sınıf II HLA molekülleri monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, B hücreleri ve uyarılmış T hücreleri gibi bazı hücrelerin yüzeylerinde bulunur (Abul K. Abbas, 2006).

4.2.3.HLA antijenlerinin fonksiyonları

Lenfositler, antijenlere özgün bir immün yanıt oluşmasından sorumlu olan hücrelerdir. B lenfositler, immünglobulinlerin (Ig) üretiminden sorumludurlar. T lenfositler ise, B hücrelere yardım etmenin yanı sıra, geç tip aşırı duyarlık reaksiyonu oluşturma, virus ile enfekte hücrelerin seçilip öldürülmesi gibi farklı birçok fonksiyonu sürdürürler. B hücrelerinin özgünlüğü sentezledikleri antikordan kaynaklanırken; T lenfositlerde özgünlüğü sağlayan, T hücre reseptörleri (TCR) ve MHK molekülüdür (Browning M. et al. 1996).

T hücreleri de yabancı antijenleri HLA molekülleri aracılığı ile tanımaktadır (Shankarkumar U. 2004). T hücreleri tanıdıkları HLA moleküllerine göre 2 sınıfa ayrılır. Bunlar; yüzeylerinde CD4 reseptörü taşıyan ve Sınıf II HLA moleküllerini tanıyan T hücreleri ile yüzeylerinde CD8 reseptörü taşıyan ve Sınıf I HLA moleküllerini tanıyan T hücreleridir (Abul K. Abbas, 2006).

Canlı yaşamının sürmesi için, yabancı antijenlerin bağışıklık sistemi tarafından tanınması ve bunlara karşı belirli bir savunma mekanizmasının geliştirilmesi gerekmektedir. T hücreleri tarafından yabancı antijenik yapıların tanınması, bu yapıların HLA molekülleri ile T hücrelerine sunulmasına bağlıdır. HLA molekülleri immün sistemin kendinden olanı ve olmayanı ayırt etmesinde önemli rol oynar (Klein, J. et al. 2000). HLA molekülleri, taşıdıkları peptid ile birlikte fonksiyonel bir bütün oluştururlar. TCR ve MHK-peptid kompleksleri arasındaki ilişki sonucunda, hem antijeni sunan hücrenin hem de antijeni tanıyan T lenfositlerin özelliklerine bağlı değişebilen bir dizi sinyal, hücre içine iletilir. Bu ilişki, peptidi sunan ve tanıyan hücrelerin aynı MHK moleküllerini taşıması durumunda gerçekleşebilir.

Bu mekanizma, nakil graft ve tümör reddi gibi immün olaylarda, virüs ile enfekte hücrelerin parçalanmasında ve diğer immün hücrelerin kontrolünde rol almaktadır. Ayrıca peptid-MHK kompleksi TCR repertuarını da belirler (Dorak M.T. 2002). MHK molekülleri timustaki T lenfositlerin pozitif ve negatif seçimde de belirleyicidir.

NK hücre fonksiyonları Sınıf I moleküller aracılığı ile kontrol edilmektedir. Yüzeylerinde öz-MHK sınıf I molekülü bulundurmayan hedef hücreler NK hücre cevabına neden olur. Bu olay “Özün Kaybı (missing-self) hipotezi” olarak bilinmektedir. Özellikle tümör hücrelerine ve virüs ile enfekte hücrelere karşı immün cevapta önemlidir. Bu hipoteze göre sağlıklı allojenik hücreler de öz-MHK allelleri yokluğunda NK hücrelerinin hedefi olabilirler. NK hücre yüzeyindeki inhibitör ve aktivatör reseptör repertuarı hedef hücrenin lizisinde belirleyicidir. Hedef hücrede öz-MHK sınıf I molekülü ve NK hücresinde de inhibitör reseptör varlığında hedef hücre lizise uğramaz ve yaşamını devam ettirebilir. Aynı koşullarda NK hücresinde aktivatör reseptör varlığında bile inhibitör reseptörün öz-MHK ye bağlanması NK hücre sitotoksitesini baskılayabilir. Buna karşın öz-MHK sınıf I molekül eksikliğinde NK hücre aktivasyonu ile hedef hücre lizisi gerçekleşmektedir (Lewis L. et al. 2005, Vinay K. et al. 2005).

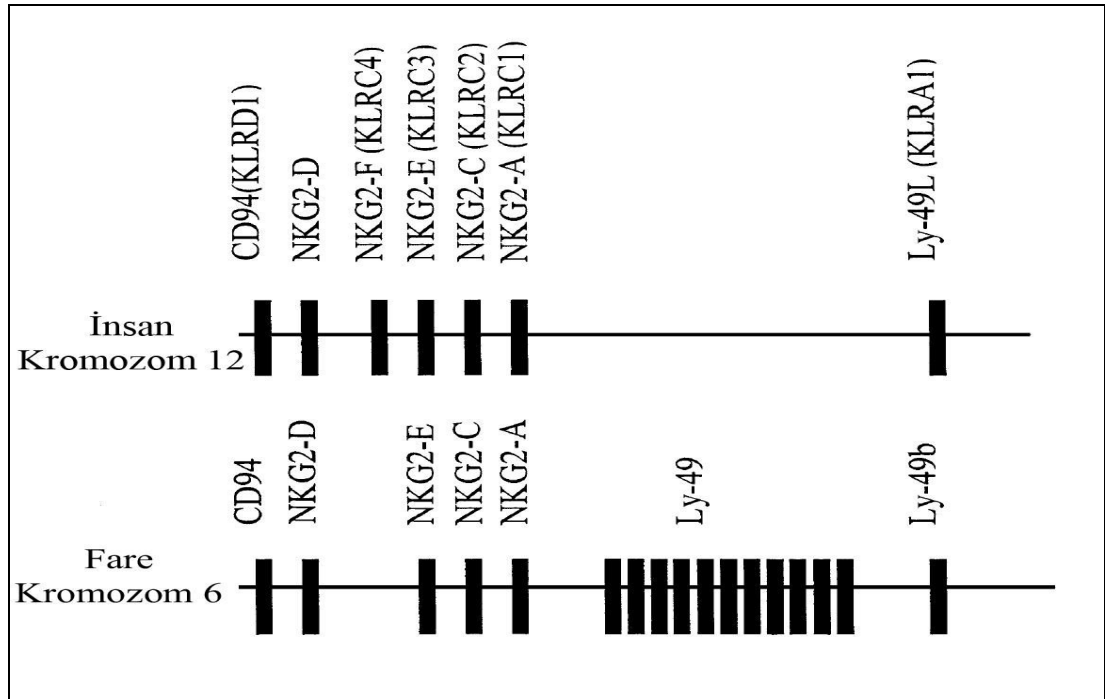
4.3.Öldürücü İmmüoglobulin Benzeri Reseptör (KIR-Killer Ig-Like Receptor)

KIR, MHK sınıf I ligandları olarak evrim süresince iyi korunmuş birçok türde bulunan doğal ve adaptif immün cevapta düzenleyici rollere sahip reseptör ve gen ailesidir (Parham P. 2005). İlk olarak NK hücre sitotoksitesini inhibe ve aktive edici etkileri tanımlanmış ve bu fonksiyonel özelliklerine göre NK hücre inhibe edici reseptörler (Killer Inhibitory Receptors-KIR) ve NK hücre aktive edici reseptörler (Killer Activatory Receptors-KAR) olarak isimlendirilmişlerdir. Ig benzeri yapıları anlaşıldığında da NK hücre immüoglobulin benzeri reseptörler (Killer Ig-like Receptors-KIR) olarak isimlendirilmiştir (Vivier E. et al. 2004).

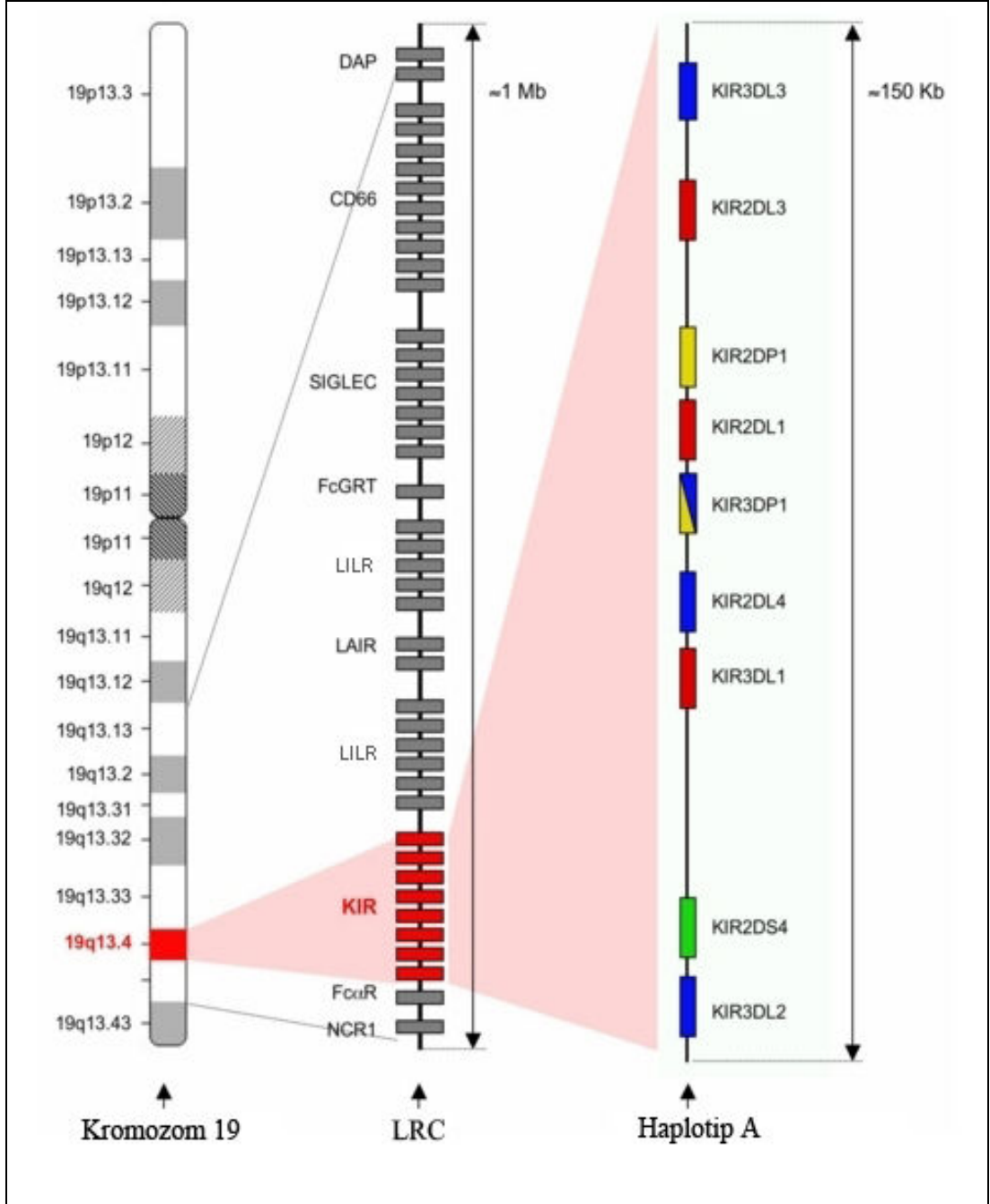
KIR reseptörleri ile HLA-A, -B, -C molekül etkileşimleri NK hücre aktivasyonunda ya da inhibisyonunda belirleyici rol oynamaktadır. İnhibisyondan sorumlu KIR reseptörleri sağlıklı hücreleri NK hücre aracılıklı sitoliziden koruyucu etkiye sahiptir. Aktivasyondan sorumlu KIR reseptörleri de NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesini artırıcı fonksiyona sahiptirler. Ayrıca KIR reseptörlerinin IFN- γ ya da TNF- α gibi immün cevabın kontrolünde önemli olan sitokinlerin salınımına etkisi de bilinmektedir (Parham P. 2005).

4.3.1.KIR genleri

NK hücresi reseptörleri olmalarından dolayı KIR genleri ilk olarak öldürücü hücre lektin benzeri reseptör (Killer Cell Lectin-like receptor- KLR) gen bölgesinde aranmıştır. KLR gen bölgesi farelerde 6. kromozomda yer alırken, insanlarda lektin benzeri reseptörlerin ekspresyonunun sağlandığı gen bölgesi doğal öldürücü hücre kompleksi (NKK, natural killer complex) kromozom 12p12.13 bölgesinde bulunmaktadır (Middleton D. 2002) (Şekil 3). Buna karşın KIR gen lokusu ise 12. Kromozomda değil, kromozom 19q13.4 bölgesindeki Lökosit Reseptör Kompleksi (LRK, Leukocyte Receptor Complex)‘ nin içinde yaklaşık 150 kb büyüklüğünde lokalize olmuştur (Şekil 4). LRK bölgesinde KIR gen lokusunun dışında, lökosit ilişkili inhibitör reseptör (LAIR, Leukocyte-Associated Inhibitory Receptor) ve immünoglobulin benzeri transkript (ILT, immünoglobulin like transcript) gen lokusu ve fonksiyonel başka genler de bulunmaktadır. ILT ailesi üyeleri de KIR reseptörleri gibi MHK sınıf I molekülleri ile etkileşime geçerek NK hücre sitolitik aktivitesinin inhibisyonunda ya da aktivasyonunda rol oynarlar (Parham P. 2005, Stewart C.A. et al. 2006).

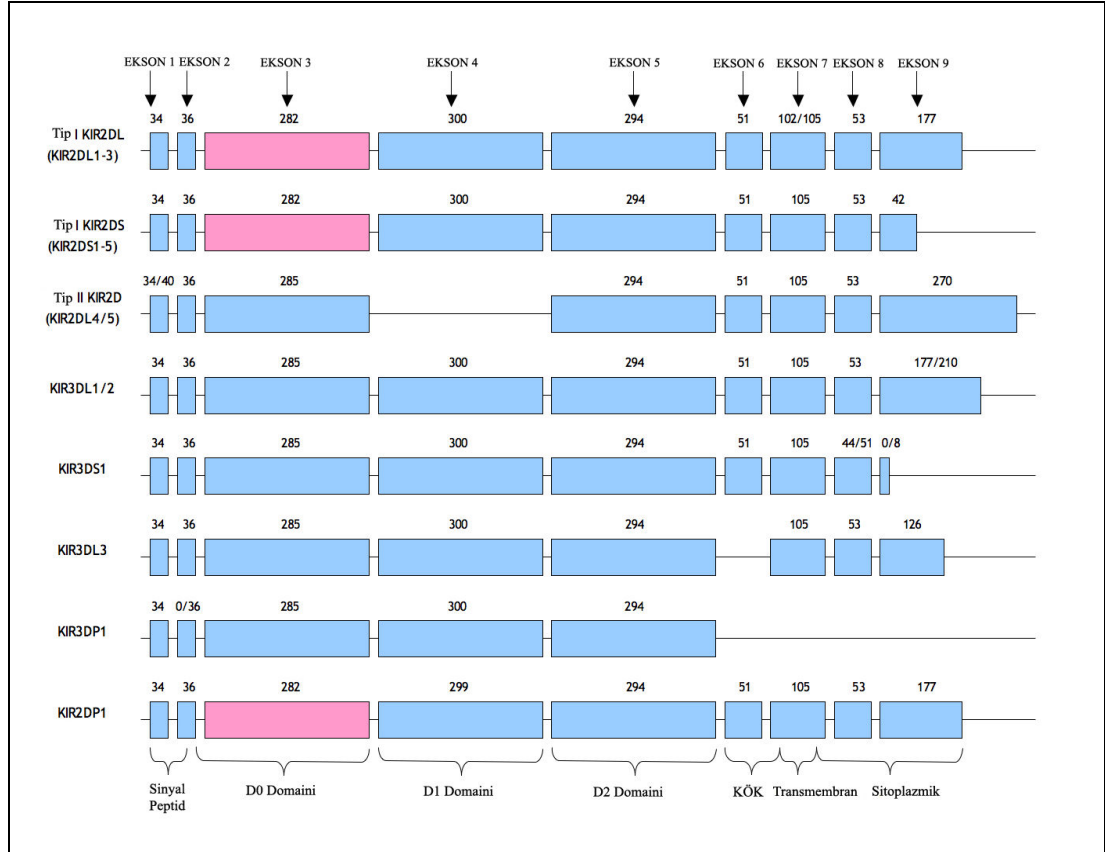


Şekil 3. İnsan 12. kromozomunda ve fare 6. kromozomunda KLR genlerinin organizasyonlarının karşılaştırılması. Derek M. (2002) den değiştirilerek



Şekil 4. KIR genlerinin 19. kromozom üzerindeki ve LRC içerisindeki yerleşimi- (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html> 'den değiştirilerek alınmıştır. Erişim 23 Haziran 2008).

KIR genleri 9 ekson ile organize olmuşlardır. Ekson 1 ve 2’ de sinyal peptid ve olgun proteinin ilk iki aminoasidi kodlanmaktadır. Ekson 3’ te D0, Ekson 4’ te D1, Ekson 5’ te D3 olarak isimlendirilen Ig benzeri domainler kodlanır. Ekson 6’ da D2 domainini transmembran bölgeye bağlayan kök kısmı kodlanır. Ekson 7 de transmembran kısım, Ekson 8 ve Ekson 9 da ise sitoplazmik kuyruk kodlanmaktadır (Vilches C. et al. 2002, Stewart C.A. et al. 2006) (Şekil 5).



Şekil 5. KIR geninin organizasyonu (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>‘ den değiştirilerek alınmıştır. Erişim 23 Haziran 2008).

4.3.2.KIR molekülleri

Ekspresyonu bilinen yaklaşık 14 tane KIR geni tanımlanmıştır (Tablo 1). KIR reseptörlerinin isimlendirilmesi protein yapılarına göre yapılmaktadır. Göz önüne alınan kriterler; hücre dışı Ig domain sayısı, sitoplazmik kuyruk uzunluğu ve dizi benzerliğidir (Carrington M. 2002,www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/kir.html Erişim 23 Haziran 2008).

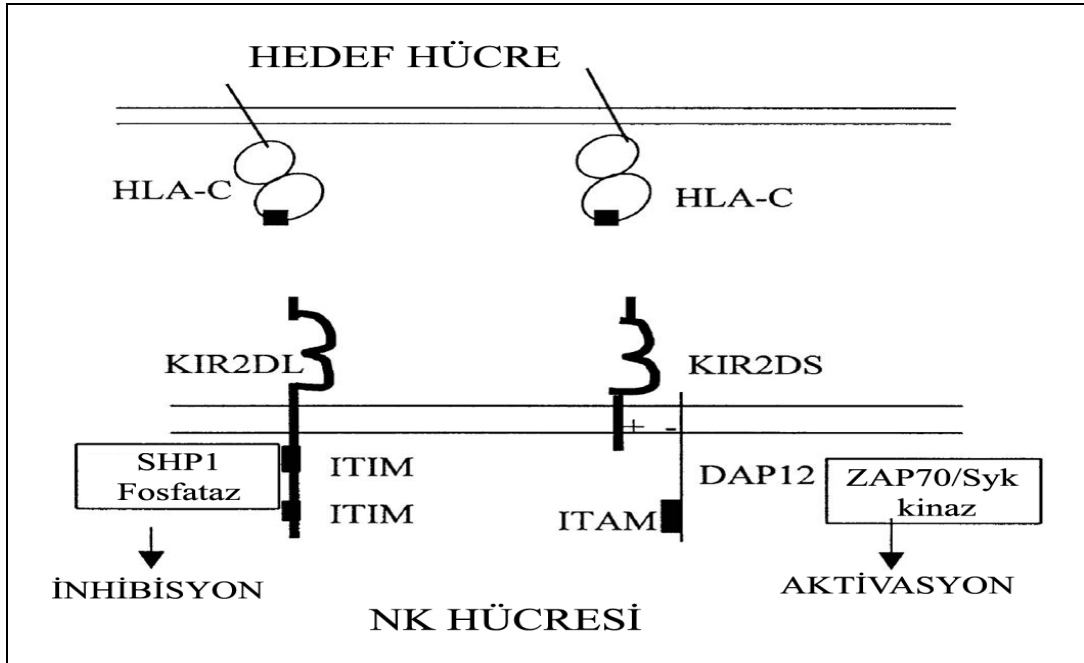
Tablo 1. KIR moleküllerinin yapısal özellikleri ve bilinen ligandları (Moretta L.2004 ‘ten değiştirilerek).

KIR	Hücre Dışı Ig Domaini	Bilinen Ligandı
3DL1	D0-D1-D2	HLA-Bw4
3DL2	D0-D1-D2	HLA-A3 / HLA-A11
3DL3	D0-D1-D2	?
3DS1	D0-D1-D2	?
2DL1	D1-D2	HLA-C ^{Lys80}
2DL2,3	D1-D2	HLA-C ^{Asn80}
2DS1	D1-D2	HLA-C ^{Lys80}
2DS2	D1-D2	HLA-C ^{Asn80}
2DS3,5	D1-D2	?
2DS4	D1-D2	HLA-C ?
2DL4	D0-D2	HLA-G
2DL5	D0-D2	?

KIR molekülleri, amino ucu hücre dışında, karboksil ucu hücre içinde yer alan tip I membran proteinleridir. Hücre dışında 2 tane domain bulunduran moleküller (2D), 3 tane domain bulunduran moleküller (3D) olarak gruplanmaktadır. Hücre içindeki sinyal ileti bölümleri uzun olanlar (L), kısa olanlar (S) olarak isimlendirilirler(Carrington M. 2002). Gen düzeyinde pseudogenler de mevcuttur. Bunların isimlendirmelerinde de (P) harfi kullanılmaktadır (Parham P. 2005).

Uzun sitoplazmik kuyruğu olan KIR reseptörleri sinyal ileti için 1 ya da 2 tane “immün reseptör tirozin bazlı inhibisyon motifi (ITIM)” barındırmaktadır. Bu motifin (V/IxYxxL/V) görevi tirozinin fosforillenmesi ile SHP-1 fosfatazın aktiflenmesi ve inhibisyon sinyalinin iletilmesidir. Yani uzun sitoplazmik kuyruğu olan KIR reseptörleri inhibisyondan sorumludur (Middleton D. 2002).

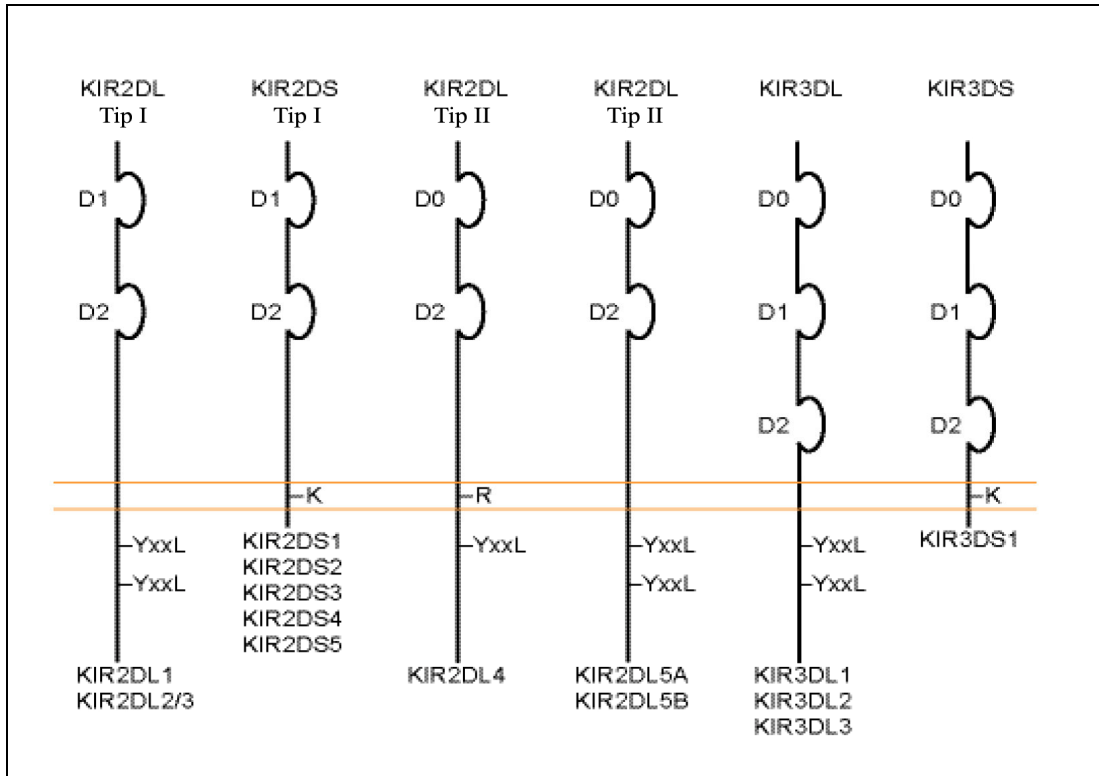
Kısa sitoplazmik kuyruğu olan KIR molekülleri ise aktivasyondan sorumludur. Aktivasyon sinyallerini adaptör proteinler aracılığı ile yaparlar. İmmün reseptör tirozin bazlı aktivasyon motifi (ITAM) barındıran adaptör proteinler aktivasyonda rol oynarlar. Kısa sitoplazmik kuyruğu olan KIR' lar adaptör protein olarak hücre zarına bağlı homodimerik DNAX aktive edici protein 12 kDa (DAP12, DNAX activating protein of 12 kDa) molekülünü kullanırlar. DAP12 19.kromozomda (19q13.4) lökosit reseptör kompleksinin sentromere yakın tarafında, LRC ile ilişkili gen bölgesinde kodlanmaktadır. Bu adaptör molekül aynı zamanda öldürücü hücre aktivatör reseptör ile ilişkili protein olarak da bilinir (KARAP-killer cell activating receptor-associated protein) (Carrington M. 2002). KIR molekülünün hücre zarı ile temas ettiği bölgedeki pozitif yüklü amino asit sayesinde gerçekleşen KIR molekülü ve adaptör protein DAP12 etkileşimi ile Syk tirozin kinazlar ve zeta (ζ) eşlikçi 70 kDa protein (ZAP70) sinyal yolu aktiflenir. Böylece hücrenin sitolitik aktivitesi artar (Carrington M. 2002, Middletona D. 2002) (Şekil 6). Hücre yüzeyinde inhibitör ve aktivatör KIR reseptörleri birlikte eksprese olmaktadır. Her iki reseptörün de sinyal aldığı durumlarda hücrenin inhibitör sinyaller doğrultusunda davrandığı, inhibitör sinyallerin aktivatör sinyallere göre daha baskın olduğu bildirilmiştir (Parham P. 2005).



Şekil 6. KIR inhibisyon ve aktivasyon sinyali – (Derek M. 2002' den değiştirilerek).

Bu isimlendirme sisteminin dışında ayrıca “Cluster of Differentiation (CD)” isimlendirme sistemi ile de isimlendirilmektedir. Bu sisteme göre KIR molekülleri “CD158” olarak tanımlanmışlardır. Alt gruplar ise harflerle ifade edilmektedirler. KIR2DL1 (CD158a), KIR2DL2 (CD158b1), KIR2DL3 (CD158b2), KIR2DL4 (CD158d), KIR2DL5 (CD158f), KIR3DL1 (CD158e1), KIR3DL2 (CD158k), KIR2DS1 (CD158h), KIR2DS2 (CD158j), KIR2DS3 (CD karşılığı yok), KIR2DS4 (CD158i), KIR2DS5 (CD158g), KIR3DS1 (CD158e2) olarak isimlendirilmektedir (Strtompeter S. et al. 2002). Ancak bu sistem yapısal ve fonksiyonel olarak bilgi vermediğinden monoklonal antikorların isimlendirilmesinde kullanılmaktadır (Hsu K.C. et al. 2002).

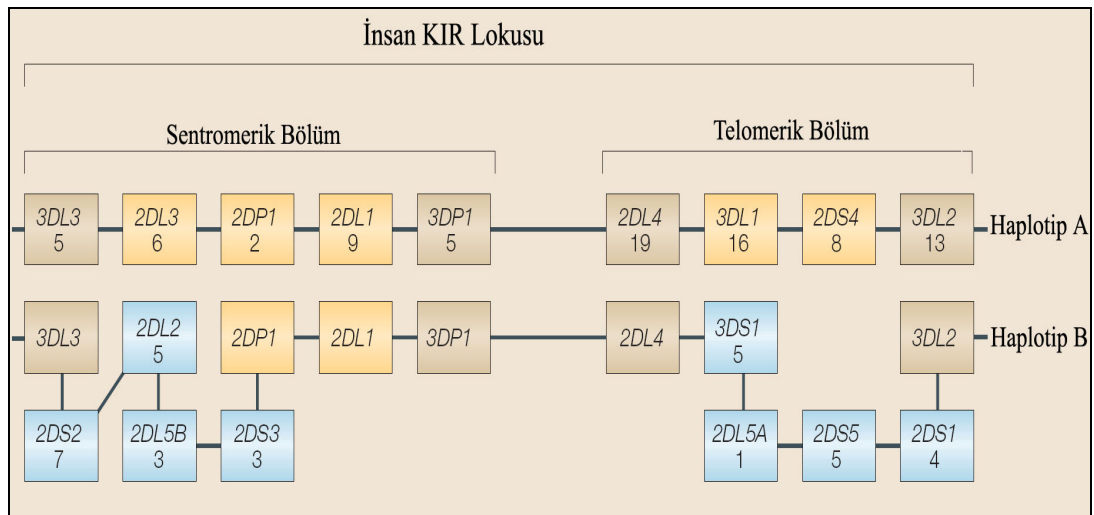
KIR molekülleri D0, D1 ve D2 olmak üzere 3 çeşit hücre dışı domain barındırabilmektedir. 2 tane hücre dışı domain içeren KIR reseptörlerinde D0 domainin bulundurmayanlar “tip 1”, D1 domaini bulundurmayan KIR reseptörleri ise “tip 2” olarak ayrılmaktadırlar (Carrington M. 2002) (Şekil 7).



Şekil 7. KIR Moleküllerinin Domain Yapıları (Carrington M. 2002, den değiştirilerek)

4.3.3.KIR haplotipleri

KIR genlerinin kromozom üzerindeki dizilimine göre; gen sayısı 7-12 arasında değişen Haplotip A ve Haplotip B olmak üzere başlıca 2 haplotipi belirlenmiştir. Her iki haplotipte de değişmeyen çatı bölgelerini oluşturan korunmuş genler bulunmaktadır. Bunlar 3DL3, 3DP1, 2DL4, 3DL2 genleridir. Bu genlerin dışında her iki haplotipte de bulunabilen genler de vardır. Bunlar: 2DP1 ve 2DL1' dir. Bu genlerin dışında haplotipler arasındaki fonksiyonel farkı belirleyen faktörler içerdikleri aktive edici gen sayısıdır. Haplotip A 2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DS4, 3DL1, 3DL2 ve 3DL3 gen allellerinden oluşurken Haplotip B' de bu genlere ek olarak 2DL2, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DS1 gen lokusları da vardır (Parham P. 2005) (Şekil 8).



Şekil 8. KIR haplotiplerini oluşturan gen içerikleri-Parham (2005)' den değiştirilerek

Her NK hücresi genomda bulunan tüm KIR genlerini eksprese etmez (Parham P. 2005). KIR genlerinin NK hücre yüzeyinde alt kümeler halinde eksprese olması, eksprese edilmeyecek genlerin DNA metilasyonu ile transkripsiyonlarının engellenmesiyle sabitlenir. Bölünen NK klonlarından türelenen yeni hücrelerde de aynı KIR genleri eksprese olmaktadır (Strtompeter S. et al. 2002).

4.4. KIR Ligandı Olan Klasik HLA Sınıf I Molekülleri

4.4.1.HLA-C1 ve HLA-C2 Grupları

KIR ligandı olarak tanımlanmış, MHK sınıf I molekülleri içerisindeki HLA-C molekülünün, ağır zincirindeki $\alpha 1$ heliksinde, 80. pozisyonda iki farklı aminoasit bulunabilir. Bunlar Lizin (Lys) ve Asparjin (Asn)' dir. 80. pozisyondaki Lys ya da Asn aminoasitlerinin varlığına göre HLA-C molekülleri C1 ve C2 olmak üzere 2 gruba ayrılırlar (Middleton D. 2002, Parham P. 2005) (Tablo 2). HLA molekülü ve KIR reseptör etkileşimi tek aminoasit değişimine karşı oldukça hassastır. HLA-C molekülünün $\alpha 1$ zincirindeki bu özellik dolayısıyla KIR reseptörlerin, hücre dışı domain yapısında da farklılıklar mevcuttur. KIR2DL2 ve KIR2DL3 moleküllerinin D1 domaininin 44. pozisyonundaki aminoasit Lys iken, KIR2DL1 molekülünün D1 domainindeki 44. Pozisyondaki aminoasit Metionindir (Met). KIR2DL2, MHK-C1 grubu moleküllere bağlanırken (Lys44-Asn80), KIR2DL1 ise MHK-C2 grubu moleküllere bağlanabilmektedir (meth44-Lys80). Yapılan çalışmalarda HLA-C1/KIR reseptör etkileşiminin; HLA-C2/KIR reseptör etkileşiminden daha zayıf olduğu sonucuna varılmıştır (Parham P. 2005). Bunun yanında KIR2D ve HLA-C bağlanma çalışmalarında, C1 ve C2 alt gruplarının KIR reseptörlerine bağlanmasında yüzeydeki diğer reseptörlerin gerekli olmadığı bildirilmiştir (Natarajan K. 2002). HLA-C molekülünün, ağır zincirindeki $\alpha 1$ heliksinde, 80. Pozisyonda Lys bulunması HLA-C' yi aynı pozisyonda Asn bulunduran HLA-B ve diğer MHK sınıf I moleküllerinden ayırmaktadır (Parham P. 2005).

Tablo 2. HLA-C molekülünün ağır zincirindeki α heliksindeki amino asit farkına göre C1 ve C2 grupları ((Derek M. 2002' den değiştirilerek).

MHK-C1 GRUBU	MHK-C2 GRUBU
HLA-Cw *01	HLA-Cw*02
HLA-Cw *03 (0307/15 hariç)	HLA-Cw *0307/15
HLA-Cw *0411	HLA-Cw *04 (0411 hariç)
HLA-Cw *0611	HLA-Cw *05
HLA-Cw *07 (0707/09 hariç)	HLA-Cw *06 (0611 hariç)
HLA-Cw *08 (0810 hariç)	HLA-Cw *0707/09
HLA-Cw *12 (1204/05/09 hariç)	HLA-Cw *0810
HLA-Cw *14	HLA-Cw *1204/05/09
HLA-Cw *1507	HLA-Cw *15 (1507 hariç)
HLA-Cw *1601/04/06	HLA-Cw *1602
	HLA-Cw *17
	HLA-Cw *18

4.5.Hamilelik ve İmmünite

Hamilelikte anneye ve fetusa ait immün sistemin yeterli ve doğru çalışması fetusun yaşamını devam ettirebilmesi için çok önemlidir. İlk başlarda fetus, izole durumda steril bir çevrede gelişir ve fetus için immün sistem çok gerekli değildir. Ancak hamileliğin ilerleyen dönemlerinde anneye ait immün sistemdeki değişikliklerle birlikte fetus immün sisteminin de farklılaşması, gebeliğin sağlıklı gelişimi için gereklidir (Tillery A. et al. 2006).

Hamilelik sürecinde maternal immün cevap çeşitli faktörlerin etkisiyle baskılanmaktadır. Bu baskılanma hem hücresel hem de humoral immün sistemde gözlenmektedir. Hamile bayanlarda timusun dramatik olarak değişime uğradığı, timus korteksinin büzülüp, medullanın büyüdüğü bilinmektedir. Gebeliğin sonunda, timus ağırlığı ve timosit sayısı belirgin biçimde azalır. Timustaki bu gerilemenin çeşitli hormonlar kontrolünde olduğu, laktasyon durunca timusun hızla normale döndüğü görülmüştür. Bu değişimlerin paternal ya da fetal antijenlere karşı potansiyel reaktif klonların delesyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir(Clarke A.G. et al. 1994). Timustaki bu değişime rağmen hamilelikte periferik kanda maternal T hücre, T hücre alt grup sayısı ve B hücre sayısının değişmediği birçok

araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Buna karşın T hücre fonksiyonunda azalma görülebilmektedir (Tillery A. et al. 2006). Th1 ve Th2 sitokin dengesi incelendiğinde ise Th1 sitokin profilinin gebelik süresince baskılandığı ve dengenin Th2 yönüne kaydığı görülür. Hamile bayanlarda Th1/Th2 sitokin oranı belirgin biçimde düşüktür ve bu oran, doğumdan sonra da bir süre devam eder(Moncayo H. et al. 1994). Th1/Th2 sitokin oranında Th2 sitokinlerinin baskınlığı özellikle fetoplental çevrede belirgindir. Desidual Th1 hücrelerinin azalması, Fas-FasL aracılığı ile oluşan apoptoz ile ilişkilendirilmiştir (Reinhard G. et al. 1998). Trofoblastik hücreler CD95L sentezlemektedirler. Bu şekilde trofoblastlar, tehlike yaratabilecek T hücrelerini apoptoza yönlendirerek elimine ederler(Theillin et al. 2000). TNF- α yapımı gebelik süresince artsa bile, sitokin, sinsityotrofoblastlar tarafından sentezlenen salgısal TNF- α reseptörleri ile nötralize edilebilir (Lin H. et al. 1993). Hamilelikte dengenin Th2 yönüne kayması fetusa karşı geliştirilen tolerans ile ilişkilendirilmektedir. Bazı araştırmacılar da hamilelikte immün sistemin baskılanmasının patojen istilası için bir fırsat olabileceğini, böyle bir durumun da türün geleceğini riske atacağını söylemişlerdir. Aslında gebelikte immün sistemin baskılanmadığı, hamile bayanlardaki birçok hücrenin hamile olmayan bayanlar ile aynı sayı ve fonksiyonda olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın hamilelikte NK hücre fonksiyonu, özellikle sitotoksik kapasiteleri ve IFN- γ sentez kapasiteleri azalmaktadır (Tillery A. et al. 2006).

4.5.1. Allograft olarak fetus

Fetus immnojeniktir ve gebeliğin 12. haftasında fetal HLA Sınıf II antijenleri belirirler. Yarı antijen yapısı babaya ait (paternal) olduğu için fetusa, esas itibariyle bir semi-allograft'tır. Ancak aralarında yüzeyel bir organ-graft benzerliği bulunsa bile semi-allogenik plasenta ve maternal uterus arasındaki ilişkiler, transplantasyon biyolojisinde geçerli kurallara göre yönetilemez. İmplantasyon, fetustan köken almış yabancı hücrelerin belli lde maternal dokulara invazyonunu gerektirmektedir. Gebeliğin oluşması ve güvenle sürmesi, aslında fetal ve paternal antijenlere karşı immün tepkisizliği değil, tam tersine maternal bir immün tepkinin doğmasını gerekli kılmaktadır. Anne ve babanın MHK yakınlığının fazla olduğu durumlarda tekrarlayan spontan düşüklerin sayısının arttığına yönelik bazı raporlar da bir immün

aktivasyonun gerekliliği hipotezini desteklemektedir. Bu çalışmalarda kadınlar, babanın MHK antijenleri (lenfositleri) ile aşıldıkları taktirde, anti-paternal antikörlerin olduğu ve düşüklerin önlenemediği iddia edilmektedir(Yaşar B. 2006).

Hamilelikte fetusa karşı maternal bir immün tepki vardır ve bu tepki 12. haftadan itibaren artan titrede anti-paternal HLA antikörlerinin ve paternal antijenlere karşı maternal sitotoksik T hücre cevabının gelişmesi olarak açıkça belirir. Ancak fetal/paternal antijenlere karşı immün cevabı düzenleyen mekanizmalar fetusun yaşamı için önemlidir. Fetusun sağlıklı gelişimi, maternal immün sistemin baskılanmasından ziyade, farklı tolerojenik mekanizmaların varlığı ile açıklanmaya çalışılmaktadır (Tillery A. et al. 2006).

4.5.2.Plasenta

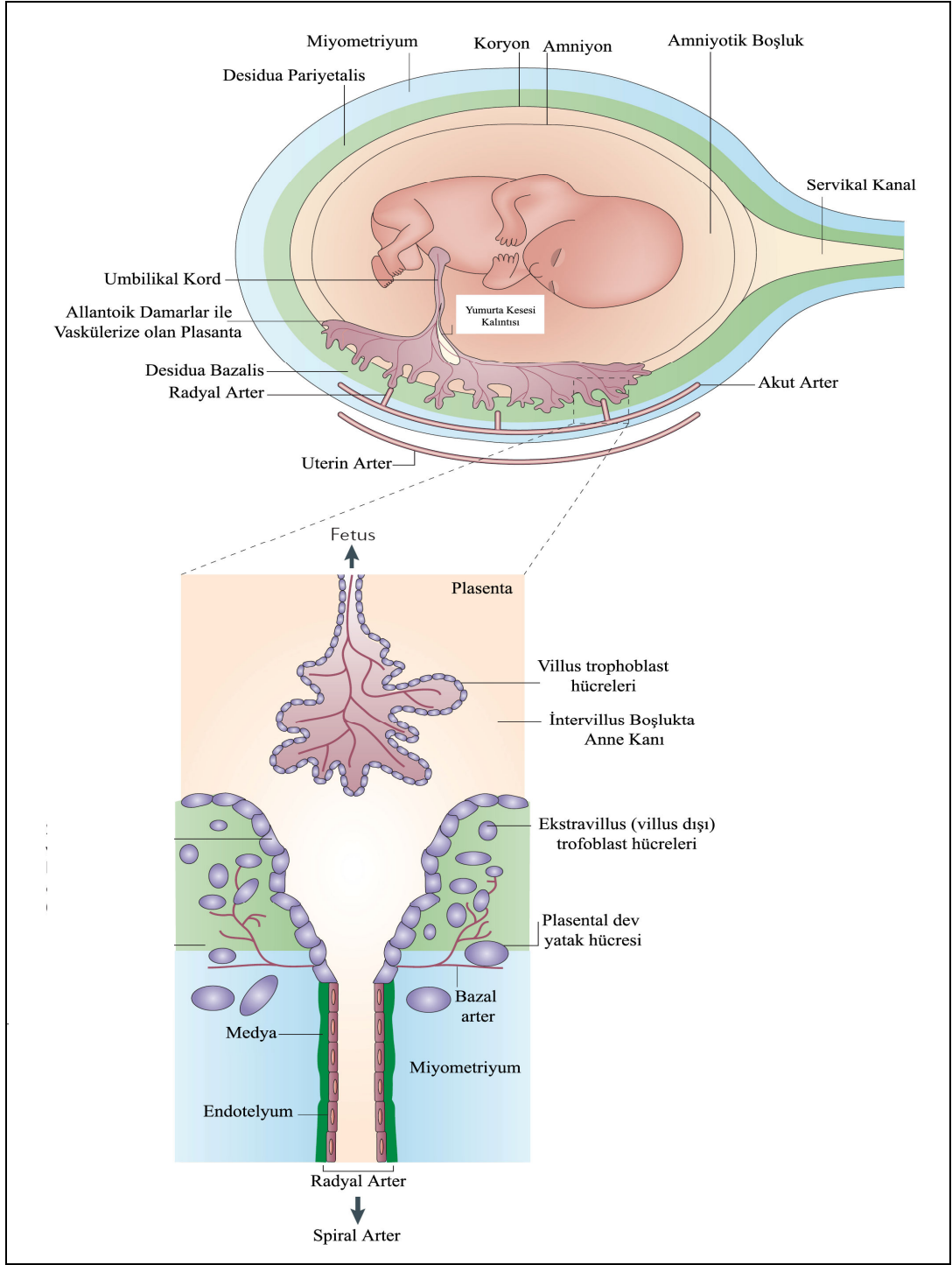
Plasentaya, gebelikteki fizyolojik aktiviteleri düzenleyen bir immün organ gibi değerlendirilebilir. Plasenta, anne ve fetus arasındaki besleyici maddeler ve gaz değişiminin yapıldığı başlıca yerdir. Plasenta iki elemanı bulunan, anne ve fetusa ait bir organdır. Koryon kesesinden gelişen bir fetal kısım ve endometriyumdan köken alan bir maternal kısmı vardır.

4.5.2.1.Plasenta'nın gelişimi

Sperm oosite girdikten sonra, spermin başı kuyruktan ayrılır ve erkek pronukleusu oluşturmak için genişler. Fertilizasyon, pronukleusların birleşmesi ve zigotun ilk mitotik bölünmesinin metafazında anne-babadan gelen kromozomların birbirine karışması ile tamamlanır. Zigot uterin tüpler boyunca uterusu giderken bir seri mitotik hücre bölünmesi başlar ve blastomer adı verilen boyut olarak küçük bir dizi hücre oluşur. Fertilizasyondan yaklaşık 3 gün sonra 12 ya da daha fazla blastomerin oluşturduğu hücre yumağı olan morula uterusu girer. Morulanın uterusu girmesinden kısa bir süre sonra yaklaşık olarak fertilizasyondan 4 gün sonra, morula içinde sıvıyla dolu bir boşluk görülür, buna blastosist boşluğu ya da blastosel denir (Veeck L.L. 1991).

Uterustan gelen sıvı zona pelusidayı geçerek bu boşlukları oluşturur. Blastosist boşluğunda sıvı arttıkça, blastomerleri iki bölüme ayırır. İnce dış tabaka trofoblast adını alır ve plasentanın embriyonik kısmını oluşturur. Merkezi yerleşim gösteren bir grup blastomer embriyonun başlangıcı olması nedeniyle genellikle embriyoblast adını alır.

Gelişimin bu basamağındaki oluşuma blastosist denir. Blastosist endometrial epitele tutunduktan hemen sonra, trofoblastlar hızla çoğalmaya başlar ve yavaş yavaş iki farklı tabakaya ayrılırlar. Bu tabakalar sitotrofoblast ve sinsityotrofoblasttır. İç tabaka hücresel trofoblastlar sitotrofoblastlar olarak adlandırılır. Hücre sınırı gözlenmeyen çok çekirdekli protoplazmik bir kitle ile oluşan dış tabaka ise sinsisyal trofoblast (sinsityotrofoblast) olarak adlandırılır. Sinsityotrofoblastın parmağa benzer çıkıntıları yaklaşık olarak 6. günde endometrial epitele doğru uzanır ve bağ dokusu içinde ilerler. İkinci haftanın sonunda Sitotrofoblast hücrelerinin proliferasyonu ile Sinsityotrofoblast içerisine doğru büyüyen hücresel genişlemeler ile primer koryonik villuslar oluşturulur. Plasentanın anneye ait kısmı ise, desidua bazalis tarafından oluşturulur (Şekil 9). Dördüncü ayın sonunda desidua bazalis, hemen hemen tümüyle yerini plasentanın fetal kısmına bırakır.



Şekil 9. İnsan plasenta oluşumu (Moffett A. Loke C. 2006' dan değiştirilerek).

Desidua, gebe endometriumuna karşılık gelir, hamile bir kadındaki fonksiyonel endometrium tabakasıdır. İmplantasyon bölgesiyle ilişkisine göre desidua, üç tabaka halinde isimlendirilir:

1. Desidua bazalis, gebelik materyalinin (embriyo) dip kısmındaki anneye ait plasentayı oluşturan desidua tabakasıdır.
2. Desidua kapsülaris, gebelik materyalini kuşatan desiduanın yüzeysel tabakasıdır.
3. Desidua pariyetalis (desidua vera) ise geriye kalan desidua tabakasıdır (Aplin J.D. 1991).

Sinsisyotrofoblastların bulunduğu koryon zarı yakınındaki pek çok desidua hücresi dejenere olur ve anne kanı ve uterus salgılarıyla birlikte embriyonun beslenmesi için zengin bir kaynak sağlar. Desidua hücrelerinin önemi tam olarak anlaşılmasa da bu hücrelerin sinsisyotrofoblastların kontrol edilemeyen saldırılarına karşı anneye ait dokuları korudukları ve hormon yapımıyla ilgili oldukları ileri sürülmektedir (Löke Y.W. et al. 1995).

4.5.2.2.Semi-Allograft olarak plasenta

Koryonik kese plasentanın bir kısmını oluşturduğundan, hem babaya hem de anneye ait genlerin geçtiği, embriyoyu ve embriyo dışındaki yapıları oluşturacak dokular, anne tarafından uterus içerisinde bir allograft olarak algılanabilir. Kan sinusoidleri içerisinde maternal immün hücrelere maruz kalmasına rağmen, yüzen koryonik villusların sinsisyotrofoblast hücrelerinde MHK antijenlerinin bulunmayışı, red cevabını uyandırmaz (Faulk W.P. et al., 1976). Bununla beraber bağlı villusları oluşturan ve uterin desidual dokuyu invaze eden ekstrasvillöz sitotrofoblast hücreleri MHK sınıf I antijenlerini (HLA-G) ekspresse etmektedir. Bu hücreler desidua içerisinde maternal T lenfositler ve NK hücrelerine maruz kalmaktadır ve bu nedenle immün saldırının potansiyel olarak hedefidir (Ian L. et al., 2006). Bu hücrelerin korunmasının en az iki mekanizma yoluyla gerçekleştirildiğine inanılmaktadır.

Birincisi desidual hücrelerin, desidua içerisinde T ve NK hücrelerinin aktivasyonunu önleyen prostaglandinler E2 gibi aktif immüsupressör molekülleri lokal olarak üretmeleridir (Parhar R.S. et al. 1989).

İkincisi ise, ekstravillus trofoblast hücrelerindeki MHK sınıf I antijenlerinin ekspresyonudur. Ekstravillus trofoblast hücrelerinde ekspresse olan, klasik olmayan MHK sınıf I antijenlerinden HLAG' nin nonpolimorfik yapısı ve NK hücre inhibitör reseptörleriyle olan etkileşimleri bu hücreleri maternal immün cevaptan koruyan faktörlerdendir.

Plasental trofoblast hücreleri yüzeylerinde Sınıf II MHK molekülleri bulundurmazlar. İnsan vücudundaki tüm diğer hücrelerden farklı olarak, trofoblast hücrelerinin yüzeyinde klasik Sınıf I MHK transplantasyon antijenlerinden HLA-A ve HLA-B bulunmaz. Bunun yerine, plasental hücrelerin bir alt grubunun, özellikle villus dışı sitotroblastik (ekstravillus sitotroblast) hücrelerin yüzeyinde klasik Sınıf I-MHK ürünü olan HLA-C ve klasik olmayan MHK sınıf I antijenlerinden HLA-E ve G bulunurlar (Ian L. et al., 2006). İmmün sistemde NK hücreleri yüzeylerinde MHK olmayan hücreleri tanıyıp sitotoksik aktivite ile bu hücreleri elimine ederler (Lewis L. et al. 2005, Vinay K. et al. 2005). Trofoblast hücrelerinin yüzeyinde hiçbir MHK molekülünün bulunmaması bu hücreleri implantasyon bölgesinin her tarafında yaygın olarak bulunan NK hücrelerinin hedefi haline getirecektir. Trofoblast hücrelerinin yüzeyindeki HLA-C, -E ve -G, NK hücreleri aracılığıyla doğrudan öldürülmeden korunmaya ek olarak, NK hücre fonksiyonlarını inhibe edici reseptör etkileşimleriyle maternal immün cevabı baskılayıcı ya da toleransı artırıcı rollere de sahip olabilirler (Ian L. et al., 2006).

4.5.3.Spontan abortus

1977 yılından önce düşük, 28. haftadan önce sonlanan gebelikler için kullanılan bir tanım iken; 1977 yılında Dünya Sağlık Teşkilatı, gebelik ürününün ağırlığı ve gebelik sürecini kriter alarak yeni bir abortus tanımı getirmiştir. Bu tanıma göre; 20. gebelik haftasından önce, 500 gramdan daha az embriyo veya fetus ve eklerinin, tamamının ya da bir kısmının uterus kavitesi dışına atılması olayına abortus denilmektedir (Boztosun A. et al. 2004). Spontan abortuslar mekanik ya da

farmakolojik müdahale ve zorlama olmadan gebeliğin 20. gebelik haftasından önce sonlanmasıdır. Kadın yaşı arttıkça spontan abortus riski artmaktadır. Klinik olarak saptanmış gebeliği olan 20 yaşından küçük kadınlarda spontan düşük oranı %12 iken 40 yaşın üzerindeki kadınlarda bu oran %26 olarak tespit edilmiştir (Harlap S. et al. 1980).

Spontan abortuslar, etyolojilerindeki farklılık nedeniyle, sporadik spontan abortuslar ve rekürrent spontan abortus (RSA)' lar şeklinde iki başlık altında incelenmektedir. RSA; son menstrasyon tarihinden itibaren 20 haftadan önce klinik olarak fark edilmiş üç veya daha fazla gebelik kaybına denir. Son yıllarda iki abortusu olan olgular da bu sınıflamaya alınmaktadır (Boztosun A. et al. 2004). Etiyolojide anatomik anomaliler %12–16, endokrinolojik sorunlar %17–20, enfeksiyonlar %0.5–5, antifosfolipid antikor sendromu (APAS) dahil immünolojik faktörler %20–50 oranında tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili bulunmuştur. Tam bir değerlendirmeden sonra bile vakaların yaklaşık yarısında olası bir neden bulunamaz (Stephenson M.D. 1996). RSA sebepleri; genetik, endokrinolojik, anatomik, immünolojik, mikrobiyolojik ve kişisel sebepler olarak sınıflandırılabilir (Boztosun A. et al. 2004).

Maternal lenfositlere fetal antijen sunumunun olmayışı ve NK hücre fonksiyonundaki azalma, araştırmacıları MHK molekülleri ve KIR reseptörlerinin hamilelikteki önemini araştırmaya yönlendirmiştir. Çeşitli gruplar, MHK genlerinin ya da moleküllerinin tekrarlayan düşüklere rol oynadığını ileri sürmüşlerdir (McIntyre J.A. et al. 1983-Johnson P.M. et al. 1988-Wagenknecht D.R. et al. 1997-Sbracia M. et al. 1996). Bazı araştırmacılar, eşler arasındaki HLA uyum artışının, trofoblastlarda immün tanınmanın bozulmasına neden olduğunu ve düşüklere meydana geldiğini düşünmüşlerdir. Ancak HLA uyumunun artmasının düşüklere neden olduğu net olarak gösterilememiştir (Kruse C. 2004). KIR gen repertuarları incelendiğinde; sağlıklı doğum yapan kontrol grubundaki bayanlara göre, tekrarlayan düşük yapan bayanlardaki inhibitör KIR genlerinin, daha az olduğu görülmüştür (Varla-Leftherioti M. 2003). Bazı araştırmalar bu verileri desteklemekle birlikte; özellikle inhibitör KIR reseptörlerinden KIR2DL2' nin tekrarlayan düşük yapan bayanlarda, kontrollere göre daha düşük olduğunu bildirmiş ve KIR haplotipleri ile

HLA-C' nin C1 ve C2 alt grup etkileşimlerinin önemine dikkat çekilmiştir (Flores A.C. 2007, Sharkey A.M. et al. 2008).

Bu tez çalışmasında eşler arasındaki doku grubu benzerlikleri/farkları ile sebebi belirlenemeyen düşükler arasındaki ilişkinin; ayrıca KIR ile HLA arası ilişkinin hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1.Hasta Seçimi

Çalışma grubundaki hastalar Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Memorial Hastanesi İn-vitro Fertilizasyon (IVF), Androloji ve Genetik Bölümü hastalarından seçilmiştir. Kliniklere tekrarlayan düşük nedeniyle başvuran, en az 3 en fazla 6 düşük yapmış, hiç başarılı gebelik sonlanımı olmayan eşlerde çalışmaya katılma koşulları; servikal mukus kültürünün (Chlamydia/Ureaplasma) negatifliği; karyotip analizlerinin normal olması; Hiperprolaktinemi/Hiperandrojenemi gibi hormonal anomaliler olmaması; diyabet, hiper- ya da hipotiroidi gibi endokrin bir hastalığın olmaması; Anti Nükleer Antikor ve/veya anti-Kardiyolipin otoantikörlerinin negatifliği; ve semen analizlerinin normal olmasıdır. Çalışma, klinik seçimleri yukarıdaki kriterlere göre tamamlanmış ve tekrarlayan düşükleri yukarıdaki olası nedenlerden hiçbiri ile açıklanamadığı için RSA olarak tanımlanan 32 çiftte gerçekleştirilmiştir.

Hastanemize 1996-2006 yılları arasında transplantasyon donörü olarak başvuran, toplam 1306 sağlıklı bireyin HLA tiplmesi çalışma grubumuza kontrol olarak kullanılmıştır.

5.2. DNA İzolasyonu

RSA tanısı konmuş 32 çiftten toplam 64 DNA, silika boncuk temelli yöntem ile izole edilmiştir. DNA izolasyonu için hastaların ve sağlıklı kontrollerin ön kol venlerinden EDTA' lı tüplere alınan 5 ml venöz kan steril 15 ml' lik Falcon tüplerine aktarıldıktan sonra üzerine 10 ml eritrosit parçalayıcı tampon olan amonyum bazlı bir lizat solusyonu (0.155M NH₄CL, 0.01M KHCO₃, 0.127M EDTA) ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. 800 rpm'de, 10 dakika santrifüj edilerek çekirdekli hücrelerin dibe çökmesi sağlanmış, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra peletin üzerine 10-12 ml serum fizyolojik eklenecek şekilde oda ısısında 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra pelet DNase RNase free ependorflara transfer edilmiştir. Üzerlerine 1ml silika

bazlı solüsyon olan Guanidin Solüsyonu I eklenmiş, vorteks yardımıyla karıştırılarak oda sıcaklığında en az 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tekrar vortekslenerek ependorf santrifüjünde 10000 rpm' de 5 saniye santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra peletin üzerine 1 ml Guanidin Solüsyonu II eklenmiştir. Vorteks ile çökelti dağıtılmış ve 10000 rpm' de 5 saniye santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra yıkama işlemi için peletin üzerine 1 ml Propanol Yıkama Solüsyonu eklenerek vorteks yardımıyla çökelti dağıtılmış, 10000 rpm' de 5 saniye santrifüj edilmiştir. Bu işlem de 2 kez tekrarlanmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış, peletin üzerine 1 ml etanol eklenmiş, vortekslendikten sonra 10000 rpm' de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra ependorflar kurutma kağıdının üzerine ters çevrilerek konmuş ve 15 dakika etanolün uçması beklenmiştir. Etanolün uçması bittikten sonra peletin üzerine 200 µl steril distile su eklenmiş vortekslenerek 65°C' de 10 dakika inkübe edilmiş DNA' nın silikadan uzaklaşması sağlanmıştır. İnkübasyon sonrasında 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş, daha sonra DNA'yı barındıran süpernatant, dikkatlice steril DNase RNase free ependorfa alınmıştır.

İzole edilen DNA' lar %1,8 veya %2' lik agaroz jelde yürütülerek saflık dereceleri değerlendirilmiştir. Agoroz jel' de 1 ng' a kadar DNA izlenebilir. Ancak genelde µg seviyesinde kullanılır. Yükleme tamponu şeker ve boya (bromfenol blue) içermektedir. DNA / Yükleme Tamponu oranı 1/1 veya 2/1 olarak belirlenmiştir. Örnekler eksi (-)' den artı (+)' ya doğru yerleştirilmiş, yürütme tamponu (1X TBE) jelin üstünü örtecek miktarda hazırlanmıştır. 5 dakika 150 volt' ta elektroforez yapıldıktan sonra ultraviyole (UV) ışığın altında kuyucuklarda DNA kırmızı bir çizgi olarak belirlenmiştir. DNA elde edildiğinden emin olunduktan sonra dilüsyon oranları belirlenmiş, ependorflar etiketlenerek -20°C'lik derin dondurucuya kaldırılmıştır.

5.3. HLA Doku Grubu Tiplendirilmesi

Bireylerdeki HLA-A, B, C, DR, DQ doku grubu tiplendirilmesi PCR-SSP (polimeraz zincir reaksiyonu-diziye özgü primer) ile belirlenmiştir. Doku Grubu tiplemesi için, Marmara Üniversitesi Hastanesi Hematoloji-İmmünoloji Laboratuvarı'nda rutin olarak kullanılmakta olan, One Lambda firmasına ait "Micro SSP Generic/Allele Specific HLA Class I and Class II DNA Typing" test kitleri kullanılmıştır.

PCR için kullanılan amplifikasyon programı 3 aşamalı olarak uygulanmıştır. İlk aşamada 96 ° C 130 saniye, 63 ° C de 60 saniye 1 döngü; ikinci aşamada 96 ° C 10 saniye, 63 ° C de 60 saniye 9 döngü; son aşamada 96 ° C 10 saniye, 59 ° C da 50 saniye, 72 ° C 30 saniye 20 döngü yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri, etidyum bromür (EtBr) ilave edilmiş %2,5'lik agaroz jele yüklenerek, elektroforez tankında 150kV akım altında 4 dakika yürütülerek, UV transillüminatörü ile görüntülenmiştir.

Sonuçlar değerlendirme şablonları ve One Lambda DNA/LMT Software Version 3.98 20060811a programı ile değerlendirilmiştir.

5.4. KIR Allellerinin Belirlenmesi

Bireylerdeki KIR allel polimorfizmini saptamak için, PCR-SSO ve boncuk (polimeraz zincir reaksiyonu-diziye özgü oligonükleotid) temelli bir kit kullanılmıştır (One Lambda Inc, CA, ABD). SSO ile saptanan belli başlı KIR allelleri ve NK hücreleri üzerindeki fonksiyonları Tablo 3' te gösterilmiştir.

Tablo 3. SSO ile saptanan belli başlı KIR allelleri ve fonksiyonları.

KIR Alleli	Fonksiyonu
KIR2DL1	inhibitör
KIR2DL2	inhibitör
KIR2DL3	inhibitör
KIR2DL4	inhibitör
KIR2DL5	inhibitör
KIR2DP	(-)
KIR2DS1	aktivatör
KIR2DS2	aktivatör
KIR2DS3	aktivatör
KIR2DS4	aktivatör
KIR2DS5	aktivatör
KIR3DL1	inhibitör
KIR3DL2	inhibitör
KIR3DL3	inhibitör
KIR3DP1	(-)
KIR3DS1	aktivatör

PCR için kullanılan amplifikasyon programı 4 aşamalı olarak uygulanmıştır. İlk aşama 96⁰C de 180 saniye 1 döngü, ikinci aşama 96⁰C 20 saniye, 60⁰C 20 saniye, 72⁰C 20 saniye 5 döngü, üçüncü aşama 96⁰C 10 saniye, 60⁰C 15 saniye, 72⁰C 20 saniye 30 döngü, dördüncü aşamada 72⁰C 10 dakika 1 döngü yapıldıktan sonra, PCR işlemi +4⁰ C’de sonlanmıştır.

Amplifikasyon ile ekzon 3, ekzon 5, ekzon 7, ekzon 9 bölgeleri çoğaltılmıştır.

Sonuçlar “Luminex XY Platform” ve “Luminex Data Collector Software/HLA Visual Software 2.2.0” ve ayrıca değerlendirme şablonları ile değerlendirilmiştir.

5.5. İstatistiksel Analizler

Sonuçlar, gereksinime göre Fisher’in kesin Ki-kare testi ile ve/veya Pearson-rank korelasyon analizi ile test edilmiş (SPSS 14.0 veya GraphPad programları deneme versiyonları kullanılarak) ve p değeri 0.05’in altında olan analizler anlamlı olarak değerlendirmeye alınmıştır.

6. BULGULAR

6.1. RSA Hastalarında HLA Doku Grubu Dağılımları

RSA tanısı konmuş bayanlarda ve eşlerinde HLA-A/-B/-C ve HLA-DR/-DQ doku grupları incelenmiş ve en sık rastlanan üç allel belirlenmiştir.

6.1.1.RSA' lı Bayanlarda En Sık Rastlanan HLA Allelleri

RSA tanısı konmuş bayanlarda en sık rastlanan HLA allelleri HLA-A*02 (%20,3), HLA-B*35 (%26,6), HLA-Cw*04 (%23,2), HLA-DR*04 (%18,8), HLA-DQ*03(%44,4) olarak bulunmuştur (Tablo 4).

Tablo 4. RSA' lı bayanlarda en sık rastlanan ilk üç HLA alleli

HLA A Alleli	Yüzde (%)
A*02	20,3
A*03	17,2
A*24	14,1
HLA B Alleli	Yüzde (%)
B*35	26,6
B*51	14,1
B*49	9,4
HLA Cw Alleli	Yüzde (%)
Cw*04	23,2
Cw*07/Cw*12	16,1
Cw*06	10,7
HLA DRB1 Alleli	Yüzde (%)
DRB1*04	18,8
DRB1*11/*13	15,6
DRB1*01	12,5
HLA DQ Alleli	Yüzde (%)
DQ*03	44,4
DQ*05	20,4
DQ*06	16,7

6.1.2.RSA' lı Erkeklerde En Sık Rastlanan HLA Allelleri

RSA tanısı konmuş bayanların eşlerinde en sık rastlanan HLA allelleri HLA-A*02 (%23,4), HLA-B*11 (%17,7), HLA-Cw*07 (%35), HLA-DR*11 (%23,4), HLA-DQ*03(%31) olarak bulunmuştur (Tablo 5).

Tablo 5. RSA' lı erkeklerde en sık rastlanan ilk 3 HLA alleli

HLA A Alleli	Yüzde (%)
A*02	23,4
A*24	21,9
A*03	12,5
HLA B Alleli	Yüzde (%)
B*51	17,7
B*44	16,1
B*35	11,3
HLA Cw Alleli	Yüzde (%)
Cw*07	35
Cw*06	18,5
Cw*04	13,3
HLA DRB1 Alleli	Yüzde (%)
DRB1*11	23,4
DRB1*01/03/7/16	10,9
DRB1*13	9,4
HLA DQB1 Alleli	Yüzde (%)
DQ*03	31
DQ*02/DQ*05	24,1
DQ*06	12,1

6.1.3.En Sık Rastlanan HLA Allellerinin Karşılaştırması

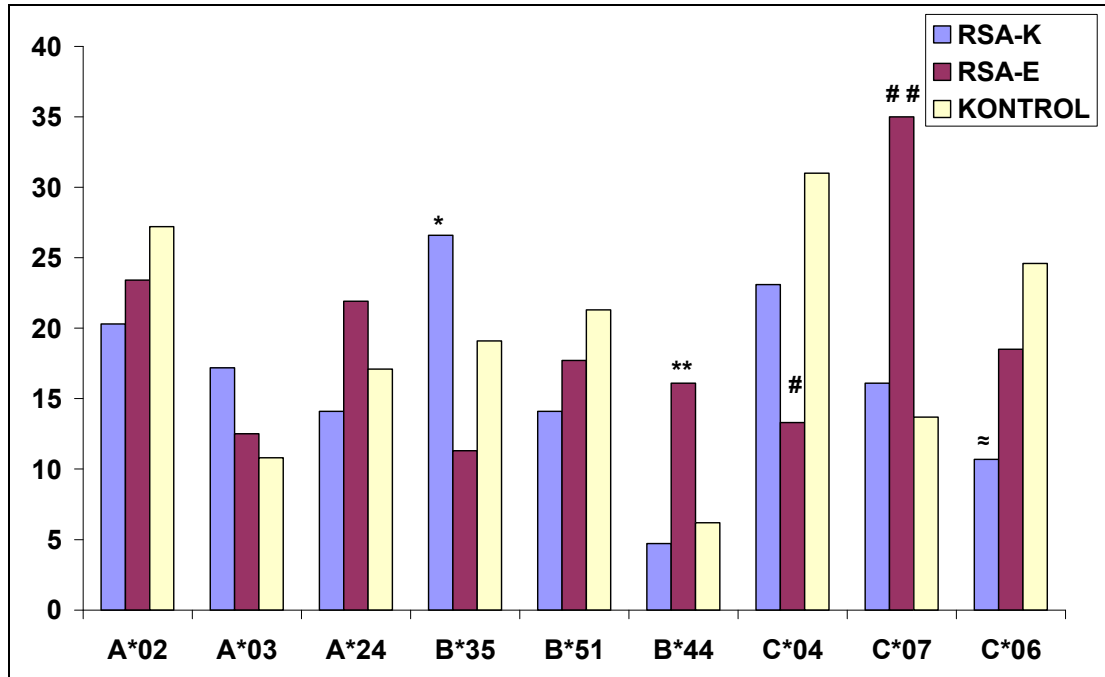
RSA'lı bayanların ve eşlerinin sık rastlanan HLA Sınıf I ve II doku grupları Marmara Üniversitesi Hematoloji-İmmünoloji Laboratuvarında 1996-2006 yılları arasında 1306 kişide çalışılan ve Türk popülasyondaki sağlıklı bireylerdeki dağılımları gösteren verilerle (Elbaşı M.O. ark., 2007) karşılaştırılmıştır (Şekil 10).

Sınıf I allelleri karşılaştırmasında en sık rastlanan HLA-A allelleri arasında, kadın, erkek ve kontrol grubu arasında bir fark saptanmadı. Böylece RSA'lı kadın ve

erkeklerin HLA-A dağılımlarının Türk toplumundaki genel HLA-A dağılımına sahip oldukları gösterilmiş oldu.

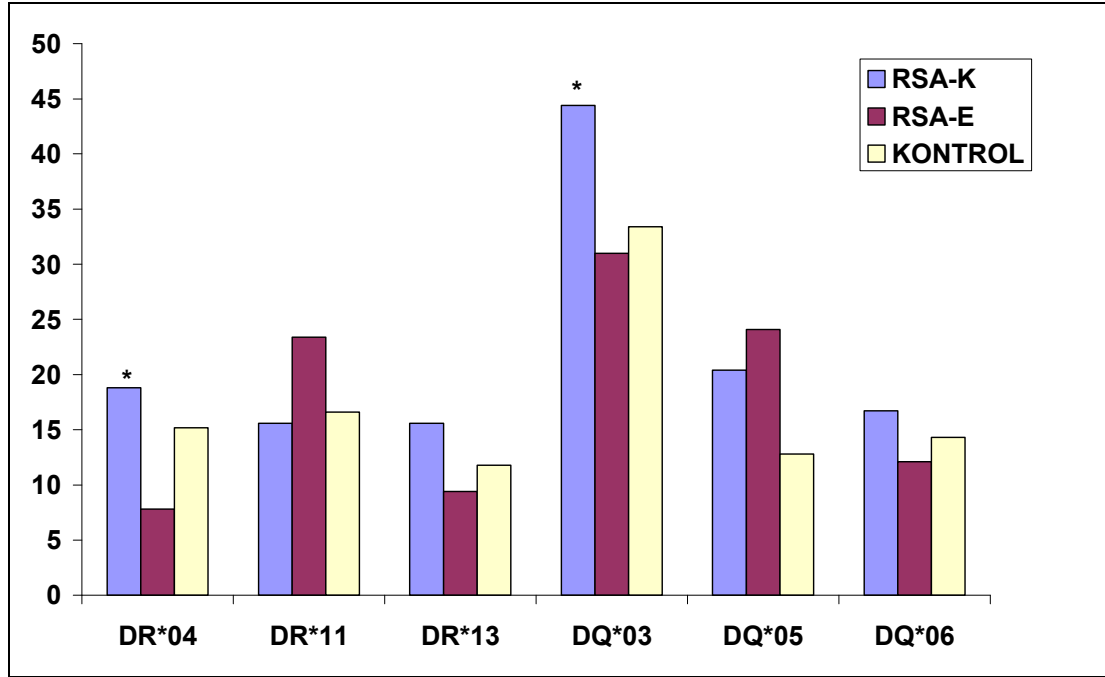
Gruplar arasında HLA-B allellerinin dağılımının analizinde, RSA grubundaki kadınlarda HLA-B35, RSA grubundaki erkeklerden daha sık ($p<0.05$) olarak rastlanmasına rağmen genel populasyon dağılımı ile karşılaştırıldığında yine Türk toplumu içindeki genel HLA-B35 dağılımı içinde yer aldığı gösterildi. Erkeklerde HLA-B-44 sıklığının hem RSA'lı kadınlardan hem de genel dağılımdaki HLA-B44 sıklığından daha yüksek olduğu bulundu ($p=0.005$).

HLA-C allellerinin karşılaştırmasında; Türk toplumunda en sık rastlanan Cw4 allelinin, RSA'lı erkeklerde düşük sıklıkta olduğu saptandı ($p=0.005$). Erkeklerde Cw*07 allel sıklığının ise her iki gruba göre ileri derecede yüksek olduğu gösterildi ($p=0.001$). Cw*06 allelinin ise RSA'lı kadınlarda genel popülasyona göre düşük sıklıkta olduğu bulundu ($p=0.01$).



Şekil 10. RSA'lı bayanlarda(RSA-K), RSA'lı Erkeklerde (RSA-E) ve sağlıklı kontrollerde en sık rastlanan HLA-Sınıf I allellerinin karşılaştırması. * $p<0.05$ (RSA Kadın-RSA Erkek) ** $p=0.005$ (RSA Erkek-RSA kadın-Kontrol), # $p=0.005$ (RSA Erkek-Kontrol), ## $p=0.001$ (RSA Erkek-RSA Kadın; RSA Erkek-Kontrol), ~ $p=0.01$ (RSA Kadın-Kontrol).

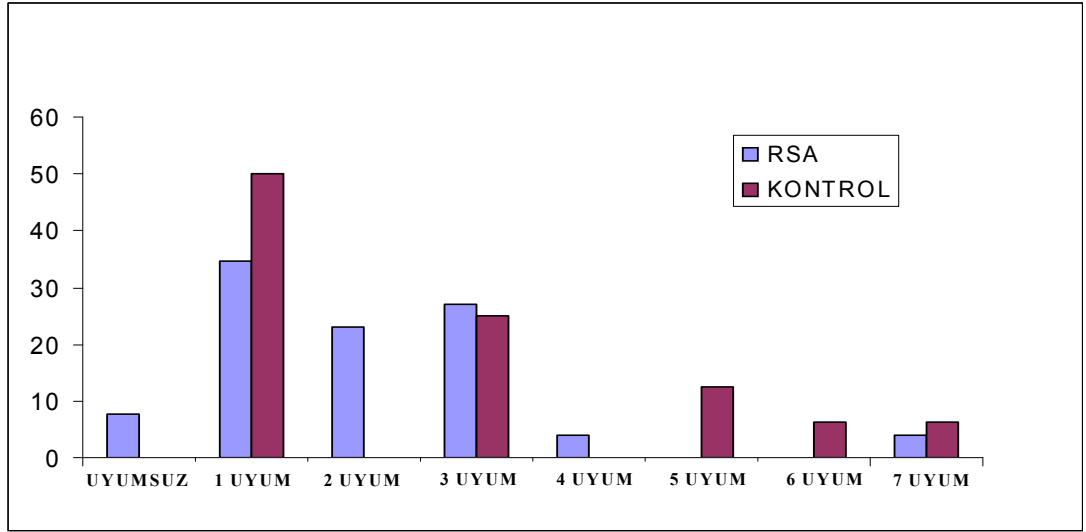
Sınıf II allellerinin karşılaştırmasında kadınlarda en sık rastlanan HLA-DR*04'ün ve HLA-DQ*03'ün RSA'lı erkeklere göre biraz yüksek olduğu saptansa da ($p<0.05$), genel popülasyonla karşılaştırmada anlamlı bir fark gözlenmedi.



Şekil 11. RSA'lı bayanlarda (RSA-K), RSA'lı Erkeklerde (RSA-E) ve sağlıklı kontrollerde en sık rastlanan HLA-Sınıf II allellerinin karşılaştırması. * $p<0.05$ (RSA Kadın-RSA-Erkek)

6.2.RSA Hastalarında Eşler Arası HLA Doku Grubu Uyumları

RSA tanısı konmuş bayanlar ile eşleri arasındaki HLA doku grubu uyumları incelendiğinde eşlerin %92,3'ünde EN AZ 1 uyum tespit edilirken maksimum uyum 7 allel ile eşlerin %3,9'unda belirlenmiştir. Eşlerin %7,7'si uyumsuz, %34,6'sı 1 allel uyumlu, %23'ü 2 allel uyumlu, %27'si 3 allel uyumlu, %3,9'u 4 allel uyumlu ve %3,9'u 7 allel uyumlu bulunmuştur (Şekil 12). Sağlıklı doğum yapan bayanlar ve eşleri arasındaki doku grubu uyumları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 12. RSA' lı eşler ve sağlıklı doğum yapmış eşler arası HLA doku grubu uyum yüzdeleri

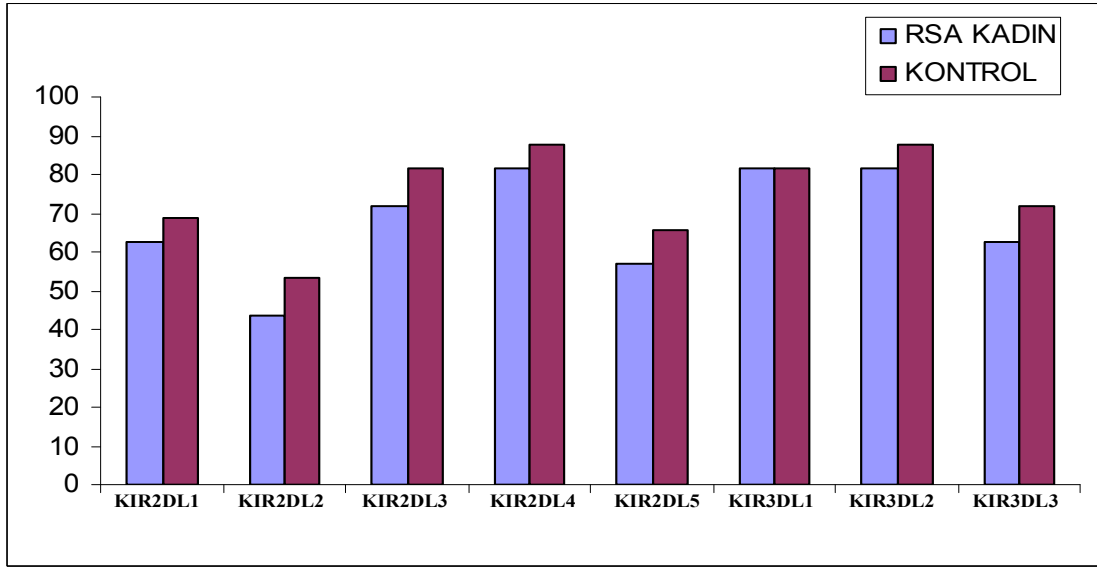
6.3.KIR Allellerinin Dağılımları

RSA tanısı konmuş bayanlarda ve RSA'lı erkeklerde inhibitör ve aktivatör fonksiyonlara sahip tüm KIR allel dağılımları incelenmiştir (Tablo 9). Erkekler sağlıklı kontrol olarak değerlendirilmiştir.

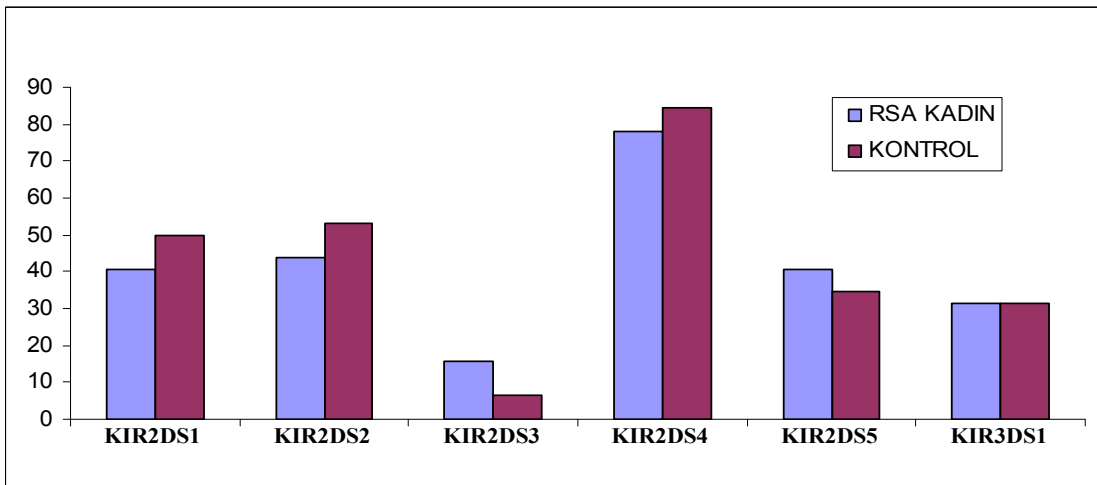
Tablo 6. RSA' lı bayanlarda ve RSA' lı erkeklerde KIR allel dağılımları.

	Fonksiyonu	RSA Bayanlar (%)♀(n=32)	Sağlıklı Kontrol(%)♂(n=32)
KIR2DL1	inhibitör	62,5	68,8
KIR2DL2	inhibitör	43,8	53,1
KIR2DL3	inhibitör	71,9	81,3
KIR2DL4	inhibitör	81,3	87,5
KIR2DL5	inhibitör	56,3	65,6
KIR2DP	(-)	75	81,3
KIR2DS1	aktivatör	40,6	50
KIR2DS2	aktivatör	43,8	53,1
KIR2DS3	aktivatör	15,6	6,3
KIR2DS4	aktivatör	78,1	84,4
KIR2DS5	aktivatör	40,6	34,4
KIR3DL1	inhibitör	81,3	81,3
KIR3DL2	inhibitör	81,3	87,5
KIR3DL3	inhibitör	62,5	71,9
KIR3DP1	(-)	68,8	65,6
KIR3DS1	aktivatör	31,3	31,3

RSA tanısı konmuş bayanlarda, inhibitör KIR genlerinin bulunma yüzdesi, sağlıklı kontrollere göre eşit ya da daha az iken (Şekil 13), aktivatör KIR genlerinden sadece KIR2DS3 ve KIR2DS5'in RSA'lı bayanlarda bulunma yüzdesi, sağlıklı kontrollerden daha yüksek bulunmuştur (Şekil 14). KIR2DS3 ve KIR2DS5 aktivatör KIR gen frekanslarının yüksek bulunmasına karşın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında RSA grubunda inhibitör ve aktivatör genlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 13. RSA'lı bayanlar ve sağlıklı kontroller arası inhibitör KIR allel yüzdeleri



Şekil 14. RSA'lı bayanlar ve sağlıklı kontroller arası aktivatör KIR allel yüzdeleri

6.4.KIR Haplotipi ve HLA-C Grup Dağılımları

6.4.1.RSA'lı Bayanlarda ve Sağlıklı Kontrollerde KIR Haplotip Dağılımları

RSA'lı bayanlarda ve sağlıklı kontrollerde KIR haplotip dağılımları incelendiğinde haplotip A, haplotip B, ya da haplotip A/B dağılımları açısından anlamlı bir fark yoktur (Tablo 10).

Tablo 7. RSA'lı Bayanlarda ve Sağlıklı Kontrollerde KIR Haplotip Dağılımları Yüzdesi

	RSA♀ (n=64)(%)	RSA ERKEK (n=64)(%)
Haplotip AA	25	21,9
Haplotip BB	4,7	4,7
Haplotip A/B	70,3	73,4

6.4.2.RSA'lı Bayanlarda ve Erkeklerde HLA C Grup Dağılımları

RSA'lı bayanlarda ve erkeklerde HLA-C gruplarından C1, C2, C1/C2 grup dağılımları açısından belirgin bir fark yoktur (Tablo 11).

Tablo 8. RSA'lı Bayanlarda ve Erkeklerde HLA-C Grup Dağılımları Yüzdesi

	RSA♀(n=32)(%)	RSA♂(n=32)(%)
C1 Grubu	28,1	28,1
C2 Grubu	25	28,1
C1/C2 Grubu	46,9	43,8

6.4.3.RSA'lı Bayanlarda ve Erkeklerde KIR haplotip ve HLA-Cw*07 ilişkisi

KIR haplotipi ve HLA arası ilişki incelendiğinde KIR Haplotip AA olan RSA'lı erkeklerin (n=14) %57,2'sinin HLA-Cw*07 taşıdığı, KIR Haplotip AA olan RSA'lı bayanların %37,5'inin HLA-Cw*07 taşıdığı tespit edilmiştir.

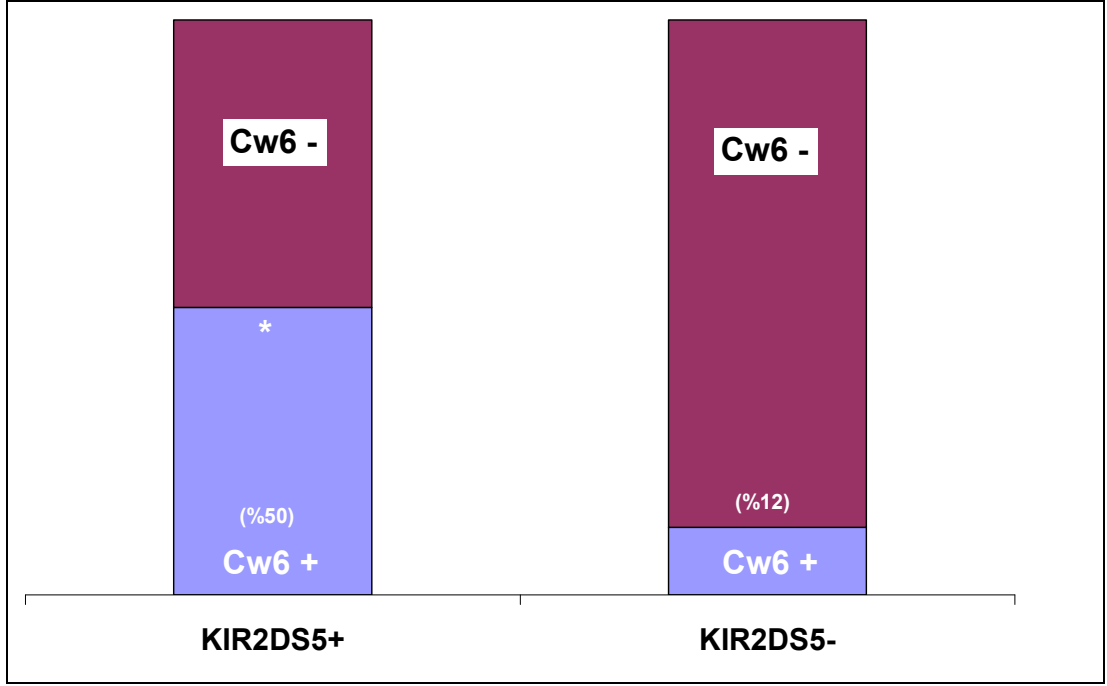
6.5.RSA'lı Bayan KIR ile RSA'lı Erkek HLA Korelasyonları

Plasenta, sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblastlardaki KIR ve MHK dağılımları incelendiğinde; erkek MHK Sınıf I allellerinden özellikle HLA-C, kadın KIR reseptörleri ile karşı karşıya geldiği bilinmektedir. Bu bilgi doğrultusunda çalışma grubumuzdaki bayanlarda eksprese edilen KIR reseptör grupları ile eşlerinde eksprese edilen belli başlı Sınıf I ve II allelleri eşleştirilerek ayrıca incelendi. İnhibitör özellik gösteren KIR molekülleri ile bu bayanların eşlerinde eksprese edilen herhangi bir sınıf I ve Sınıf II allelinin korelasyon göstermediği bulundu.

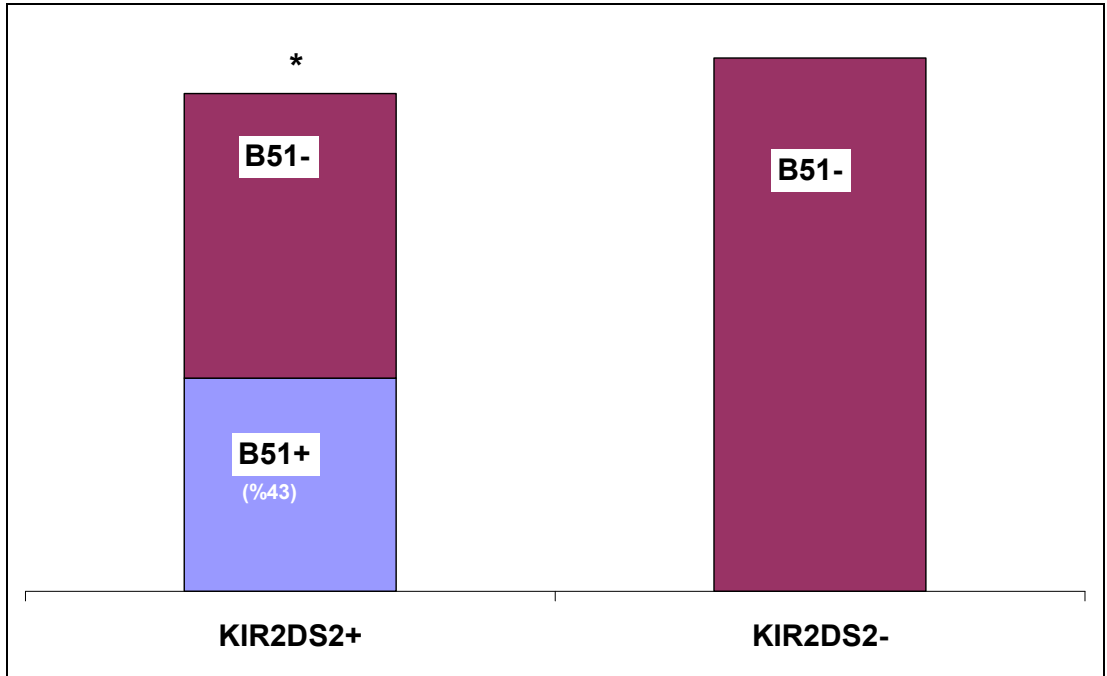
Aktivatör KIR moleküllerinin varlığının ise eşlerde belli HLA-B ve HLA-C allelleri ile korelasyon gösterdiği saptandı. KIR2DS5 taşıyan RSA'lı kadınların (n=12) altısı heterozigot ya da homozigot Cw*06 pozitifken, KIR2DS5 negatiflerin sadece ikisinin eşinin Cw*06 pozitif olması, RSA sorunu olan eşlerde Cw*06 ve KIR2DS5 eşleşmesinin bir risk faktörü olduğunu düşündürmektedir (rölatif risk: 2,6, p=0.03) (Şekil 15).

Benzer şekilde kadında KIR2DS2 ile erkekte B51 varlığı ilişkili gözükmemektedir. KIR2DS2 taşıyanların (n=14) bayanları altısının eşi heterozigot ya da homozigot B51 pozitifken, KIR2DS2 negatiflerin hiçbirinin eşinde HLA B51 saptanmadı (P=0.006, Şekil 16) Bu veri, eşler arasında KIR2DS2 ve HLA-B51 eşleşmesinin de RSA'da bir risk faktörü olabileceğini düşündürmektedir.

İlginç olarak, RSA grubundaki erkeklerde HLA-B44 ve HLA-Cw7 allelleri, eşlerine ve normal populasyona göre anlamlı derecede yüksek sıklıkta rastlanmasına ve eşlerindeki KIR2DS1 ve KIR2DS2 ile zayıf korelasyonu olmasına rağmen, ilgili allellerin sıklığı ile aktivatör KIR'lar arasında istatistiksel anlamlılık gösteren bir ilişki saptanmadı.



Şekil 15. RSA'lı bayanlarda KIR2DS5 ile eşlerindeki HLA-Cw06 arasındaki ilişki (rölatif risk: 2,6, *p=0,03).



Şekil 16. RSA'lı bayanlarda KIR2DS2 ile eşlerindeki HLA-B51 arasındaki ilişki (*P=0,006).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

RSA hastalığında birçok vakanın patogenezi bilinmemektedir. Bazı araştırmacılar sebebin immünolojik bozukluklardan da kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Özellikle MHK genlerinin ya da moleküllerinin tekrarlayan düşüklerde rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Evrim sürecinde genetik çeşitliliğin sağlanması, türlerin devamı için önemlidir. HLA antijenlerindeki çeşitlilik de bu süreçte eş seçimi ile ilişkili olabilmektedir (Satar G. 1992, Scott V. 1998). Her bireyin HLA antijenleri birbirinden farklıdır. Bu farklılık ve polimorfizm, türlerin çeşitliliğini ve korunmasını sağlamaktadır (Mueller R.F. et al. 1997; Walter B. 1997). ‘‘RSA tanısı konmuş bayanlar ve eşleri arasındaki HLA uyumu ya da uyumsuzluğu hastalık patogenezi ile ilişkili olabilir’’ hipotezi ile eşler arasındaki doku grubu uyumlarını incelediğimizde; bulgularımızda eşler arasında tespit edilen maksimum allel uyumu %3,9’luk oran ile 7/10 allel olarak belirlenmiştir. Eşler arası doku grubu uyumu, frekansı %34,6 ile 1 allel, %23 ile 2 allel, % 27 ile 3 allel olarak bulunmuştur. Bu oranlara göre eşler arasındaki doku grubu uyumundan çok doku gruplarındaki uyumsuzluk belirgindir. Ancak sağlıklı doğum yapmış eşler ile RSA’ lı eşler arası HLA doku grubu uyum farkında anlam bulunamamıştır.

Maternal-fetal arayüzdeki hücresel etkileşimler fetusun sağlıklı gelişimi için önemlidir. Semi-allojenik olan fetusa karşı oluşacak maternal NK hücre cevabı paternal antijenlerin etkisiyle gerçekleşebilir. Babaya ve anneye ait MHK/KIR allel repertuarı ve düşükler arasındaki ilişki hastalık patogenezinde rol oynayabilir.

Yapılan çalışmalarda bazı HLA allellerinin tekrarlayan düşükler ile ilişkili olabileceği üzerinde durulmuştur (Sbracia M. et al. 1996, Wagenknecht D.R. et al. 1997, Kruse C. 2004). Kruse C. ve arkadaşları tarafından tekrarlayan düşük yapan bayanlardaki HLA-DRB1*03 allel sıklığının kontrollere göre daha yüksek olduğunu bildirilmiştir. Bizim bulgularımızda ise RSA’lı bayanlarda en sık rastlanan DRB1 alleli %18,8’lik frekans ile DRB1*04 iken, bu oran Türk Popülasyonundaki %15,2’lik DRB1*04 (Elbaşı M.O. ve ark., 2007) allel frekansı ile benzer bulunmuştur.

RSA'lı bayanlarda ve eşlerinde en sık rastlanan HLA-DQ alleli HLA-DQ*03 olarak bulunmuştur. HLA-DQ*03 alleli sağlıklı Türk Populasyonunda en sık rastlanan HLA-DQ alleli olduğu, HLA-DQ*03'ün RSA'lı bireylerde bulunma frekansı ile sağlıklı Türk Populasyonunda bulunma frekanslarının benzer olduğu tespit edilmiştir.

Ekstravillüs sitotrofoblast hücrelerinin, MHK sınıf II antijenlerini eksprese etmediği, klasik MHK sınıf I antijenlerinden de sadece HLA-C' yi, klasik olmayan MHK sınıf I moleküllerinden HLA-E ve HLA-G' yi eksprese ettikleri bilinmektedir (Ian L. et al., 2006). Bizim bulgularımızda da RSA'lı eşler ile sağlıklı kontroller arasında MHC sınıf II allel frekanslarında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır.

Bulgularımızda RSA'lı bayanlarda ve eşlerinde en sık rastlanan HLA-A alleli HLA-A*02 olarak tespit edilmiştir. Bu veri HLA-A*02'nin sağlıklı Türk Populasyonunda en sık rastlanan HLA-A alleli olmasıyla ilişkilendirilmiştir.

RSA'lı bayanlarda en sık rastlanan HLA-B alleli %26,6'lık frekansla HLA-B*35 olarak tespit edilmiştir. RSA grubundaki kadınlarda HLA-B*35, RSA grubundaki erkeklerden daha sık ($p<0.05$) olarak rastlanmasına rağmen genel populasyon dağılımı ile karşılaştırıldığında yine Türk toplumu içindeki genel HLA-B*35 dağılımı içinde yer aldığı görülmüştür. HLA-B*35 allelinin sağlıklı Türk Populasyonunda %19,1 oranla en sık rastlanan ikinci HLA-B alleli olduğu bilinmektedir.

HLA-C allellerinin karşılaştırmasında; Türk toplumunda en sık rastlanan Cw*04 allelinin, RSA'lı erkeklerde düşük sıklıkta olduğu saptandı ($p=0.005$). Erkeklerde Cw*07 allel sıklığının ise her iki gruba göre ileri derecede yüksek olduğu gösterildi ($p=0.001$). Cw*06 allelinin ise RSA'lı kadınlarda genel populasyona göre düşük sıklıkta olduğu bulundu ($p=0.01$).

HLA-Cw açısından bakıldığında bulgularımızda RSA'lı bayanlarda, RSA'lı Erkeklerde ve Sağlıklı Kontrollerde HLA-Cw allellerinde anlamlı farklar görülmüştür. RSA'lı bayanlarda en sık rastlanan HLA-Cw alleli %23,2'lik oranla HLA-Cw*04'tür. HLA-Cw*04 alleli Türk Populasyonunda %31'lik oranla en sık gözlenen HLA-Cw allelidir. Türk toplumunda en sık rastlanan Cw*04 allelinin,

RSA'lı erkeklerde düşük sıklıkta olduğu saptandı (p=0.005). Buna karşın erkeklerde Cw*07 allel sıklığının ise her iki gruba göre ileri derecede yüksek olduğu gösterildi (p=0.001). HLA-Cw*07 alleli, HLA-C molekülünün ağır zincirindeki α heliksindeki 80.pozisyondaki amino asit farkına göre C1 grubuna aittir. Bazı araştırmacılar tekrarlayan düşüklerde KIR haplotipleri ile HLA-C'nin C1 ve C2 alt grup etkileşimlerinin önemine dikkat çekmişlerdir. KIR/HLA-C ilişkisi NK hücre aktivasyonunda ya da inhibisyonunda rol oynayan önemli bir faktördür.

Bulgularımızda, RSA tanısı konmuş bayanların eşlerindeki HLA-Cw*07 allelinde tespit edilen anlamlı yükseklik, bayanlardaki NK hücre reseptörlerinden KIR gen polimorfizimi ile ilişkili olabilir. Bu amaç doğrultusunda RSA tanısı konmuş bireylerde KIR Haplotipi ve HLA-C Grup dağılımları incelenmiştir. RSA'lı bayanlarda ve sağlıklı kontrollerde KIR haplotip dağılımları incelendiğinde Haplotip A, Haplotip B, ya da Haplotip A/B dağılımları açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca RSA'lı bayanlarda ve erkeklerde HLA-C gruplarından C1, C2, C1/C2 grup dağılımları açısından da belirgin bir fark saptanmamıştır. C. Flores ve arkadaşları düşük yapan bayanlarda KIR AA genotip frekansının kontrollere göre daha yüksek olduğunu, KIR AA genotipindeki bireylerin KIR2DL3 yönünden homozigot olduğunu bildirmişlerdir (Flores A.C. 2007). Bulgularımızda RSA'lı bayanlarda ve erkeklerde KIR2DL1, -DL3, -DL4, -DP1, -DS4, KIR3DL1, -DL2, -DL3, -DP1 sık görülen alleller olarak tespit edilirken HLA-C1, HLA-C2 veya HLA-C1/C2 olmanın KIR allel dağılımında etkisi belirlenmemiştir. KIR haplotipi ve HLA arası ilişki incelendiğinde KIR Haplotip AA olan RSA'lı erkeklerin %57,2'sinin HLA-Cw*07 taşıdığı, KIR Haplotip AA olan RSA'lı bayanların %37,5'inin HLA-Cw*07 taşıdığı tespit edilmiştir. Erkek-bayan arasındaki frekans farkı erkeklerdeki HLA-Cw*07 allel yüksekliği ile ilişkilendirilebilir.

KIR gen repertuarları incelendiğinde; sağlıklı doğum yapan kontrol grubundaki bayanlara göre, tekrarlayan düşük yapan bayanlardaki inhibitör KIR genlerinin, daha az olduğu bildirilmiştir (Varla-Leftherioti M. 2003). Özellikle inhibitör KIR reseptörlerinden KIR2DL2' nin tekrarlayan düşük yapan bayanlarda, kontrollere göre daha düşük olduğunu bildirilmiştir (Flores A.C. 2007). Bulgularımızda RSA'lı bayanlardaki KIR2DL2 gen allel frekansı sağlıklı kontrollere göre daha düşük

gözükmektedir Ayrıca diğer tüm inhibitör gen frekansları da sağlıklı kontrollerden hafifçe düşük olmasına rağmen fark istatistiksel anlamlılık düzeyinde değildir. Aktivatör KIR genlerinden KIR2DS3 ve KIR2DS5 allelinin RSA'lı bayanlarda bulunma yüzdesi, sağlıklı kontrollerden daha yüksek olmasına rağmen aktivatörlerdeki farklılık da istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır. İstatistiksel anlamlılığın yakalanamaması çalışma grubumuzun sayısının azlığı nedeniyle olabilir.

RSA'lı bayan KIR'ları ile RSA'lı erkek HLA korelasyonları incelendiğinde ilginç olarak, RSA grubundaki erkeklerde HLA-Cw7 alleli, eşlerine ve normal populasyona göre anlamlı derecede yüksek sıklıkta rastlanmasına ve eşlerindeki KIR2DS1 ve KIR2DS2 ile zayıf korelasyonu olmasına rağmen, HLA-Cw*07 sıklığı ile aktivatör KIR'lar arasında istatistiksel anlamlılık gösteren bir ilişki saptanmamıştır. Bu istatistiksel anlamsızlık incelenen hasta sayısı ve KIR poliforfizim yetersizliğinden kaynaklanacağı gibi HLA-Cw*07 'nin bağımsız bir risk faktörü olabileceğini de düşündürmektedir.

Aktivatör KIR2DS5 taşıyan RSA'lı kadınlar ile eşlerindeki Cw*06 pozitifliğindeki istatistiksel anlam ($p=0,03$) ve KIRDS2 ve HLA-B51 eşleşmesindeki anlam ($p=0.006$) bu allel eşlenimlerinin tekrarlayan düşükler için bir risk faktörü olduğunu düşündürmektedir.

Bulgularımız, başlangıçta evrimsel gelişimde, genetik çeşitliliğin sağlanması için, aynı ya da çok benzer genotiplerin çoğalmasında doğal bir eleme olabilir mi sorusuna klasik MHK Sınıf I ve II moleküllerinin RSA'lı eşler arasındaki benzerlik ya da farklılıklarını araştırarak yanıt aradığımız hipotezimizi desteklememektedir. En az bir çocuğu olan çiftler arasında incelediğimiz MHK Sınıf I ve II allellerindeki benzerlik ve farklılıklar RSA grubundaki çiftler arasındaki uyum ya da uyumsuzluk sıklıklarından farklı değildir. Bu bulgumuz en azından klasik MHK gruplarındaki uyum ya da uyumsuzluğun RSA'da rolü olmadığını düşündürmektedir. Ancak bulgularımız eşler arasında trofoblastlarda immün tanınmanın bozulmasına neden olabilecek farklı mekanizmaların olabileceğini ortaya çıkarmaktadır. Erkeklerde belli HLA-C'ler ile kadınlarda belli aktivatör KIR haplotiplerinin eşleşmesi immün

aktivasyona ve dklere neden olabilir. Çalışma grubumuzda, HLA-Cw6-KIR2DS5 ve HLA-B51-KIR2DS2 elemesi olan çiftlerin sıklığı, RSA' da çiftler arasında HLA-KIR elemelerindeki ilişkiler konusunda daha ileri araştırmalar yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

8. KAYNAKLAR

1. Abul K. Abbas, (2006), Cellular and Molecular Immunology.
2. Aplin J.D., (1991)., Implantation, trophoblast differentiation and hemochorial placentation: Mechanistic evidence in vivo and in vitro. J Cell Sci, 99. P.681.
3. Attar NE, Işıkoğlu M. Jinekoloji pratik yaklaşım, (1995), Atlas Kitapçılık, Ankara, s.151–157.
4. Boztosun A., Kumru S., Gödekmerdan A., (2004), Rekküren spontan abortuslarda lenfosit subgrupları ve sitokinlerin rolünün araştırılması. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi, 18(3):147-155.
5. Browning M., Mcmichael A., (1996), MHC and HLA: Genes, Molecules and Function. Oxford: Bios Seintific Publishers.
6. Carrington M., (2002), The KIR Gene Cluster.
7. Clarke A.G., Kendall M.D., (1994), The thymus in pregnancy: The interplay of neural, endocrine and immune influences. Immunol Today, 15:545-551.
8. Cooper M.A., (2001), The Biology of human natural killer-cell subset Trends in immunology, Vol 22 No:11.
9. Çarin M., (1997), Transplantasyon immunolojisi (HLA sistemi). Klinik Gelişim Dergisi, 10(1-2): 7-11.
10. Derek Middletona B.C., Martin Currana C., Lynne Maxwella C., (2002), Natural killer cells and their receptors. Transplant Immunology, 10:147–164.
11. Dorak M.T., (2002), Major Histocompatibility Complex. HLA review, 10:1-3.
12. Elbaşı M.O., Tulunay A., Akdeniz T., Aydın-Tatlı İ., Elbir-Kulaksız Y., Ekşioğlu-Demiralp E., (2007), Türk Toplumunda HLA Doku Gruplarının Dağılımı, Uluslararası katılımlı XIX. Ulusal İmmünoloji Kongresi,Abstract Kitabı. P28, s215

13. Esplin S., Branch W., Silver R., Stagnaro-Green A., (1998), Thyroid autoantibodies are not associated with recurrent pregnancy loss. Salt Lake City, Utah, and New York.
14. Faulk W.P., Temple A., (1976), Distribution of beta-2 microglobulin and HLA in chorionic villi of human placentae. *Nature*, 262:199.
15. Flores A.C., (2007), KIR receptors and HLA-C in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens*, ISSN 0001-2815 Journal compilation 69 Suppl. 1 (112–113)
- genes. *Immunogenetics review*, 41:1-17
16. Gruen, J.R. , Weissman, S.M. (1997). Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood*, 90:4252-4265.
17. Gürtekin M., Aydın F., Oğuz F.S., (1997), Kemik iliği nakli yapılacak hastaya verici seçilmesinde Karışık lenfosit kültür testi ve genotiplemenin uyumu. *Klinik Gelişim Dergisi*, 10 (1-2): 12-16.
18. Harlap S., Shiono P.H., Ramcharan S., (1980), A life table of spontaneous abortions and the effects of age, parity and other variables: Human Embryonic and fetal death. Academic pres, p.145.
19. Hsu K.C., Chida S., Dupont B., Geraghty D.E., (2002), The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: Gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev*, 190:40.
20. Ian L., Sargent, Angela Borzychowski M., Christopher W.G., (2006), NK cells and human pregnancy – an inflammatory view. *Trends in Immunology*, Vol.27, No.9.
21. Johnson P.M., Chia K.V., Risk J.M., Barnes R.M.R., Woodrow J.C., (1988), Immunological and immunogenetic investigation of recurrent spontaneous abortion. *Disease Markers*, 6, p. 137.
22. Klein, J., Sato, A., (2000), The HLA system. Part I. *New Eng J Med*, 343:702–709.
23. Kruse C. , Steffensen R., Varming K., and Christiansen O.B, (2004). A study of HLA-DR and -DQ alleles in 588 patients and 562 controls confirms that HLA-DRB1*03 is associated with recurrent miscarriage. *Human Reproduction Vol.19, No.5 pp. 1215-1221.*

24. Lewis L. Lanier A., (2005), NK cell recognition. *Rev. Immunol*, 23:225-274.
25. Lin H., Mosmann T.R., Gailbert L., Tuntipopítat S., Wegmann T.G., (1993),
Synthesis of Thelper2-type cytokines at the maternal-fetal interface.
Journal Immunology, 155:5436-5443.
26. Löke Y.W., King A., Burrows T.D., (1995), Decidua in human implantation.
Hum Reprod, 10(Suppl2):14.
27. McIntyre J.A., Faulk W.P., (1983), Recurrent spontaneous abortion in
human pregnancy: Results of immunological, cellular and humoral
studies. *Am J Reprod Immunol*, 9, p. 165.
28. Milinski M., (2006), The Major Histocompatibility Complex, Sexual
Selection, and Mate Choice. *Annual Reviews Ecol. Evol. Syst.*, 37:159–
86.
29. Moffett A., Loke C., (2006), Immunology of placentation in eutherian
mammals. *Nature Publishing Group*, Volume 6, p.584-594.
30. Moffett-king-A., (2002), Natural killer cells and pregnancy. *Nat. Rev.*
Immunol 2. 656-663.
31. Moncayo H., Solder E., Abfalter E., Moncayo R., (1994), Cytokines and the
maternal-fetal interface. *Immunol Today*, 15:295.
32. Moretta L., Moretta A., (2004), Killer immunoglobulin-like receptors.,
Current Opinion in Immunology. 16:626–633.
33. Mueller R.F., Young I.D., (1997), *Emery's Elements of Medical Genetics*.
Ninth Ed. Churchill Livingstone inc., New York, s.151-162.
34. Natarajan K., Nazzareno D., Wang J., Roy A., Margulies M., Margulies D.H.
(2002), Structure and function of NK cell receptors: Multiple molecular
solution to self, non self discrimination. *Annual reviews immunology*,
173:4273-4276.
35. Ole B., Christiansena H., Knudsen J., Kjeld L., Rasmussen N., (1998),
Histocompatibility antigen studies in women with recurrent miscarriages
and Mullerian uterine anomalies. *European Journal of Obstetrics &
Gynecology and Reproductive Biology*, 78:73–77.
36. Parham P., (2005), Mhc class I molecules and kirs in human history. *Health
and survival nature reviews immunology*, vol. 5.

37. Parhar R.S., Yagel S., Lala P.K., (1989), PGE2-mediated Immunosuppression by first trimester human decidual cells blocks activation of maternal leukocytes in the decidua with potential antitrophoblastactivity. *CeliImmunol*, 120:61.
38. Patriarca A., Piccioni V., Gigante V., (2000). Recurrent spontaneous abortion. Etiologic factors. *Panminerva Med*, 42:105–108.
39. Qlerup O., Zetterguist H., (1992), Tissue Antigens HLA-DR Typing by PCR amplification with Sequence-Specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. 39: 225-235.
40. Reinhard G., Noll A., Sclebusch H., (1998), Shifts in the Th1/Th2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem Biophys Res Commun*, 245:933-938.
41. Satar G., (1992), Psoriasisde HLA. Ç. Ü., Uzmanlık Tezi, Adana, 55: 13-21.
42. Sbracia M., Mastrone M., Scarpellini F., Grasso J.A., (1996), Influence of histocompatibility antigens in recurrent spontaneous abortion couples and on their reproductive performances. *Am J Reprod Immunol*, 35, p. 85.
43. Schwartz B.D., (1996), The major histocompatibility complex. Rich RR (ed): *Clinical Immunology Principle and Practice*. St Louis Missouri Lange Medical, p. 95-113.
44. Scott V.,(1998), Evolution and ecology of MHC molecules: From genomics to sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(8):305-311.
45. Sebik F., (1998), HLA sistemi. *Aktüel Tıp Dergisi*, 3(2): 86-89.
46. Shankarkumar U., (2004), The Human Leukocyte Antigen (HLA) System. *Int J Hum Genet*, 4(2): 91-103.
47. Sharkey A.M., Gardner L., Hiby S., Farrell L., Apps R., Masters L., Goodridge J., Lathbury L., Stewart C.A., Verma S., Moffett A., (2008), Killer Ig-Like Receptor Expression in Uterine NK Cells Is Biased toward Recognition of HLA-C and Alters with Gestational Age, *The Journal of Immunology*, 181: 39-46.
48. Sherif S., (2006), Farag Human natural killer cell development and biology. *Blood reviews*, 20:123-137.
49. Snell, G.D. (1981). *Studies in histocompatibility*. *Science*, 213:172-178.

50. Stephenson M.D., (1996), Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril*, 66:24-29.
51. Stewart C.A., Vivier E., Colonna M., (2006), Strategies of Natural Killer Cell Recognition and Signaling, *CTMI* 298:1–21
52. Strtompeter S., Weinhold S., Eisermann M.W., (2002), Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *The journal of immunology*, 169 (8):4253-61.
53. Thellin O., Coumans B., Zorzi W., Igout A., Heinen E., (2000), Tolerance to the foeto-placental ‘graft’: ten ways to support a child for nine months. *Current Opinion in Immunology* Volume 12, Issue 6, Pages 731-737
54. Tillery A., Silver R., Dalton J., Kjersti M., (2006), Immunology of normal pregnancy. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 11: 279-295.
55. Trowsdale, J. (1995). Both man & bird & beast: Comparative organization of MHC
56. Varla-Leftherioti M., (2003), Natural killer (NK) cell receptors repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions. *Am. J. Reprod. Immunol.* 49:183–191.
57. Veeck L.L., (1991), Atlas of human oocyte and early conceptus, vol 2. Baltimore, Williams &Wilkins.
58. Vilches C., Parham P., (2002), KIR: Diverse rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity
59. Vinay K., Megan E., McNerney A., (2005), New self: mhc class I independet natural killer cell self tolerance. *nature reviews| immunology*, vol. 5:363-374.
60. Vivier E., Anfossi N., (2004), Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *nature reviews*.
61. Wagenknecht D.R., Green K.M., McIntyre J.A., (1997), Analyses of HLA-DQ alleles in recurrent spontaneous abortion (RSA) couples. *Am J Reprod Immunol*, 37, p. 1.
62. Walter B., (1997), HLA polymorphism in Terasaki PI, Gjertson DW (Ed) HLA. Los Angeles UCLA Tissue Typing Lab Pres, s.1-6.

63. Yaşar B., 2006, Erken Gebelik Kayıplarında Histeroskopi Bulguları,
Uzmanlık Tezi , Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve
Araştırma Hastanesi
64. Yeğin O., (1990), Temel İmmünoloji ve İmmün Eksiklik Hastalıkları. Palme
Yayın Dağıtım, s.69-80.
65. Yeşilli O., (1993), Pemfigus vulgarisde Human Lökosit Antijenleri. Ç.Ü.
Uzmanlık Tezi, Adana, 40: 12-21s

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	MEHMET ONUR	Soyadı	ELBAŞI
Doğum Yeri	İSTANBUL	Doğum Tarihi	08/04/1980
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	30121877830
E-mail	onurelbasi@yahoo.com	Tel	02164495722

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	M.Ü.Fen-Edb.Fak/ Biyoloji	2005
Önlisans	M.Ü.Sağlık Hiz.Mes.Yük.Okulu/ Tıbbi Laboratuvar	2001
Lise	Haydarpaşa Lisesi	1998

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	M.Ü.Tıp Fak.Vakıf Laboratuvarı/İmmünoloji	Ağustos 2006-
2.	Laborant	M.Ü.Tıp Fak.Vakıf Laboratuvarı/Mikrobiyoloji-Biyokimya	Ekim 2000-Şubat 2001

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	orta	orta

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	65.000							

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS:

International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	66.064	68.103	67.805
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office (Word/Excel/PowerPoint)	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ARAŞTIRMA ETİK KURULU

Sayı : B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/
Konu :

Sayın Prof.Dr. Z. Emel EKŞİOĞLU- DEMİRALP

MAR-YÇ-2007-0078 protokol nolu “MHC (Majör Histokompatibilite Kompleks)’in Fetusun yaşamındaki rolü “ isimli projeniz Fakültemiz Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Prof. Dr. Haner DİRESKENELİ
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Araştırma Etik Kurul Başkanı