

**T.C**  
**ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI**  
**ANABİLİM DALI**

**DOĞUMUN ZAMANLAMASI İLE UTERİN NATURAL**  
**KİLLER HÜCRELERİNİN İLİŞKİSİ**

**Dr. Eser MAZI**

**ÇOCUK İMMÜNOLOJİ- ALERJİ BİLİM DALI**

**UZMANLIK TEZİ**

**SAMSUN**

**2014**

**T.C**  
**ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI**  
**ANABİLİM DALI**

**DOĞUMUN ZAMANLAMASI İLE UTERİN NATURAL**  
**KİLLER HÜCRELERİNİN İLİŞKİSİ**

**Dr. Eser MAZI**

**ÇOCUK İMMÜNOLOJİ- ALERJİ BİLİM DALI**

**UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Aışan YILDIRAN**

Bu tez Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kurulu tarafından  
PYO.TIP.1904.10.033 proje numarası ile desteklenmiştir.

**SAMSUN**

**2014**

## TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın her aőamasında ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan, bilgi ve tecrübesiyle meslek yaőantıma önemli katkılarda bulunan değerli hocam ve tez yöneticim sayın Prof. Dr. Aliőan YILDIRAN'a eğitimime katkıda bulunan; bilgi, tecrübesiyle eğitim ve öğretimimde yol gösterici olan Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Ayhan DAĞDEMİR'e, üzerimde büyük emekleri olan tüm Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları öğretim üyelerine, uzmanlığın bu zorlu yolunda beraber çalıőmaktan büyük zevk aldığım ve bu uzak memlekette ailem gibi olan her an desteklerini gördüğüm Uzm. Dr. Ufuk ÖZKAYA ve tüm hekim arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalıőmamın bir parçası olan histolojik incelemede çok büyük katkıları olan sayın Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalından Doç Dr. B.Zuhal ALTINKAYNAK ve Dr. Iőınsu AYDIN' a, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan sayın Prof. Dr İdris KOÇAK ve Yrd.Doç Dr. Davut GÜVEN'e, Kadın Hastalıkları ve Doğum uzmanı sayın Uzm.Dr. Aynur DAĞDEMİR e Flovsiometri çalışmasında büyük katkıları olan sayın Dilek USTA, Canan ÖZDEMİR GÜNTÜRK ve Aslı ALTUN' a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, aramızda kilometreler olmasına rağmen her an yanımda hissettiğim, hekim olmak uğruna yıllarca uzak kaldığım canım anneme, babama ve kardeőlerime teşekkür ederim.

Dr. Eser MAZI

## ÖZET

Prematürite, infant morbiditesi ve mortalitesinin en önemli nedenidir ve gittikçe artmaktadır. WHO'nun 2012 yılında 184 ülkede yayınladığı prematür doğum global raporuna göre , prematürite oranları %5-18 arasındadır. Ülkemizde 2010 yılında canlı doğum sayısı 1.298.000, prematür doğum oranı ise %11.9'du.

Prematür doğum ve ona bağlı mortalite ve morbiditeyi azaltmak amacıyla, doğum zamanlaması ve oluş mekanizması anlaşılmalıdır. Gebeliğin devamını CD94+NK hücrelerin (uNK) desidual CD94/NKG2A (inhibitör) olanların sağladığı bilinmektedir.

Bu çalışmada, her üç doğum şeklindeki plasentanın desidual dokusunda, inhibitör uNK (CD94+/NKG2A) hücrelerinin flovsitometri ve immünohistokimya ile 'desidual uNK hücre yüzdesi=C/S doğum > normal doğum > preeklamptik doğum' şeklinde kurulan hipotez değerlendirildi.

Çalışmaya; 21'i sezaryan, 16'sı normal ve 11'i preeklamptik olmak üzere toplam 48 plasenta dahil edildi. Boyaların son kullanma tarihi geçtiğinden preeklamptik doğumlar 11 ile sınırlandırıldı. Plasental doku solüsyon haline getirildikten sonra CD56+CD159a+ (NKG2A) yüzdesi flovsitometri ile belirlendi. İmmünohistokimya ile cm2 başına inhibitör uNK hücreleri CD94 (NKG2A) ile boyanmanın ardından fiziksel disektör ile sayıldı.

Hipotezimizde önerildiği gibi immünohistokimya ile elde edilen inhibitör CD94+(NKG2A) hücre sayıları, üç grupta istatistiki olarak farklıydı ( C/S > Normal > preeklamptik doğum).

Flovsitometrik yöntem ile ise CD159a(NKG2A) dışında CD45+,CD56, CD56+CD159a hücre yüzdeleri arasında istatistiksel bir farklılık yoktu.

Sonuç olarak gebeliğin devamını sağladığı bilinen uNK hücrelerinin; doğum eyleminin olmadığı C/S doğumda en yüksek, normal doğumda daha düşük, gebeliğin kendiliğinden sonlandığı gebeliğin devam ettirilemediği preeklampatik doğumda ise en düşük bulundu. Flovsiometrik bulgulardaki uyumsuzluk plasental solusyonun hazırlanmasındaki zorluklar, villüs hacimlerindeki ve debris'den ayırt edilen hücre sayılarındaki farklılıklara bağlı olabilir.

## SUMMARY

### **The relationship between uNK cells and delivery timing**

Prematurity is the most important cause of infant morbidity and mortality. Furthermore, it has increasing gradually. According to the premature delivery global report of WHO for 184 country in 2012, The prematurity rates are about 5-18%. In our country, the living birth count was 1.298.000 and the rate of premature birth was 11.9% in 2010.

To prevent the prematurity, timing of delivery and its mechanism should be understood. It has known that decidual CD94/NKG2A (inhibitor) of CD94+ NK cells (uNK) provides the continuation of pregnancy.

In this study, we evaluate the hypothesis that 'decidual uNK cell percent = C/S delivery > normal delivery > preeclamptic delivery' measuring inhibitor uNK (CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>/NKG2A<sup>+</sup>) cells with flowcytometry and also immunohistochemistry in the decidual tissue of placenta of every delivery way.

Of totally 48, 21 from caesarean, 16 from normal and 11 from preeclamptic placenta were included to the study. Because of the stains expired, preeclamptic deliveries was restricted to 11 pregnancies. After placental tissue has gotten to a solution, CD56<sup>+</sup>CD159a<sup>+</sup> (NKG2A) percent was determined flowcytometrically. By immunohistochemistry, inhibitor uNK cells per cm<sup>2</sup> were counted by physical dissector after stained with NKG2A (CD94).

By immunohistochemistry, as suggested with our hypothesis, inhibitor CD94+ (NKG2A) cell counts statistically different in three groups, respectively (i.e, C/S > Normal > preeclamptic delivery).

Flowcytometrically, there were no statistical differences of CD45<sup>+</sup>, CD56, CD56<sup>+</sup>CD159a cell per cents except CD159a(NKG2A).

In conclusion, uNK cells, known that provides continuation pregnancy and we think they could be related with delivery timing, the highest in C/S delivery that no delivery activity, lower in normal delivery that pregnancy ends spontaneously and the lowest in preeclamptic delivery that pregnancy couldn't be continued. The discordancy of flowcytometric results could be related with the difficulties to dissolve placenta tissue, differences of villus volumes and separated cell counts from debris.

## KISALTMALAR

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>DDA</b>                    | Düşük doğum ağırlığı                     |
| <b>ÇDDA</b>                   | Çok düşük doğum ağırlıklı                |
| <b>ADDA</b>                   | Aşırı düşük doğum ağırlıklı              |
| <b>WHO</b>                    | Dünya Sağlık Örgütü                      |
| <b>NO</b>                     | Nitrik Oksit                             |
| <b>Th</b>                     | T Helper                                 |
| <b>NK</b>                     | Natural killer                           |
| <b>CLP</b>                    | Lenfoid Progenitör Hücreler              |
| <b>KIR</b>                    | Killer-cell immunoglobulin-like receptor |
| <b>uNK</b>                    | Uterin Natural killer                    |
| <b>HLA</b>                    | Human leukocyte antigen                  |
| <b>cNK</b>                    | Sitotoksik Natural killer                |
| <b>Treg</b>                   | Regülatuar T hücresi                     |
| <b>C/S</b>                    | Sezaryen ile doğum                       |
| <b>ASH</b>                    | Antijen Sunan Hücre                      |
| <b>İL</b>                     | İnterlökin                               |
| <b>TCR</b>                    | T Cell Reseptör                          |
| <b>HIV</b>                    | Human İmmundeficiency Virus              |
| <b>LGL</b>                    | Large Granuler Hücre                     |
| <b>LDH</b>                    | Dentritik Hücre                          |
| <b>İDO</b>                    | İndolamin 2,3 dioksijenaz                |
| <b>ABC</b>                    | Avidin- Biotin Cell Metodu               |
| <b>PBS</b>                    | Fosfat Tampon Solüsyonu                  |
| <b>NSVY</b>                   | Normal Spontan Vajinal Yolla             |
| <b>DH</b>                     | Dentritik Hücre                          |
| <b>MFA</b>                    | Materno-Fetal Arayüz                     |
| <b>İFN<math>\gamma</math></b> | İnterferon Gama                          |



## **TABLÖLAR**

**Tablo 1.** NSVY gebelerin ve bebeklerinin özellikleri

**Tablo 2.** Sezaryen ile doğum yapan gebelerin ve bebeklerinin özellikleri

**Tablo 3.** Preeklampsi tanısı alan gebelerin ve bebeklerinin özellikleri

**Tablo 4.** NSVY ile doğum yapan gebelerin flovsitometrik sonuçları

**Tablo 5.** C/S ile doğum yapan gebelerin flovsitometrik sonuçları

**Tablo 6.** Preeklampsi tanısı ile doğum yapan gebelerin flovsitometrik sonuçları

**Tablo 7.** Flovsitometrik incelemenin istatistiksel ilişkileri

**Tablo 8.** Grupların CD94+(NKG2A) uNK hücre sayıları

## **GRAFİKLER**

**Grafik 1.** Birim alandaki ortalama CD94 sayıları

**Grafik 2.** Grupların ortalama villöz damar hacimleri

**Grafik 3.** Grupların ortalama villüs hacimleri

## **RESİMLER**

**Resim 1.** Parafinle bloklanmış seri plasenta kesitleri.

**Resim 2.** Ölçüm cetvelinin camlara alınmış seri kesitler üzerine uyarlanması.

**Resim 3.** İmmunhistokimya ile CD94+NKG2A taşıyan uNK hücreler

**Resim 4.** Fiziksel disektör prensibi

**Resim 5.** CD45+CD56+CD159a+ (CD94+NKG2A) taşıyan hücrelerin flovsitometri ile gösterilmesi

# İÇİNDEKİLER

|                                 |      |
|---------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR                        | I    |
| ÖZET                            | II   |
| SUMMARY                         | IV   |
| KISALTMALAR                     | VI   |
| TABLolar                        | VII  |
| GRAFİKLER                       | VII  |
| RESİMLER                        | VII  |
| İÇİNDEKİLER                     | VIII |
| 1.GİRİŞ VE AMAÇ                 | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER               | 3    |
| 2.1.Prematurite                 | 3    |
| 2.1.1.Prematurite Sıklığı       | 3    |
| 2.1.2. Prematurite Nedenleri    | 4    |
| 2.1.3 Prematurite Sorunları     | 4    |
| 2.1.4. Prematuritenin Önlenmesi | 5    |

|  |    |
|--|----|
| <b>2.2.Preeklampsi</b>                       | 5  |
| 2.2.1. Preeklampsi Sıklığı                   | 5  |
| 2.2.2. Preeklampsinin Tanısı                 | 6  |
| 2.2.3. Preeklampsi Etiyolojisi ve Patogenezi | 6  |
| 2.2.4. Preeklampsi Komplikasyonları          | 8  |
| <b>2.3.İmmün Cevap</b>                       | 8  |
| 2.3.1.Natural Killer Hücre                   | 9  |
| 2.3.1.1.Periferik Natural Killer Hücre       | 11 |
| 2.3.1.2. Uterin Natural Killer Hücre         | 11 |
| 2.3.2.Gebelik İmmünolojisi                   | 13 |
| 2.4. Stereolojik İnceleme                    | 13 |
| <b>3.MATERYAL METOD</b>                      | 14 |
| <b>4. BULGULAR</b>                           | 25 |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                           | 33 |
| <b>6. SONUÇ</b>                              | 36 |
| <b>7. KAYNAKLAR</b>                          | 37 |



## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Prematürite, infant mortalite ve morbiditesini en önemli sebebidir ve gittikçe artmaktadır (Fogleman KA, 2007). Neonatal ölümlere en sık 1. dönemde yani ilk 24 saat içinde rastlanır ve tüm bebek ölümlerinin %65'ini kapsar. En sık görülen neonatal ölüm nedenleri; prematürite, düşük doğum ağırlığı ve konjenital malformasyonlardır (Ed. Behrman RE,2008).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2012'de yayımlanan ve 184 ülkenin yer aldığı erken doğum hakkında küresel eylem raporunda dünyada prematüre oranlarının %5-18 arasında değişmekte olduğu ifade edilirken ülkemizin 2010 canlı doğum sayısı 1.298.000, prematüre doğum oranı ise %11,97 olarak belirtilmiştir (Ed.Okumuş N. 2012).

Araştırmalara göre 2005 te Amerika da erken doğumla ilgili sadece sağlık ve eğitim harcamaları ve erken doğum için harcanan iş kaybının (üretkenlik kaybı) maliyetinin 26 milyar dolardan fazla olduğu belirtilmiştir (PeriStats [online database],2006).

Hastanemizde Dr. F. ÇELİK' in yaptığı tez çalışmasında 2005 yılından beri otomasyon sistemi başlamasıyla yapılan kayıt sistemi ile çok düşük doğum ağırlıklı prematurelerin maliyet ortalaması hasta başına  $9.112.2 \pm 9.028.3$  TL olarak hesaplanmıştır (Çelik F. 2007).

Dünya Sağlık Örgütü ve Dünya Bankası 2006 özel programı verilerine göre tüm gebeliklerin %5-8'ini etkileyen preeklampsi, anne ölümlerinin de %16'sından sorumludur. Tüm dünyada her yıl yaklaşık 63.000 gebe preeklampsi nedeniyle kaybedilmektedir (UNDP/UNFFA/WHO/WBSP, 2006). Dünya Sağlık Örgütü ve Dünya Bankası 2006 araştırması raporu verilerine göre ülkemizde preeklampsi sıklığı % 5,3 olarak saptanmıştır (Khan K. 2006).

Ayrıca yenidoğan ölümlerinin altıda biri ve yenidoğan ünitelerinde tedavi gören bebeklerin beşte biri preeklampsiye bağlı sorunlar nedeni ile gerçekleşmektedir (Khan K. 2006).

Prematüritenin önlenmesi için doğumun başlama zamanı ve mekanizmasının anlaşılması gereklidir. Desidual CD94+ Natural Killer hücrelerin (Uterin Natural Killer hücreler) gebeliğin devamını sağladığı bilinmektedir. Bunların da CD94/NKG2A (inhibitör) ve CD94/NKG2C (aktivatör) türleri vardır. Ayrıca NK hücrelerin gebelik sırasında da önemli olduğu gösterilmiştir. Çünkü desidual lenfositlerin %70'ini NK hücreleri oluşturmaktadır. Bunlar fenotipik olarak periferik NK hücrelerinden farklıdır. Gebe uterusundaki NK hücrelerin en önemli görevi fetal dokuları maternal immün saldırıdan korumaktır (Agrawal S. 2003).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda preeklampsi ve tekrarlayan düşüklerde de NK hücrelerinin rolü olduğu gösterilmiştir (Hiby SE. 2004).

Bu çalışmada normal doğum, sezaryen doğum ve preeklampitik doğum yapan kadınların plasental desidualarında inhibitör uNK (CD56<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup>) hücreler değerlendirilerek, doğum zamanlaması ile bu hücrelerin ilişkisi olup olmadığının: desidual NK hücre yüzdesi = C/S doğum > normal doğum > preeklampitik doğum şeklinde kurulan hipotez ile araştırılması amaçlandı.

**Anahtar kelimeler:** Doğum zamanlaması, uNK hücre, Placenta, CD94, NKG2A

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. PREMATÜRİTE**

Prematüre yenidoğan, annenin son adet tarihinin başlangıcından itibaren 37. gestasyon haftasının son gününde (259.gün) yada daha öncesinde doğmuş bebekleri tanımlamaktadır (Engle, W.A. 2006- Can G. - İnce Z. (2010).

Prematürite, infant mortalite ve morbiditesini en önemli sebebidir ve gittikçe de artmaktadır (Fogleman KA. 2007).

Prematüriteden ayrı olarak doğum ağırlığı 2500 gram ve daha düşük doğum tartılı yenidoğan bebekler düşük doğum ağırlıklı (DDA) yenidoğan grubunu oluşturur. DDA; prematürite, intrauterin büyüme geriliği veya her ikisine de bağlı olarak gelişebilir. Doğum ağırlığı 1500 gramdan düşük olan bebeklere, çok düşük doğum ağırlıklı (ÇDDA) bebekler denilmektedir. Doğum ağırlığı 1000 gramın altında olan bebekler ise aşırı düşük doğum ağırlıklı (ADDA) bebekler denilmektedir (Stoll BJ. 2004).

#### **2.1.1. PREMATÜRİTE SIKLIĞI**

Tüm dünyada yenidoğan mortalite ve morbiditesinin en önemli nedeni düşük doğum ağırlığı ve prematüritedir. Amerika Birleşik Devletleri' inden son yayınlanan istatistiklere göre 2007 yılında prematüre bebek doğum oranı %12,7, DDA doğum oranı %8,2 ve ÇDDA doğum oranı %1,4 olarak bildirilmiştir (Heron M. 2010).

Türk Neonatoloji Derneği'nin 2005 yılında toplam 28 merkezde (ağırlıklı olarak üniversite hastanelerinde) yaptığı çalışmada ise doğum ağırlıklarına göre mortalite oranları 500-749 gram arasında doğanlar için %70, 750-999 gram arasında doğanlar için %45, 1000-1249 gram arasında doğanlar için %21, 1250-1499 gram arasında doğanlar için %5 olarak bulunmuştur.

Türk Neonatoloji Derneği Bülteni verilerine göre 2010 yılında aynı merkezde doğan bebeklerin gebelik yaşlarına göre mortaliteleri 22-24.haftada %74,9, 25-

26.haftada %58,24, 27-28.haftada %23,8, 29-30.haftada %14,6, 31-32. haftada %5,9, 33-34.haftada %3,1, 35-36.haftada %1,5, 37-42.haftada %2,4, 42.hafta üzerinde %2,8 olarak bildirilmiştir (Türk Neonatoloji Derneği. 2012).

Neonatal ölümlere en sık 1. dönemde yani ilk 24 saat içinde rastlanır ve tüm bebek ölümlerinin %65'ini kapsar. En sık görülen neonatal mortalite nedenleri; prematürite, düşük doğum ağırlığı ve konjenital malformasyonlardır (Ed. Behrman RE,2008).

### **2.1.2. PREMATURİTE NEDENLERİ**

Erken doğumun çeşitli sebepleri vardır. Fetal, maternal, plasental ve uterin faktörler arasında kompleks bir etkileşim vardır. Çoğu olguda preterm doğumun nedeni saptanamaz. Preterm doğumun belirlenebilir nedenleri; fetal nedenler (fetal distres, çoğul gebelik, eritroblastozis fetalis, nonimmün hidrops), plasental nedenler (plasental disfonksiyon, plasenta previa, abrupsiyo plasenta), uterin nedenler (iki boynuzlu uterus, servikal yetmezlik), maternal nedenler ( **preeklampsi**, eklampsi, kronik hastalıklar enfeksiyonlar, sigara içimi, alkol veya diğer madde bağımlılığı, 20 yaş altında, 35 yaş üstünde olmak, beyaz ırk dışında olmak, düşük sosyoekonomik ve kültürel düzey, beslenme bozukluğu, prenatal bakım eksikliği, kötü obstetrik öykü), diğer nedenler (erken membran rüptürü, iyatrojenik, travma, amniyotik sıvı volüm anomalileri ) (Can G. 2002, Stoll BJ. 2004).

### **2.1.3. PREMATURE SORUNLARI**

Preterm bebeklerde görülen neonatal dönem sorunları, bebeğin matüritesi ile ters orantılıdır (O. Neyzi, T. Ertuğrul (eds). Pediatri cilt I). Gebelik haftası düşük olanlarda, neonatal döneme ait sorunlara daha sık rastlanmaktadır. Bu sorunlar prematürelerdeki morbidite ve mortalitenin artmasına katkıda bulunur. Neonatal dönemde prematüriteye bağlı solunumsal, kardiyovasküler, hematolojik, gastrointestinal, metabolik-endokrin, merkezi sinir sistemi, renal problemler, enfeksiyonlar görülebilmektedir (Ed. Behrman RE. 2008).



#### **2.1.4. PREMATURİTENİN ÖNLENMESİ**

Prematüreler normal doğanlarla karşılaştırıldığında, beyin felci, duyu kaybı, solunum sistemi hastalıklarına, öğrenme zorluklarına yakalanma oranları daha yüksektir. Erken doğumla ilgili hastalıklar genellikle hayatın ileriki dönemlerine sarkar ve büyük psikolojik, fiziksel ve ekonomik sonuçlar doğurur (Petrou S. 2003-2005).

Hastanemizde Dr. F. ÇELİK' in yaptığı tez çalışmasında 2005 yılından beri otomasyon sistemi başlamasıyla yapılan kayıt sistemi ile çok düşük doğum ağırlıklı prematurelerin maliyet ortalaması  $9.112.2 \pm 9.028.3$  TL olarak hesaplanmıştır (Çelik F. 2007).

Gebelik öncesi veya erken gebelikte erken doğum için risk faktörlerinin belirlenmesi prematuritenin önlenmesi için büyük katkı sağlaması beklenir.

#### **2.2. PREEKLAMPSİ**

Preeklampsi, vazospazm ve endotelyal aktivasyona sekonder azalmış organ perfüzyonu ile karakterize gebeliğe özgü bir sendromdur. Anne ve fetus bir arada etkilenir; annede renal, hepatik, serebral ve koagulasyon sistemlerinde bozukluklara, fetusda ise gelişme kısıtlılığı, fetal distress, ölüm ve erken doğuma sebep olabilir (Cunningham FG. 2001).

##### **2.2.1. PREEKLAMPSİ SIKLIĞI**

Gebelikte yüksek kan basıncı, idrarla protein kaybı ve ödem olarak tanımlanan preeklampsi tüm dünyada anne ölümlerinde kanama, enfeksiyon ve düşüklerden sonra dördüncü sırada yer almaktadır (WHO, 2005).

Dünya Sağlık Örgütü ve Dünya Bankası 2006 özel programı verilerine göre tüm gebeliklerin %5-8'ini etkileyen preeklampsi, anne ölümlerinin %16'sından sorumludur. Tüm dünyada her yıl yaklaşık 63.000 gebe preeklampsi nedeniyle kaybedilmektedir (UNDP/UNFFA/WHO/WBSP,2006).

Dünya Sağlık Örgütü ve Dünya Bankası araştırması 2006 raporu verilerine göre ülkemizde preeklampsi sıklığı % 5,3 olarak saptanmıştır (Khan K. 2006).

Ayrıca yenidoğan ölümlerinin altıda biri ve yenidoğan ünitelerinde tedavi gören bebeklerin beşte biri preeklampsiye bağlı gelişen sorunlar nedeni ile gerçekleşmektedir (Khan K. 2006).

### **2.2.2. PREEKLAMPSİ TANI KRİTERLERİ**

Perinatal, neonatal ve maternal morbidite ve mortaliteyi artıran preeklampsinin önlenmesi, perinatal ve maternal sonuçları iyileştirebilir. Bu nedenle preeklampsinin erken saptanması uygun koruyucu önlemlerin alınmasına yardımcı olur (Tjoa ML. 2004).

Preeklampsi tanısı 20 gebelik haftasından önce normal kan basıncı ölçüleri olan kadında bu haftadan sonra sistolik kan basıncının 140 mmHg ve üzeri ile diastolik kan basıncının 90 mmHg ve üzerinde ölçülmesi 24 saatlik idrarda 300 mg ve üzerinde protein atılımı veya spot idrarda protein ölçümünde (1+) ve üzerinde olarak tanımlanır.

Preeklampside hipertansiyon, olguların erken ve kesin bulgusudur.

### **2.2.3. PREEKLAMPSİ ETYOLOJİSİ VE PATOGENEZİ**

Preeklampsinin ortaya çıkış nedeni halen kesinlik kazanmasa da, günümüzde birden fazla etkenin rol oynadığı kabul edilmektedir. Hastalığın gebeliğe özgün olması ve plasentanın tahliyesi ile bulguların tamamen gerilemesi göz önüne alındığında, preeklampsi gelişiminde en önemli rolün plasentaya ait olduğu kabul edilmiştir (Hahn S. 2006).

Nulliparite, 35 yaşından büyük olmak, çoğul gebelik, obezite, aile öyküsü, önceki gebelikte preeklampsi öyküsü olması, pregestasyonel diabet öyküsü, kronik hipertansiyon, vasküler ve konnektif doku hastalıkları, nefropati, antifosfolipid antikor

sendromu, Afrika- Amerikan ırkından olmak preeklampsi için saptanabilen bazı risk faktörleri olarak bilinmektedir (Cunningham FG. 2001).

Preeklampsi etiolojisinde çeşitli teoriler öne sürülmüştür. Anormal veya artmış immun sistem yanıtı, genetik yatkınlık, anormal koagülasyon veya trombofililer, prostaglandin aktivitelerindeki değişimler, endotel hücre hasarları, nitrik oksit düzeylerindeki değişimler, serbest oksijen radikallerindeki artış, anormal sitotrofoblastik invazyon, anormal kalsiyum metabolizması teorilerden birkaçıdır (Scott JR. 2003).

Gebeliğin yabancı semi allojenik fetal grefte uyum sağlayabilmek için humoral ve hücresele aracılı bazı immünolojik fonksiyonların baskılanmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Gebelerde görülen bu fizyolojik değişiklikler, allograftın maternal dokuyla karşılaşmasından hemen sonra başlar. İmmünolojik bir tolerans gelişerek hem sistemik dolaşımında hem de uteroplasental kan akımında değişiklikler oluşur (Cunningham FG,2001).

Normal gebeliklerde T-helper 1(Th1) ve T helper-2(Th2) lenfosit dengesi Th2 lehinedir. Bu denge sitotoksik Th1 sitokinlerin olumsuz etkilerini baskılayarak, fetal allografta yönelik maternal immün toleransın oluşmasına olanak sağlar. Preeklampside ise Th1 hücrelerin aktivasyonu Th2 hücrelerden daha fazladır. Dolayısıyla Th1/Th2 dengesi Th1 lehine değişir ve Th1 lenfositlerin salgıladıkları sitokin seviyeleri preeklamptik olguların plazmalarında yüksektir. Th1 hücrelerin salgıladıkları sitokinler de plasenta oluşumu ve endotel fonksiyonları açısından olumsuzluklara neden olarak preeklampsi tablosunun ortaya çıkmasına yol açabilirler (Saito S,1990).

Günümüzde, damar endotel hasarı ve vazospazmın preeklampsi patofizyolojisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Vazospazm ile kan akımına karşı direnç ve arter basıncında artış olur. Damar endotel hasarı ve vazospazm oluşumunda artmış presör cevap, prostoglandinler, nitrik oksit (NO), endotelin, vasküler büyüme faktörü, genetik predispozisyon, immünolojik faktörler, inflamatuvar faktörler ve sonuçta endotelial hücre aktivasyonu ile yakın ilişki gösterilmiştir (ACOG,2002).

#### 2.2.4. PREEKLAMPSİNİN KOMPLİKASYONLARI

1- Fetal Komplikasyonlar: Fetal gelişme geriliği, perinatal ölüm (dekolman plasentaya bağlı), prematüre doğum, oligohidroamnios, fetal asfiksi.

2- Maternal Komplikasyonlar: Konvülsiyon, akut böbrek yetmezliği, kalp yetmezliği, pulmoner ödem, intrakranyal kanama, körlük, karaciğer subkapsüler hematomu ve rüptürü, trombositopeni, dissemine intravasküler koagülasyon, HELLP sendromu (Hiby SE. 2004).

#### 2.3. İMMÜN CEVAP

Değişik patojenlere karşı immün cevabı oluşturup yöneten hücre alt grubu CD4+ T hücrelerdir. Bu süreç naiv CD4+ T hücrelerinin antijen sunucu hücre (ASH)'nin antijeni sunumu, *kostimülatör* (yardımcı uyarıcı) molekülleri eksprese etmesi ve T cell reseptör (TCR) üzerinden antijenin tanınması ile efektör T veya yardımcı T (Th) hücrelere dönüşmesini içerir. Hücre içi patojenlere karşı IL2/IFN $\gamma$ -Th1 hücrelerinin, hücre dışı patojenlere karşı IL4/IL10-Th2 hücrelerinin görevli olduğunun iyi bilinmesinin yanı sıra, yakın zamanda immün cevabı yönlendiren ve Th17 olarak adlandırılan bir başka yardımcı T hücre grubu da olduğu belirlenmiştir. Bu sonuncu hücre grubu hücre dışı hasara cevap olarak yüksek miktarda IL17 üretmekte ve enflamasyon oluşturmakta ve ayrıca otoimmünite gelişiminde de rol oynamaktadır. Ortamda bulunan sitokinlerin etkisiyle ve görevlerine göre yardımcı T hücreleri hasarlı bölgedeki özgül mikroorganizmalarla savaşabilmekte, CD8 sitotoksik T hücreleri gibi diğer efektör T hücreleri çağırabilmekte ve antikor üreten B hücreleri gibi immün yanıtın diğer kollarını da aktive edebilmektedir. Aynı zamanda, CD4+ T hücreleri arasından organizmaya özgü (self) antijen ve zararsız dış antijenlere karşı immün cevaplar oluşmasını önleme, patojenlere karşı yıkıcı immün cevapların kontrolünü sağlayabilen hücre alt grupları da ortaya çıkmaktadır. Bu hücrelere regülatör T hücre (Treg) denilmektedir, bunlar periferik toleransın sağlanmasından sorumludur (Bachetta, 2007).

### 2.3.1. NATURAL KİLLER HÜCRELERİ

NK hücreleri, virüsle enfekte hücreler ve tümör hücrelerine karşı vücudu ilk savunan, kemik iliği kökenli lenfositlerdir. T ve B lenfositlerinden farklı olarak yüzeylerinde somatik yeniden düzenleme ile (rearanjman) klonal olarak dağılım gösteren immunoglobulin ve T hücre reseptörleri bulundurmazlar (Orange JS,2006). NK hücreleri geleneksel olarak, çoğunlukla CD3-, CD56+ olarak karakterize edilir. Sitotoksiteleri hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerinin aktivatör ve inhibitör sinyalleri arasındaki dengeye bağlıdır (Abbas AK,2005). NK hücreleri çok sayıda sitoplazmik granüller içeren, büyük lenfositler oldukları için aynı zamanda büyük granüler lenfositler olarak da adlandırılır (Orange JS,2006).

Kemik iliğinde, hematopoietik kök hücreden köken alır. Hematopoietik kök hücreden ortak lenfoid progenitör (CLP) hücreler oluşmaktadır. İn- vivo çalışmalarla da CLP'den NK, T ve B hücrelerin geliştiği gösterilmiştir. Sonraki basamakta CLP'den hem T hücrelere hem de NK hücrelere farklılaşabilen T/NK progenitörü (T/NKP) oluşur. T/NKP kan, timus, dalak ve karaciğer gibi çeşitli fetal organlarda tanımlanmıştır (Ikawa T,1999- Douagi I,2002). T/NKP daha sonra T ve NK hücrelerine farklılaşır (Kim S,2002).

Olgun periferik NK hücreleri kemik iliğinden çıktıktan sonra primer olarak kan, dalak ve karaciğerde hatta uterusu yerleşirler ve lenfosit popülasyonunun %5-15'ini oluştururlar. NK hücrelerinin lokalizasyonlarını belirleyen integrinler ve kemokinlerin varlığı bilinmektedir (Frey M,1998). Ayrıca immünohistokimyasal çalışmalarla NK hücrelerinin dalağın kırmızı pulpasında ve karaciğerde sinüzoidal bölgede lokalize olduğu gösterilmiştir (Dokun AO,2001).

NK hücreleri gelişim basamaklarında yüzeylerinde T hücre reseptörleri, immunoglobulinler veya CD3 sentezlemezler. NK hücre yüzeyinde bulunan ve en sık sentezlenen molekül nöral hücre adezyon molekül-1 (CD56)'dir (Orange JS,2006).

NK hücrelerinin en önemli rolü enfeksiyonlara özellikle viral enfeksiyonlara karşı ilk savunmayı yapmaktır. NK hücreleri virüsle enfekte hücreyi ya doğrudan

sitotoksiste yoluyla öldürür ya da ürettikleri sitokinlerle viral replikasyonu durdururlar. Çoğu virüsler de doğal ve adaptif immünite tarafından tanınmamak için çeşitli stratejiler geliştirirler (Cosman D. 1997).

NK hücreleri ayrıca intrasellüler bakteriler, piyojenik bakteriler, mantarlar ve bazı protozoaların neden olduğu enfeksiyonlara karşı savunmada da rol alırlar. NK hücrelerinin diğer en önemli görevi ise tümör hücrelerini ortadan kaldırmaktır. Bunu genellikle sitotoksiste ile sağlamaktadırlar (Orange JS. 2006).

Son zamanlarda ise özellikle bazı KIR (killer immunglobulin-like-receptor) haplotipleri ile belirli hastalıklara yatkınlık arasındaki ilişki üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bunlardan bazıları: Hepatit C, HIV, psöriatik artrit, psöriazis, tip1 diabet, skleroderma, preeklampsi, tekrarlayan düşükler, servikal neoplazilerdir (Orange JS. 2006).

Ayrıca NK hücrelerin gebelik sırasında da önemli olduğu gösterilmiştir. Çünkü desidüadaki lenfositlerin %70'ini NK hücreleri oluşturmaktadır. Bunlar fenotipik olarak periferik NK hücrelerinden farklıdır. Gebe uterusundaki NK hücrelerin en önemli görevi fetal dokuları maternal immün saldırıdan korumaktır (Agrawal S. 2003).

Yapılan çalışmalarda preeklampsi ve tekrarlayan düşüklerde de NK hücrelerinin rolü olduğu gösterilmiştir (Hiby SE. 2004).

Son yıllarda alloimmün fakörlerde yapılan çalışmalar NK hücrelerinin implantasyon ve gebeliğin devamında rolü olabileceğini göstermiştir. Ayrıca NK hücreleri erken gebelikte ve implantasyon döneminde endometriyumdaki predominant lökosit popülasyonu olduğundan dolayı en geniş kapsamlı çalışılan hücrelerdir.

Natural Killer hücreleri 2 gruba ayrılır:

1. Periferik NK hücreleri
2. Uterin NK hücreleri

### 2.3.1.1. PERİFERİK NK HÜCRELERİ

Periferik NK hücrelerinin fenotipine bakacak olursak; NK hücreleri periferik kan lenfositlerinin % 10-15'ini oluşturur. Tek fenotipik karakteri ve fonksiyonel özellikleri olan lenfositler topluluğudur. Prototipik yüzey antijenleri CD56'dır (Tuckerman E. 2007).

Periferik NK hücreleri CD56 yüzey antijeninin yoğunluğuna yani ekspresyonuna göre 2 gruba ayrılırlar. Büyük kısmı yani % 90'ı CD56<sup>sönük</sup>tür ve fazla miktarda CD16 içerir; geriye kalan % 10'luk kısım CD56<sup>parlak</sup>tür ve düşük miktarda CD16 içerir ya da hiç içermez. CD56<sup>parlak</sup> grup NK hücre kökenli immünregülatör sitokinlerin ana kaynağı iken CD56<sup>sönük</sup> hücreler daha sitotoksiktir ve KIR ailesinin üyelerini eksprese eder (Tuckerman E. 2007).

### 2.3.1.2. UTERİN NK HÜCRELERİ

Endometrium önemli sayıda lökosit ev sahipliği yapar. Bu lökositlerin oranı ve fenotipi menstrüel siklus boyunca değişiklik gösterir. Lökositler stromal hücrelerin, proliferatif fazda % 10'unu, sekretuar fazda % 20'sini ve erken gebelikte % 30'unu oluşturur. Endometriyumdaki en büyük lökosit popülasyonu large granuler lenfosit (LGL) olarak da adlandırılan NK hücreleridir. Bu hücreler ilk trimester desiduasında endometriyal lökositlerin % 70'ini oluşturur (Hiby SE. 2004).

Uterin NK (uNK) hücrelerinin fenotipine bakacak olursak; uNK hücreleri CD56 yüzey antijenini içerirken CD16'yı hiç içermezler yada çok az içerirler. uNK hücrelerinin yaklaşık %90'ı CD56<sup>parlak</sup>, %10'u CD56<sup>sönük</sup>tür (Agrawal S. 2003).

Periferik kandaki küçük miktardaki CD56<sup>parlak</sup> hücrelerden köken aldığı düşünülmektedir. Bu yüzden uNK hücreleri genellikle CD16<sup>negatif</sup> CD56<sup>pozitif</sup> ya da CD56<sup>parlak</sup> şeklinde gösterilir (Agrawal S. 2003).

Plasentanın, uterusun desiduası içine tutunduğu villusları sinsityotrofoblastik hücrelerden oluşur. Villus dışı sitotrofoblast hücreleri ise maternal desiduanın içine

giren hücre sütunlarını oluşturur (Aagard-Tillery, 2006). Desiduada iki büyük hücre grubunun varlığı gösterilmiştir; Uterin (desidual) Natural Killer (uNK) hücreler ve makrofajlar. Uterin NK hücreler  $CD3^-CD16^-CD56^{++}CD94^{++}$  özellikleri ile tanınır. Bu hücreler klasik HLA klas I moleküllerinin (HLA ABC) yanı sıra, nonklasik doku uygunluğu molekülleri olan HLA-G ve E'yi, taşıdığı killer Ig-benzeri reseptör (KIR) ve lektin tipi (CD94/NKG2A) reseptörleri ile tanıyabilirler. Bunların da CD94/NKG2A (inhibitör) ve CD94/NKAG2C (aktivatör) türleri vardır (Kusumi, 2006). İmplantasyon esnasında da desidudadaki en büyük lökosit grubunu oluştururlar. Periferik kandaki NK hücreleri ise %90 oranında  $CD56^{zayıf}CD16^+$ , kalan %10'u ise  $CD56^{parlak}CD16^-$  tir. Öncekiler daha sitotoksik olup KIR molekülleri taşırlar, ikinci tip NK hücreleri ise daha az sitotoksik olup KIR taşımaz, CD94/NKG2 reseptörleri taşır ve asıl sitokin üreten NK hücreleridirler (Wold, 2005). İlk iki gebelik döneminde desidudadaki NK hücreleri fetusu koruyan özel hücrelerdir ve uNK adını alırlar (Guleria, 2007). Bu hücreler ayrıca plasental damarların gelişimini ve desidulizasyonu sağlar (Hanna, 2006). Uterin NK hücrelerin aksine daha ziyade periferik kanda bulunan NK hücreleri ise sitotoksik özellik taşırlar (cNK), desiduada %5 oranında bulunurlar (Le Boutellier. 2006).

Desidudaki dendritik hücreler (DH) periferik kandakiler gibi  $CD83^+CD11c^+CD80^+CD86^+$  olmalarına rağmen, farklı olarak CD14 ve CD15 taşımazlar. T hücre sitolitik aktivitesini arttıran IL-12 üretme kapasiteleri düşük, IL-10 üretimleri ise yüksektir. Bu da desiduada Th2 tipi T lenfositlerin baskın olmasını sağlamaktadır (Dietl, 2006). Gebelik esnasında Th2 baskınlığı olduğuna (Wegmann, 1993; Piccinni, 1993) ve olmadığına (Saito, 1999; Chaouat, 2002) dair çalışmalar vardır. Saito ve ark. göre ise gebelik esnasında Th1/Th2/Tr1/Th3 ve  $CD4^+CD25^+$  Treg (regülatuar T hücresi) dengesi vardır (Saito. 2007).

Maternal Treg ve uNK hücreleri gebeliğin devamını sağlar (Aluvihare, 2004, Hanna, 2006), o halde, bu hücreler doğum zamanının belirlenmesi ile de ilişkili olmalıdır. Elektif sezaryen ile elde edilen desiduanın gebelikteki durumu, normal doğum ile elde edilen desiduanın ise doğumun başlaması ile ilgili inflamatuar olayları yansıttığı düşünülebilir.



### 2.3.2. GEBELİK İMMÜNOLOJİSİ

Bundan elli yıl kadar önce Medavar (Medavar, 1953) fetusun babaya ait antijenleri taşıması sebebiyle annenin *alloimmün* cevabından korunmasını sağlayacak bir tolerans mekanizması olması gerektiğini ileri sürmüştür. O zamandan günümüze kadar büyük gelişme sağlanmasına rağmen, bilim adamları hala gebeliğin immünolojik paradoksunu anlamaya çalışmaktadır. Bu konunun anlaşılması gebelik immünolojisindeki sapmaların yol açtığı neonatal ve maternal hastalıkların teşhisi ve tedavisi bakımından çok önemlidir. Yenidoğan açısından; eritrosit ve trombosit *alloimmünizasyonu*, yenidoğanın sistemik lupus eritematozusu, miyastenia gravis, obstetrik açıdan; spontan düşüklükler, fetal ölüm, preeklampsi, fetal büyüme geriliği, plasental yetmezlik, erken doğum gibi olaylar en azından kısmen immünolojik mekanizmalarla oluşur (Aagard-Tillery. 2006).

Döllenmiş yumurta hem annenin hem de babanın antijenlerini taşıdığı için bir *semi-allograft* olarak kabul edilir (Aagard-Tillery, 2006). Bu sebeple, maternal-fetal immünolojik tolerans konusundaki araştırmalar transplant immünolojisinde de çok önemlidir (Lapaire, 2007). Ancak anne ile fetal dokular arasındaki immünolojik etkileşimlerin yavrunun büyüme ve gelişmesine hizmet etmekte olduğu unutulmamalıdır (Aagard-Tillery 2006).

### 3. STEREOLİK İNCELEME

Stereolojik yöntemlerin en önemli özelliği, iş yükünü azaltarak, istenen doğrulukta sonuçların elde edilmesini sağlamalarıdır. Örneğin bir organdaki toplam hücre sayısını belirlemek için, o organın tümünü alıp hücreleri teker teker saymak çoğunlukla imkansızdır. İlgilenilen yapının tümünü temsil edebilecek küçük bir parça üzerinde örnekleme yoluyla bir niceliği hesaplamak ve istediğimiz niceliğin değerini, bu örneğin tüm yapıya olan oranına bakarak hesaplamak mümkündür. Tanecik (hücre içi granül vs) sayımı için kullanılan temel stereolojik yöntemlerden birisi fiziksel disektördür. Aralarında belli bir mesafe olan iki ardışık kesitin fiziksel olarak karşılaştırılmasını içerir. Hücre, hücre içi tanecik sayımı ve hacim hesaplamalarında kullanılan stereolojik metodlar altın standard olarak kabul edilmektedir (Sterio, 1984).

### 3. MATERYAL VE METOD

Etik kurul onayı alındıktan sonra çift kör, prospektif, gözlemsel olarak tasarlanan bu çalışmaya elektif (doğum eylemi başlamamış miadında) 21 sezaryen, 16 normal spontan vajinal doğum ve 11 preeklampitik olmak üzere toplam 48 gebe dahil edildi. Preeklampsi vakaları bu süreçte çalışmada kullanılan maddelerin kullanım süreleri yeterli olmadığı için 11 gebe ile sınırlı kaldı. İmmunhistokimyasal çalışma her gruptan rastgele seçilmiş 5'er gebede yapıldı. Flovsiometri ve immunohistokimyasal inceleme yöntemleri kullanıldı.

#### ARAŞTIRMAYA DAHİL EDİLME KRİTERLERİ

- Vajinal doğum
- elektif sezaryen ile doğum
- Preeklampsi
  - 20. Haftasından sonra kan basıncı >140/90 mmHg
  - spot idrarda ( +1 yada 30mg/dl) protein oranı kullanıldı.

#### ARAŞTIRMAYA DAHİL EDİLMEME KRİTERLERİ

- Maternal ateş
- Maternal atopi, kollajen doku hastalığı, otoimmün hastalık ve immün yetmezlik
- Erken membran rüptürü (>18 saat)
- Mekonyumlu amnion sıvısı
- *Plasenta previa, abruptio plasenta*
- Makat geliş
- Çoğul gebelik
- Doğumsal anomali
- Antenatal steroid ve ilaç kullanımı
- <7 apgar, SGA (gebelik yaşına göre küçük doğum).

Ayrıca, bütün plasentalar bir histolog tarafından değerlendirilerek korioamnionit bulguları olanlar alınmadı.

### **Alınan Plasenta Kesitlerinin Stereolojik Metodla Değerlendirilmesi:**

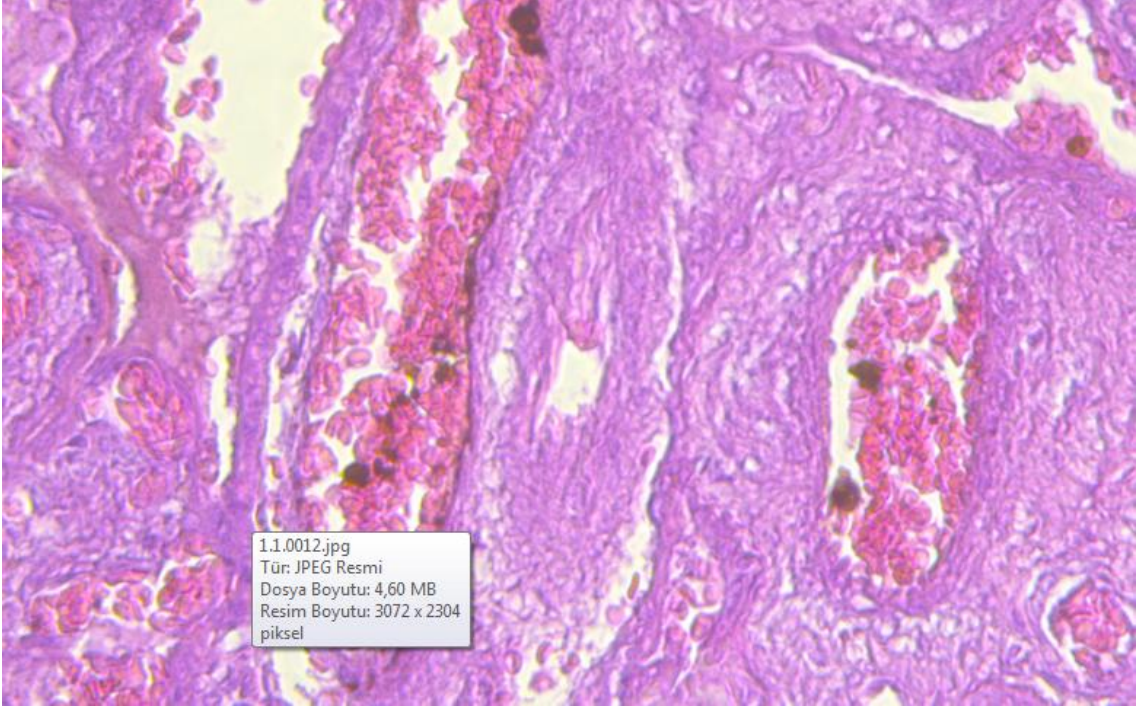
Plasenta örnekleri önce %10'luk formalinde ( 10 ml %40'lık formaldehit, 90 ml su) 48-72 saat boyunca fikse edildi. Daha sonra doku örnekleri dereceli alkol serileri ile dehidrate edilip ksilol serilerinde şeffaflandırılarak parafinde bloklandı. Parafin bloklardan mikrotom ile seri olarak kesilen 4-6 mikron'luk kesitler cam lamalar üzerine alındı. Bu kesitler genel histolojik yapıyı değerlendirmek amacıyla Hematoksilen- eozin ile boyandı.

Stereolojik ölçümlerimiz Cavalieri hacim ölçüm metoduna dayanmaktadır. Bu metodun ilk önemli kuralına göre, ilgilenilen objenin hacmini hatasız olarak hesaplamak için eşit uzaklıkta, paralel ve seri kesitler kullanıldı.

Yapılan bir ön çalışmayla, ilgili organdan alınacak kesit kalınlığının sınırı belirlendi. Bu işlem yine stereolojinin temel prensiplerinden “**hata katsayısı**” göz önünde bulundurularak gerçekleştirildi. Bu aralık belirlendikten sonra yine kurallar dâhilinde olan sistematik rastgelelik dikkate alınarak ilgili organdan geçen tüm görüntüler elde edilerek değerlendirildi. Bu çalışmada alınan seri kesitlerden Leica DM 5000 model ışık mikroskobu ile elde edilen görüntüler (**Resim 1**) Adobe Photoshop programında açıldıktan sonra ilgili alan üzerine Resim 2’de görülen noktalı ölçüm cetveli düşürülerek, görüntüler değerlendirildi.

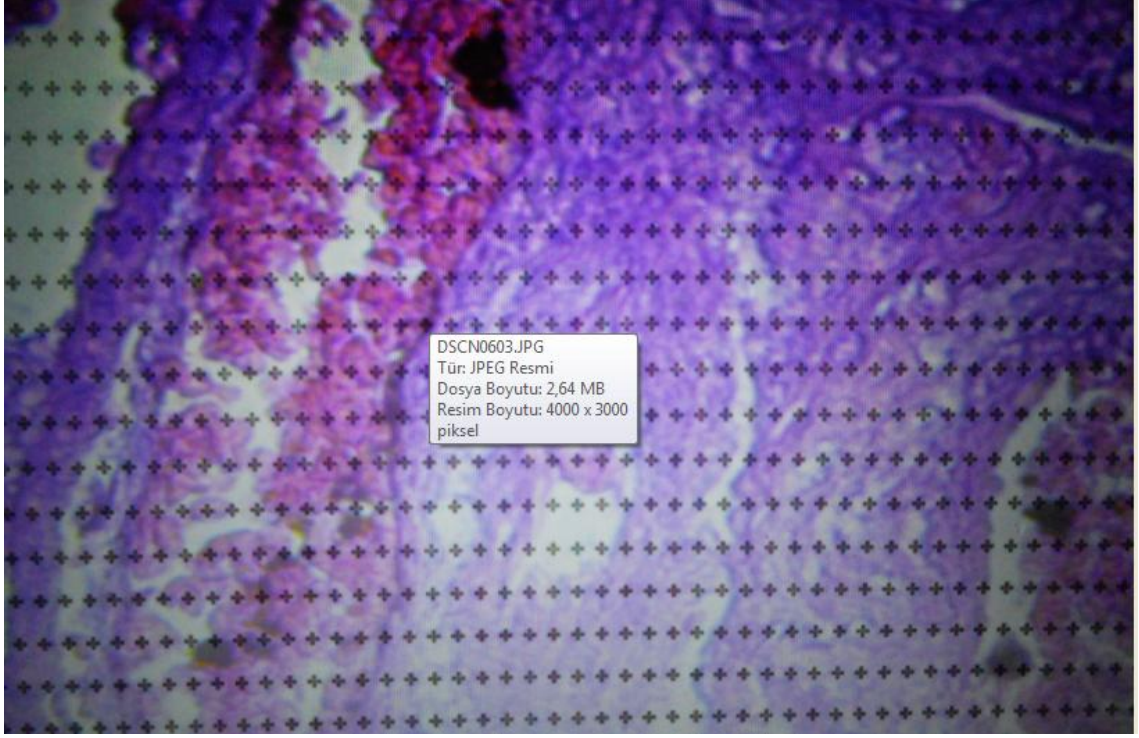
Kesit profilinin hesaplandığı alana göre hazırlanmış noktalı ölçüm cetvelinin boyutu  $k=2,5$  mm şeklindeydi.

Noktalı ölçüm cetvelinin nokta yoğunluğu uygun **HK** (Hata katsayısı= coefficient of error)’a göre belirlenmiş seri ışık mikroskobik görüntü sayısı göz önüne alınarak belirlendi. HK Gundersen and Jensen’in 1987’de geliştirdikleri formüle göre hesaplandı. Kabul edilebilir HK (hata katsayısı) elde edebilmek için yaklaşık 13-15 kesitin yeterli olduğu tesbit edilerek çalışma buna göre yapıldı.



**Resim 1.** Parafinle bloklanmış seri plasenta kesitleri.

Kesitler üzerinde hesaplar yapılırken seri kesit görüntülerindeki ilgili alanlar üzerine noktalı ölçüm cetveli rastgele olarak yerleştirildi ve ilgilenilen objeyi kesen tüm noktalar sabit kurala göre hesaplandı (**Resim 2**).



**Resim 2.** Noktalı alan ölçüm cetvelinin camlara alınmış seri kesitler üzerine uyarlanması(Cavalier Metodu)

Her test noktasının temsil ettiği alan ( $a \text{ cm}^2$ ) ve her test noktası  $k \text{ cm}$ 'dir ( $a \text{ cm}^2 = k \times k \text{ cm}^2$ ). Bu işlemi takiben scanner ve monitörün büyütme değerleri hesaplanan alan ile çarpıldı ( $\text{cm}^2$ ).

$$\text{Volume} = t \text{ (cm)} \times a/p \text{ (cm} \times \text{cm)} \times (P) \text{ cm}^3$$

**Volume:** plasenta hacmi

**t :** kesit kalınlığı

**a/p:** iki nokta arasındaki alan

**P:** kesiti kesen toplam nokta sayısı

V kesit planındaki ilgilenilen objenin (Plasentadaki villuslar yada damarlar) hacmidir, t kesit kalınlığı, a/p noktalar arası alan ve P ise kesitteki karaciğeri kesen toplam nokta sayısını göstermektedir. Her kesitte ayrı ayrı yukarıdaki formül

kullanılarak hacim değerleri hesaplandıktan sonra aşağıdaki formülle toplam plasantal villus ya da intervillöz damarların hacmine ulaşıldı.

$$\text{Total Volume} = V_1 + V_2 + \dots + V_n$$

**Total Volume:** toplam hacim

**V<sub>1</sub>:** 1. kesitin hacmi

**V<sub>2</sub>:** 2. kesitin hacmi

**V<sub>n</sub>:** n. kesitin hacmi

Hata katsayısı olarak adlandırılan Cavalieri metodunun kullanım şeklinden kaynaklanan hatayı mikroskopik görüntüler üzerinde hesaplamak için Gundersen HJ ve Jensen EB (1987) tarafından geliştirilen aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Noise} = 0.0724 \times (b/\sqrt{a}) \times \sqrt{n \times \sum P}$$

**Noise:** kesit yüz alanının kompleksliği

$b/\sqrt{a}$  : ortalama profil sınır uzunluğu/ aynı profilin ortalama alanının kökü

**n** :incelenen kesit sayısı

**P:** kesiti kesen toplam nokta sayısı

Noise, örneğin kesit yüz alanının kompleksliği hakkında bilgi veren bir değerdir,  $b/\sqrt{a}$  ortalama profil sınır (boundary) uzunluğunun aynı profillerin ortalama alanının kareköküne bölümüne eşittir, n incelenen kesit sayısıdır ve P bütün kesite değen toplam nokta sayısıdır.

$$\text{Var}_{SRS} \left( \sum_{i=1}^n a \right) = (3 \cdot (A - \text{Noise}) - 4 \cdot B + C) / 12$$

$$Var_{SRS}(\sum_{i=1}^n a) : \text{toplam alanın varyansı}$$

**A:**  $P_i \times$

**B:**  $P_i \times P_{i+1}$

**C:**  $P_i \times P_{i+2}$

Rasgele sistematik örneklemede (SRS)  $Var_{SRS}(\sum_{i=1}^n a)$  toplam alanın varyansını göstermektedir. Bu bilgi kesit örneklerinde uygun çeşitliliği sağlamak için gerekli olan yeterli kesit sayısı hakkında fikir verir.

$$TotalVar = Noise + Var_{SRS}$$

**Total Var:** Toplam varyans

**Noise:** kesit yüz alanının kompleksliği

**Var<sub>SRS</sub>:** toplam alanın varyansı

$$CE(\sum P) = \frac{\sqrt{Total Var}}{\sum P}$$

**CE:** hata katsayısı

**TotalVar:** Toplam varyans

**P:** kesiti kesen toplam nokta sayısı

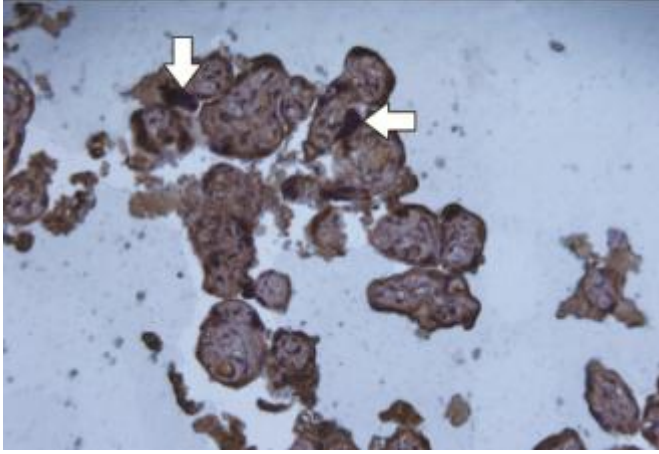
HK son hesaplanan değerdir. Genellikle HK'nin en yüksek sınırı %5 olarak kabul edilir.

### **İmmünohistokimyasal Boyama ve CD94/NKG2A inhibitör uNK hücrelerin Sayımı**

İmmünohistokimyasal boyama, işaretlenmiş antikör ile antijenin birleşmesi reaksiyonuna dayanan çok hassas ve özgün bir yöntemdir. Hücrelerde yerleşmiş olan bir molekülün belirlenmesi ve gösterilmesi amacıyla, bu moleküle spesifik olarak hazırlanan işaretili antikörlerin gösterilmesi esasına dayanır (Osborn, 1994).

Plasental natürel killer hücrelerinin plazma membranı üzerinde bulunan CD94 reseptörlerinin boyanması amacıyla, çalışmamızda parafin bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitlerde İmmünohistokimyasal boyama Avidin-Biotin Metodu (ABC) ile gerçekleştirildi. Çalışmanın bu bölümünde, ilgili örneklerin rutin histolojik takibi sonucunda elde edilen parafin bloklar mikrotom yardımı ile 5 µm kalınlığında kesilerek gece boyu (12 saat) 37°C'lik etüvde bekletildikten sonra deparafinizasyon işlemine alındı. Bu amaçla oda ısısında iki kere 5 dakikalık ksilen, iki kere 5 dakikalık %100'lk etanol, birer kere de 3'er dakikalık sırası ile % 90, % 80 ve % 70'lik etanol inkübasyonları yapıldı. Takiben oda sıcaklığında, 15 dakika süreyle, proteinaz K solüsyonuna (20 µg/ml fosfat tampon solüsyonu) tabi tutuldu. Distile su içerisinde birkaç kez yıkanan kesitler 15 dakika boyunca %3 lk hidrojen peroksit ile inkübe edildi. İki-üç kez PBS tamponunda yıkamanın ardından fosfat tampon solüsyonu (PBS) tamponu ile durulanan camlar primer antikör olarak Anti-CD94 poliklonal antikru ile oda ısısında 90 dakika inkübe edildi. Tekrar PBS ile durulanan lamlar önce peroksidaz streptavidin konjugatı ile oda ısısında nemli ortamda 20 dakika, ardından DAB zeltisi ile oda ısısında 10 dakika bekletildi. Zıt boyama için Mayer'in hematoksileni ile 3-6 dakika boyanan lamlar akarsuda yıkanarak su bazlı kapatma ortamı ve lamel ile kapatıldıktan sonra Leica DM 7000 marka dijital kamera atamanlı mikroskop altında incelenerek fotoğraflandı (**Resim 3**).



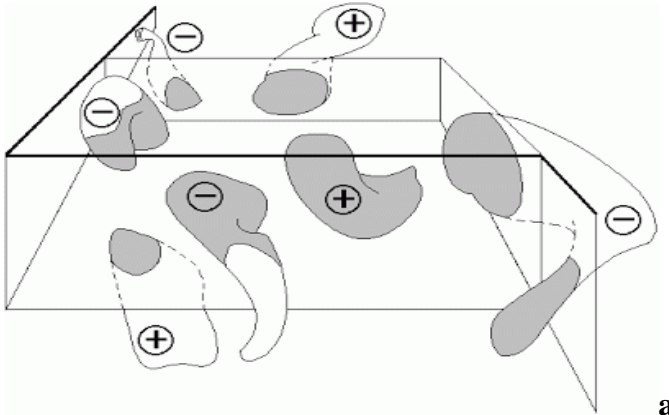


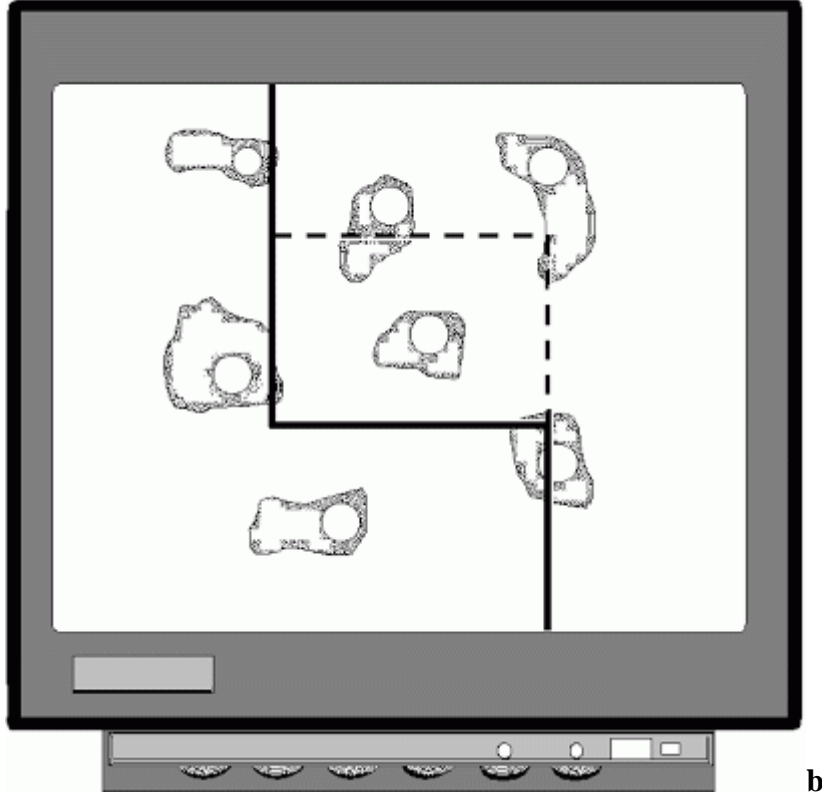
**Resim 3.** İmmunohistokimya ile CD94+NKG2A taşıyan uNK hücreler

### Fiziksel Disektör

Yapılan ön çalışma uyarınca, plasenta ait örneklenen kesitlerde gözlenen tüm NK antikoru pozitif hücre izdüşümlerinin sayılarının belirlenmesi için kesitler üzerinde  $\frac{1}{2}$  oranında ala örnekleme yapılmasının uygun olduğu saptandı. Dolayısıyla, ilk kesitten başlanarak, tüm doku izdüşümleri belirtilen adım aralıkları ile baştan sona tarandı. Her bir adım alanında ise, alanı  $100 \text{ cm}^2$  olan bir tarafsız sayım çerçevesi kullanıldı. Böylece her adımda gözlenen hücre izdüşümleri tarafsız sayım çerçevesi kurallarına göre sayılarak birim alandaki NK pozitif hücrelerin sayısı belirlendi (**resim 4.**).

**Resim 4.** Fiziksel disektör(a) ve sayım yapılan ekran görüntüsü(b)





### Hücrelerin Flovsiometrik İnceleme İçin İzolasyonu

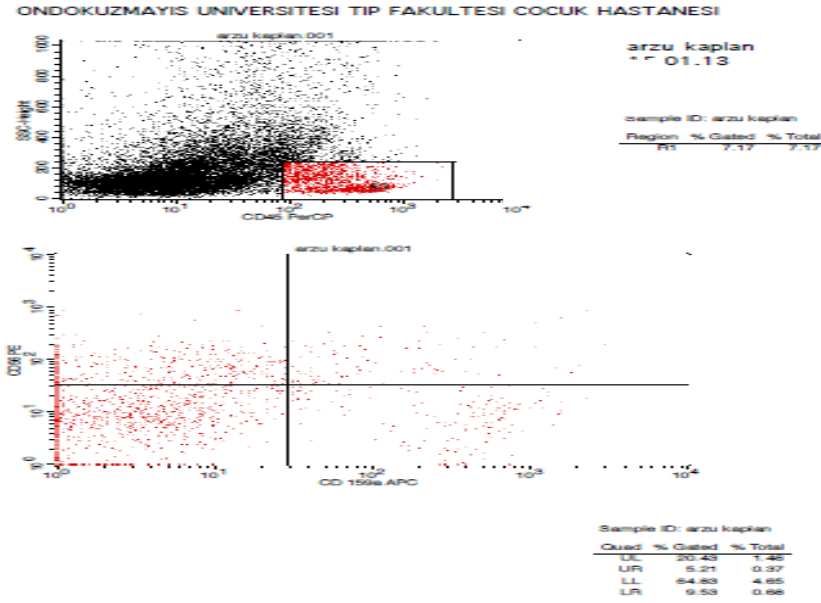
Desidual hücrelerin toplanması için örnekler dikkatle pıhtılardan arındırıldı ve PBS ile iki defa yıkandı. Total desidual doku (1-7 g) yaklaşık 1 mm<sup>3</sup> parçalara kıyılarak 40 dk süre ile 37°C'de PBS ile 200 U/ml hyaluronidaz, 1 mg/ml kollajenaz tip Ia, 0.2 mg/ml DNaz I (2500 Kunitz U/mg) ve 1 mg/ml bovine serum albumin/fraction V (hepsi: Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) hafif ajitasyonla sindirildi. Elde edilen hücre süspansiyonu steril paslanmaz çelik 50-µm süzgeçten geçirilip PBS ile bir kere yıkandı. Daha sonra mononükleer hücreler Leukocyte density gradient (density 1077, PAA, Cölebe, Germany) ile santrifüj edilerek ayrıldı, iki kere PBS ile yıkanmış ve 10<sup>6</sup> cells/ml in PBS/2% human immunoglobulin (Beriglobin, Behring, Marburg, Germany) olacak şekilde suspense edilip bekletmeden flovsiometrik incelemeye alındı (Rieger, 2009).

## Hücrelerin işaretlenmesi ve Flovsiometrik Olarak CD45+CD56+CD159a+ (CD94/NKG2A) uNK Hücrelerin Belirlenmesi

Yukarıda tarif edilen şekilde hazırlanan plasenta örnekleri, Anabilim Dalımız İmmünoloji-Allerji Bilim Dalı' na bağlı Çocuk İmmünoloji-Allerji Teşhis ve Tetkik Laboratuvarı' nda direk immüno Floresan yöntemiyle ile 3 renk boyama uygulanarak değerlendirildi.

İzole edilen mononükleer desidual hücreler CD45 PerCP, conjugated CD159a (NKG2A) APC (IgG2b; clone Z199; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), ve CD56 PE (IgG1; clone N901, NKH- 1; Beckman Coulter) primer antikorlar ile boyandı. Örnek başına  $5 \times 10^4$  cells 50  $\mu$ l hacimde 5  $\mu$ l uygun antikor karışımı ile 30 dk buz üstünde boyandı. Bütün inkübasyon basamakları soğuk PBS/0.1% fetal calf serum (FCS) ile takip etti. Boyanan hücreler ardından 200  $\mu$ l PBS/0.1% FCS suspense edildisonra flovsiometre ile analiz edildi (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany). Her örnekte  $1 \times 10^4$  özgün boyanma için değerlendirildi. Hücreler CD45 kapısında debrisden ayırt edildikten sonra CD56+CD159a taşıyan hücreler belirlendi (**Resim 5**) (Rieger. 2009).

**Resim 5.** CD45 +CD56+CD159a+ ( CD94+NKG2A) taşıyan hücrelerin flovsiometri ile gösterilmesi



## **İstatistiksel Değerlendirme**

İstatistiksel değerlendirmeler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakóltesi İstatistik Anabilim Dalı'nda yapıldı.

Bu çalışmanın Stereolojik inceleme sonucunun istatistiksel analizleri SPSS 15.0 programı ile yapıldı. Grupların karşılaştırmalarında veriler normal dağılım göstermediği için **Kruskal-Wallis Test** ve **Mann-Whitney Test** kullanıldı.

## BULGULAR

Vajinal doğum yapan annelerin yaş ortalaması 26.38 (**26.38±3.73**) yıl, gebelik süresi ortalaması **275.94(275.94±5.59)** gün, bebeklerin doğum ağırlığı ortalaması **3375(3375±288.23)** gram, doğum sonrası 1. Dakika APGAR ortalaması **8.5(8.5±0.51)**, 5. Dakika ortalaması ise **9.5(9.5±0.51)** idi. Normal doğum yapan anne ve bebeklerinin özellikleri Tablo 1' de verilmiştir.

**Tablo 1.** NSVY anne ve bebeklerinin özellikleri

| Olgu          | Yaş (yıl)       | Gebelik süresi (gün) | Doğum ağırlığı ( gram) | APGAR 1.dk     | APGAR 5.dk     |
|---------------|-----------------|----------------------|------------------------|----------------|----------------|
| 1.            | 24              | 277                  | 3100                   | 8              | 9              |
| 2.            | 27              | 272                  | 3250                   | 8              | 9              |
| 3.            | 30              | 271                  | 3200                   | 8              | 9              |
| 4.            | 23              | 278                  | 3420                   | 9              | 10             |
| 5.            | 32              | 279                  | 3570                   | 9              | 10             |
| 6.            | 20              | 281                  | 3890                   | 8              | 9              |
| 7.            | 29              | 270                  | 3180                   | 8              | 9              |
| 8.            | 27              | 289                  | 2980                   | 9              | 10             |
| 9.            | 22              | 280                  | 3240                   | 9              | 10             |
| 10.           | 31              | 269                  | 3300                   | 9              | 10             |
| 11.           | 28              | 271                  | 3390                   | 8              | 9              |
| 12.           | 24              | 275                  | 3150                   | 8              | 9              |
| 13.           | 25              | 284                  | 3070                   | 9              | 10             |
| 14.           | 21              | 272                  | 3650                   | 8              | 9              |
| 15.           | 29              | 273                  | 3770                   | 9              | 10             |
| 16.           | 30              | 277                  | 3850                   | 9              | 10             |
| <b>ort±SD</b> | <b>26.3±3.7</b> | <b>275.9±5.5</b>     | <b>3375±288.2</b>      | <b>8.5±0.5</b> | <b>9.5±0.5</b> |

**ort±SD:** Ortalama±standart deviasyon

Sezaryen ile doğum yapan annelerin yaş ortalaması **25.86(25.86±3.71)** yıl, gebelik süresi ortalaması **274.81(274.81±5.75)** gün, bebeklerin doğum ağırlığı ortalaması **3497.62(3497.62±350.77)** gram, doğum sonrası 1. Dakika APGAR ortalaması **8.57(8.57±0.50)**, 5. Dakika ortalaması ise **9.57(9.57±0.50)** idi. Sezaryen ile doğum yapan anne ve bebeklerin özellikleri Tablo 2' de verilmiştir.

**Tablo 2.** Sezaryen ile doğum yapan anne ve bebeklerinin özellikleri

| <b>Olgu</b>   | <b>Yaş (yıl)</b> | <b>Gebelik süresi (gün)</b> | <b>Doğum ağırlığı ( gram)</b> | <b>APGAR 1.dk</b> | <b>APGAR 5.dk</b> |
|---------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|
| 1.            | 32               | 273                         | 3900                          | 9                 | 10                |
| 2.            | 29               | 270                         | 3870                          | 9                 | 10                |
| 3.            | 31               | 271                         | 3750                          | 8                 | 9                 |
| 4.            | 30               | 279                         | 3310                          | 8                 | 9                 |
| 5.            | 26               | 275                         | 3080                          | 8                 | 9                 |
| 6.            | 19               | 280                         | 3300                          | 9                 | 10                |
| 7.            | 22               | 272                         | 3670                          | 9                 | 10                |
| 8.            | 24               | 290                         | 4040                          | 9                 | 10                |
| 9.            | 27               | 282                         | 3210                          | 8                 | 9                 |
| 10.           | 28               | 271                         | 3320                          | 9                 | 10                |
| 11.           | 22               | 271                         | 3070                          | 8                 | 9                 |
| 12.           | 25               | 274                         | 2980                          | 8                 | 9                 |
| 13.           | 30               | 281                         | 3250                          | 9                 | 10                |
| 14.           | 26               | 270                         | 3150                          | 9                 | 10                |
| 15.           | 23               | 275                         | 3600                          | 8                 | 9                 |
| 16.           | 21               | 277                         | 4050                          | 9                 | 10                |
| 17.           | 20               | 267                         | 3960                          | 9                 | 10                |
| 18.           | 28               | 270                         | 3820                          | 8                 | 9                 |
| 19.           | 25               | 278                         | 3140                          | 9                 | 10                |
| 20.           | 26               | 279                         | 3420                          | 9                 | 10                |
| 21.           | 29               | 266                         | 3560                          | 8                 | 9                 |
| <b>ort±SD</b> | <b>25.8±3.7</b>  | <b>274.8±5.7</b>            | <b>3497.6±350.7</b>           | <b>8.5±0.5</b>    | <b>9.5±0.5</b>    |

**ort±SD:** Ortalama±standart deviasyon

Preeklampsisi tanısı ile doğum yapan annelerin yaş ortalaması **24.92(24.92±4.88)** yıl, gebelik süresi ortalaması **266.45(266.45±8.33)** gün, bebeklerin doğum ağırlığı ortalaması **3202.73(3202.73±555.77)** gram, doğum sonrası 1. Dakika APGAR ortalaması **8.45(8.45±0.52)**, 5. Dakika ortalaması ise **9.45(9.45±0.52)** idi. Preeklampsisi tanısı ile doğum yapan anne ve bebeklerinin özellikleri Tablo 3' de verilmiştir.

**Tablo 3.** Preeklampsisi tanısı alan anne ve bebeklerinin özellikleri

| Olgu          | Yaş (yıl)       | Gebelik süresi (gün) | Doğum ağırlığı ( gram) | APGAR (1.dk)   | APGAR (5.dk)   |
|---------------|-----------------|----------------------|------------------------|----------------|----------------|
| 1.            | 32              | 265                  | 3280                   | 8              | 9              |
| 2.            | 34              | 270                  | 2990                   | 9              | 10             |
| 3.            | 18              | 273                  | 4120                   | 9              | 10             |
| 4.            | 25              | 266                  | 3230                   | 9              | 10             |
| 5.            | 22              | 266                  | 2930                   | 8              | 9              |
| 6.            | 24              | 245                  | 3070                   | 8              | 9              |
| 7.            | 20              | 261                  | 1990                   | 9              | 10             |
| 8.            | 28              | 276                  | 2950                   | 8              | 9              |
| 9.            | 25              | 270                  | 3210                   | 8              | 9              |
| 10.           | 21              | 266                  | 3810                   | 9              | 10             |
| 11.           | 25              | 273                  | 3650                   | 8              | 9              |
| <b>ort±SD</b> | <b>24.9±4.8</b> | <b>266.4±8.3</b>     | <b>3202.7±555.7</b>    | <b>8.4±0.5</b> | <b>9.4±0.5</b> |

ort±SD: Ortalama±standart deviasyon

## FLOVSİTOMETRİK İNCELEME SONUÇLARI

Gebelerin plasentalarından alınan dokuların flovsitometrik incelemesi yapıldı. Gruplara göre flovsitometrik inceleme sonuçları tabloda gösterildi(**Tablo 4-5-6**). uNK hücreleri temsil eden CD56+CD159a+ hücrelerin yanısıra, dokudaki NK hücreleri ve CD56 taşımayan fakat inhibitör özelliği olan diğer hücreler (CD159a+NKG2A) de belirlendi.

**Tablo 4.** NSVY ile doğum yapan gebelerin flovsitometrik sonuçları

| <b>Olgu</b>   | <b>CD45+<br/>(%)</b> | <b>CD56+<br/>(%)</b> | <b>CD56+CD159a+<br/>(%)</b> | <b>CD159a+<br/>(%)</b> |
|---------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|
| 1.            | 0.53                 | 36                   | 24                          | 3                      |
| 2.            | 0.21                 | 8                    | 3                           | 17                     |
| 3.            | 0.33                 | 1                    | 7                           | 15                     |
| 4.            | 0.17                 | 59                   | 24                          | 6                      |
| 5.            | 0.30                 | 0                    | 1                           | 11                     |
| 6.            | 0.08                 | 4                    | 21                          | 17                     |
| 7.            | 0.26                 | 6                    | 5                           | 15                     |
| 8.            | 0.57                 | 4                    | 1                           | 5                      |
| 9.            | 0.20                 | 5                    | 5                           | 15                     |
| 10.           | 0.38                 | 29                   | 32                          | 8                      |
| 11.           | 0.50                 | 8                    | 6                           | 3                      |
| 12.           | 3.69                 | 1                    | 1                           | 5                      |
| 13.           | 0.56                 | 0                    | 0                           | 0                      |
| 14.           | 0.40                 | 0                    | 10                          | 40                     |
| 15.           | 0.62                 | 2                    | 2                           | 16                     |
| 16.           | 0.20                 | 15                   | 15                          | 20                     |
| <b>ort±SD</b> | <b>0.5±0.8</b>       | <b>11.1±16.5</b>     | <b>9.8±10.1</b>             | <b>12.2±9.6</b>        |

**ort±SD:** Ortalama±standart deviasyon

**Tablo 5.** Preeklampsi tanısı ile doğum yapan gebelerin flovsitometrik sonuçları

| <b>Olgu</b>   | <b>CD45+<br/>(%)</b> | <b>CD56+<br/>(%)</b> | <b>CD56+CD159a+<br/>(%)</b> | <b>CD159a+<br/>(%)</b> |
|---------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|
| 1.            | 3.39                 | 12                   | 4                           | 4                      |
| 2.            | 0.04                 | 0                    | 91                          | 0                      |
| 3.            | 0.24                 | 1                    | 8                           | 5                      |
| 4.            | 0.36                 | 10                   | 5                           | 6                      |
| 5.            | 0.19                 | 5                    | 14                          | 12                     |
| 6.            | 0.46                 | 3                    | 4                           | 7                      |
| 7.            | 0.63                 | 1                    | 3                           | 16                     |
| 8.            | 0.29                 | 2                    | 5                           | 28                     |
| 9.            | 0.48                 | 10                   | 6                           | 4                      |
| 10.           | 1.25                 | 2                    | 2                           | 7                      |
| 11.           | 29.23                | 2                    | 5                           | 5                      |
| <b>ort±SD</b> | <b>3.3±8.6</b>       | <b>4.3±4.2</b>       | <b>13.3±25.9</b>            | <b>8.5±7.7</b>         |

**ort±SD:** Ortalama±standart deviasyon



**Tablo 6.** C/S ile doğum yapan gebelerin flovsitometrik sonuçları

| <b>Olgu</b>   | <b>CD45+<br/>(%)</b> | <b>CD56+<br/>(%)</b> | <b>CD56+CD159a+<br/>(%)</b> | <b>CD159a+<br/>(%)</b> |
|---------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|
| 1.            | 16.60                | 1                    | 2                           | 4                      |
| 2.            | 0.07                 | 10                   | 20                          | 15                     |
| 3.            | 4.84                 | 8                    | 3                           | 4                      |
| 4.            | 4.83                 | 20                   | 3                           | 1                      |
| 5.            | 0.47                 | 4                    | 1                           | 1                      |
| 6.            | 10.89                | 5                    | 3                           | 1                      |
| 7.            | 1.75                 | 3                    | 3                           | 1                      |
| 8.            | 2.82                 | 4                    | 3                           | 4                      |
| 9.            | 0.29                 | 19                   | 7                           | 0                      |
| 10.           | 0.43                 | 21                   | 2                           | 2                      |
| 11.           | 0.30                 | 48                   | 52                          | 0                      |
| 12.           | 7.17                 | 26                   | 7                           | 8                      |
| 13.           | 6.32                 | 1                    | 1                           | 4                      |
| 14.           | 0.48                 | 6                    | 7                           | 2                      |
| 15.           | 3.27                 | 1                    | 3                           | 3                      |
| 16.           | 1.51                 | 1                    | 2                           | 5                      |
| 17.           | 0.09                 | 11                   | 4                           | 0                      |
| 18.           | 0.94                 | 6                    | 1                           | 3                      |
| 19.           | 0.35                 | 14                   | 1                           | 8                      |
| 20.           | 3.43                 | 7                    | 6                           | 4                      |
| 21.           | 4.49                 | 5                    | 3                           | 3                      |
| <b>ort±SD</b> | <b>3.3±4.1</b>       | <b>10.5±11.2</b>     | <b>6.3±11.2</b>             | <b>3.4±3.4</b>         |

**ort±SD:** Ortalama±standart deviasyon

Gruplarının flovsitometrik inceleme sonucunda CD45, CD56, CD56+CD159a yüzdeleri arasında istatikselsel olarak anlamlı fark yoktu sadece CD159a yüzdeleri arasında istatikselsel olarak anlamlı fark vardı (p:0.001). Gebe grupları arasındaki CD45, CD56, CD56+CD159a ve CD159a yüzdeleri arasındaki istatikselsel ilişkiler gösterildi. Sezaryen ile doğum yapan ve preeklampsi tanısı ile doğum yapan gebelerin CD159a yüzdeleri arasında anlamlı ilişki vardı. NSVY ile doğum yapan ve sezaryen ile doğum yapan gebelerin CD45 ve CD159a yüzdeleri arasında anlamlı fark vardı ( **Tablo 7**).

**Tablo 7.** Flovositometrik inceleme ile grupların istatistiksel değeriendirilmesi

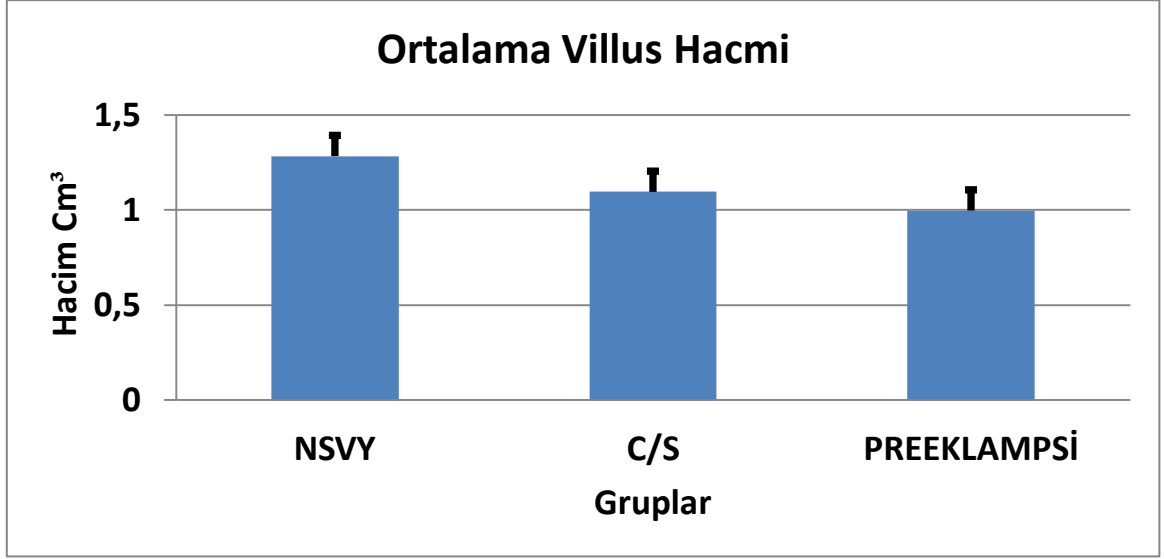
|  | <b>CD45</b><br>(%)  | <b>CD56</b><br>(%)  | <b>CD159a</b><br>(%)  | <b>CD56+CD159a</b><br>(%)  |
|--|---|---|---|--|
| <b>NSVY(a)</b><br><br><b>n=19</b><br><br><b>Ortalama±SD</b>        | 0.5±0.8   | 11.1±16.5   | 12.2±9.6  | 9.8±10.1   |
| <b>Medyan</b>  | 0.3   | 4.5   | 13.0  | 5.5  |
| <b>Sezaryen(b)</b><br><br><b>n=21</b><br><br><b>Ortalama±SD</b>    | 3.3±4.1   | 10.5±11.2   | 3.4±3.4   | 6.3±11.2   |
| <b>Medyan</b>  | 1.7   | 6.0   | 3.0   | 3.0  |
| <b>Preeklampsi(c)</b><br><br><b>n=11</b><br><br><b>Ortalama±SD</b> | 3.3±8.3   | 4.3±4.2   | 8.5±7.7   | 13.3±25.9  |
| <b>Medyan</b>  | 0.4   | 2.0   | 6.0   | 5.0  |
| <b>p*</b>  | .027  | .237  | .001*   | .195   |
| <b>Gruplar arası fark</b>  | <b>a-b</b> p:0.009*<br><b>a-c</b> p: 0.490<br><b>b-c</b> p: 0.117 | <b>a-b</b> p: 0.389<br><b>a-c</b> p: 0.568<br><b>b-c</b> p: 0.073 | <b>a-b</b> p: 0.000*<br><b>a-c</b> p: 0.287<br><b>b-c</b> p: 0.008* | <b>a-b</b> p: 0.279<br><b>a-c</b> p: 0.980<br><b>b-c</b> p: 0.049* |

\* Anlamlı fark

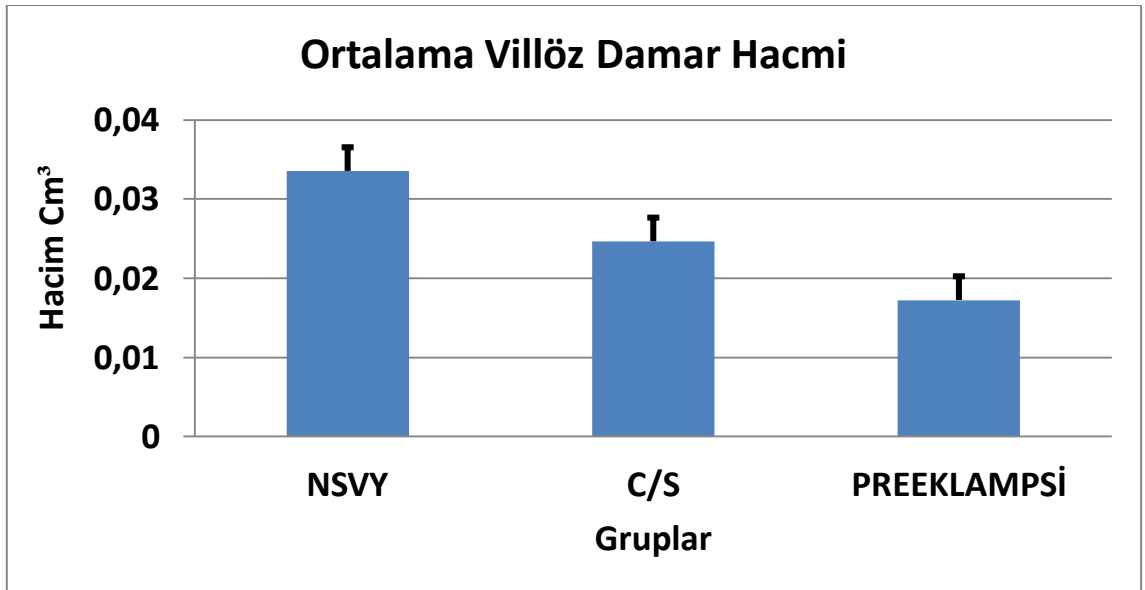
## İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME SONUÇLARI

Plasenta örneklerinin durumu villüs ve damar hacminin gösterilmesinde cavalier yöntemi kullanıldı. Grupların damar ve villüs hacmi grafiksel olarak gösterildi (**Grafik 1,2**).

**Grafik 1.** Grupların ortalama villüs hacminin grafiği



**Grafik 2.** Grupların ortalama villöz damar hacminin grafiği



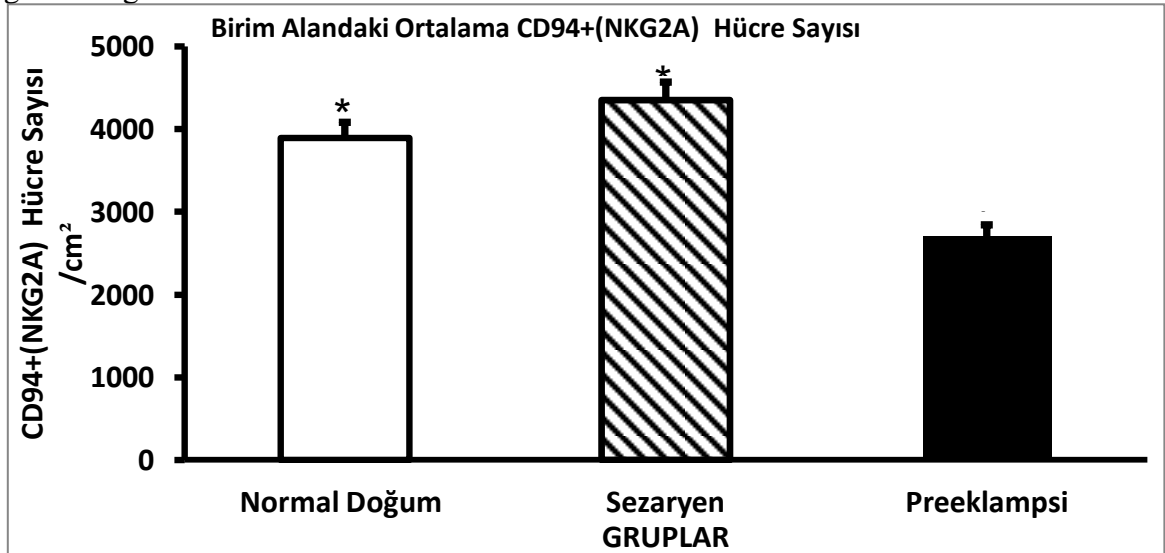
Grupların immünohistokimyasal inceleme ile uNK(CD94+/ NKG2A) hücreleri Tablo 8’de gösterildi. Her gruptan rastgele alınan beşer gebeden 3’ er kesit alındı, kesitlerde ortalama 34’er alanda CD94+(NKG2A) uNK hücre sayımı yapıldı.

**Tablo 8.** Grupların CD94+(NKG2A) uNK hücre sayıları

| Doğum şekli | NSVY Hücre/cm2 | Sezaryen Hücre/cm2 | Preeklampsi Hücre/cm2 |
|-------------|----------------|--------------------|-----------------------|
| 1. Gebe     | 3957           | 4297               | 2665                  |
| 2. Gebe     | 3455           | 4522               | 2733                  |
| 3. Gebe     | 3976           | 4466               | 2706                  |
| 4. Gebe     | 4060           | 4116               | 2815                  |
| 5. Gebe     | 4004           | 4368               | 2624                  |
| ort±SD      | 3890±144       | 4353±158           | 2709±72               |

İmmünohistokimyasal incelemede gebelerin **CD94(NKG2A)** sayıları **Sezaryen>Normal doğum>preeklampsi** şeklinde bulundu. İstatiksel olarak gruplar arasındaki fark anlamlı bulundu (p:0.009). Grupların birim alandaki ortalama CD94(NKG2A) sayısı Grafik 3’te gösterildi.

**Grafik 3.** Birim alandaki ortalama CD94+(NKG2A) uNK hücre sayılarının grafiksel gösterimi



**Sezaryen>Normal doğum>preeklampsi (p: 0.009)**

## TARTIŞMA

Prematürite, infant mortalite ve morbiditesini en önemli sebebi olup artış göstermektedir. Prematüritenin önlenmesi için doğumun başlama zamanı ve mekanizmasının anlaşılması gereklidir. Bulguların doğumun inflamatuvar bir süreç olduğuna işaret etmesi immünolojik olarak önemlidir.

Maternal Treg ve uNK hücreleri gebeliğin devamını sağlar, o halde bu hücreler doğum zamanının belirlenmesi ile de ilişkili olmalıdır. Elektif sezaryen ile elde edilen desiduanın gebelikteki durumu, normal doğum ile elde edilen desiduanın ise doğumun başlaması ile ilgili inflamatuvar olayları yansıttığı düşünülebilir.

Verilerimizi incelediğimizde demografik özelliklerden yaş ortalaması grupların birbirine benzerdi sadece preeklampsi olguları diğerlerine göre düşüktü. Aynı şekilde gebelik süreleri de birbirine benzerdi sadece preeklampsi olgularının gebelik süresi ortalaması diğer guruplara göre daha düşüktü. Bebeklerin doğum ağırlıklarına bakarsak aynı şekilde benzer doğum ağırlıklarına sahiptiler sadece preeklampsi olgularının doğum ağırlık oranı diğerlerine göre biraz daha düşüktü.

Cavalieri metodu ile plasenta örneklerinde villus ve damar hacmi değerlendirildiğinde gruplar arasındaki damar ve villus hacmi NSVY>C/S>Preeklampsi olarak bulundu. Bu durum gebelik fizyolojisi ile olduğu düşünüldü.

Stereolojik yöntemlerin en önemli özelliği, iş yükünü azaltarak, istenen doğrulukta sonuçların elde edilmesini sağlamalarıdır. Örneğin bir organdaki toplam hücre sayısını belirlemek için, o organın tümünü alıp hücreleri teker teker saymak çoğunlukla imkansızdır. İlgilenilen yapının tümünü temsil edebilecek küçük bir parça üzerinde örnekleme yoluyla bir niceliği hesaplamak ve istediğimiz niceliğin değerini, bu örneğin tüm yapıya olan oranına bakarak hesaplamak mümkündür. Tanecik (hücre içi granül vs) sayımı için kullanılan temel stereolojik yöntemlerden birisi fiziksel disektördür. Aralarında belli bir mesafe olan iki ardışık kesitin fiziksel olarak karşılaştırılmasını içerir. Hücre, hücre içi tanecik sayımı ve hacim hesaplamalarında kullanılan stereolojik metedlar altın standard olarak kabul edilmektedir (Sterio, 1984).

World A.S ve Arıcı A. yaptıkları çalışmada NK hücrelerinin implantasyon esnasında desidüadaki en büyük lökosit grubunu oluşturduğunu, periferik kandaki NK hücreleri ise %90 oranında CD56<sup>zayıf</sup>CD16<sup>+</sup>, kalan %10'u ise CD56<sup>parlak</sup>CD16<sup>-</sup> olduğunu belirtmişlerdir (World, 2005).

Kusumi M. ve Arkadaşlarının yaptıkları çalışmada desidual CD56<sup>parlak</sup> hücrelerin NKG2A+ hücre oranı periferik CD56<sup>zayıf</sup> NK hücrelerine göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuş ama NKG2C-pozitif hücrelerin oranı hücrelerinin iki tür arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Kusumi, 2006)

Tamara T. ve Arkadaşlarının yaptıkları çalışmada desidual hücrelerde CD94+NKG2A ve CD94+NKG2C oranı periferik CD4+ T hücrelerine göre belirgin yüksek olduğunu göstermişlerdir. NKG2A düzeyinin yüksek olmasının alloimmunojenik reaksiyonun düzenlenmesinde (oluşan fetusun reddinin önlenmesinde) etkili olabildiğini söylemişlerdir (Tamara, 2009).

La Bonte M.L ve Arkadaşlarının yaptıkları çalışmada trofoblastlar üzerindeki HLA ligandı ile CD94/NKG2 reseptörü arasında etkileşim mevcut olduğunu ve CD94/NKG2 üzerinde c lektin benzeri aktivatör ve inhibitör özellik gösteren reseptörler mevcut olduğunu ileri sürmüşlerdir (La Bonte, 2004).

Guma M. ve Arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sağlıklı erişkin kan donörlerden periferik kan lenfositlerinde inhibitör NK reseptörleri CD94/NKG2A ve aktive CD94/NKG2C hücrelerini birlikte ekprese etmediklerini belirtmiştir. Periferik NK cell NKG2C ekprese eder ama NKG2A ekprese etmediğini bu özellik ile hedef hücreler üzerinde HLA-E tanınması üzerine öldürücü aktiviteyi arttırdığını belirtmişlerdir. Bu durum NKG2A nın özellikle gebelikte ön plana çıktığını göstermektedir (Guma, 2004).

Kusumi M. ve Arkadaşlarının yaptıkları çalışmada NKG2 lerin aktivatör ve inhibitör reseptör eksprese etmelerinin plasenta oluşumunda sitokin oluşmasını kontrol ettiklerini belirtmişlerdir. Periferik ve desidual NK hücrelerinin NKG2A ve NKG2C

arasında fark bulmuşlar. Bu sonuç trofoblastların plasenta oluşumundaki sıkı kontrolde NKG2 hücrelerinin de rolü olabildiğini belirtmişlerdir (Kusumi, 2006).

King A. ve Arkadaşlarının yaptıkları çalışmada CD56<sup>parlak</sup> hücreleri sitotoksik etki için gerekli sitokin üretiminde düzenleyici görev almakta olduğunu belirtmişlerdir. Bununla beraber HLA-E ile CD94/NKG2 etkileşim genel etkisi desidual NK hücreleri tarafından sitotoksikite inhibisyonu olduğunu belirtmişlerdir (King, 2000).

Bu çalışmada immunohistokimyasal yöntem ile bulduğumuz sonuçlar, inhibitör özellikli NKG2A hücrelerinin (uNK) ile ilgili olarak kurduğumuz hipotezi desteklemektedir. NKG2A hücre sayılarının sezaryen>normal doğum> preeklampsi şeklinde olması, bu hücrelerin gebeliğin devamında ve doğumun başlamasında önemli olabileceğini göstermektedir. Ancak, flovsitometrik sonuçlar bu bulguları tam olarak desteklememektedir, bu da yöntem ile ilgili olabilir. Flovsitometrik bulgulardaki uyumsuzluk plasental solusyonun hazırlanmasındaki zorluklar, villüs hacimlerindeki ve debris'den ayırt edilen hücre sayılarındaki farklılara bağlı olabilir.

## SONUÇLAR

1. Verilerimizi incelediğimizde demografik özelliklerden yaş ortalaması grupların birbirine benzerdi preeklampsi olguları diğerlerine göre biraz daha düşüktü.
2. Aynı şekilde gebelik süreleri de birbirine benzerdi, preeklampsi olgularının gebelik süresi ortalaması diğer gruplara göre daha biraz daha düşüktü.
3. Bebekler benzer doğum ağırlıklarına sahiptiler sadece preeklampsi olgularının doğum ağırlık oranı diğerlerine göre biraz daha düşüktü.
4. Cavalieri metodu ile plasenta örneklerinde villus ve damar hacmi değerlendirildiğinde gruplar arasındaki damar ve villus hacmi NSVY>C/S>Preeklampsi olarak bulundu.
5. Flovsiometrik bulgular çelişkili idi.
6. İmmunhistokimyasal incelemede gebelerin CD94(NKG2A) sayıları Sezaryen>Normal doğum>preeklampsi şeklinde bulundu. İstatiksel olarak aralarındaki fark anlamlı bulundu (p:0.009).

Sonuç olarak gebeliğin devamını sağladığı bilinen uNK hücrelerinin; immunohistokimyasal yöntemle doğum eyleminin olmadığı C/S doğumda en yüksek, normal doğumda daha düşük, gebeliğin kendiliğinden sonlandığı gebeliğin devam ettirilemediği preeklampitik doğumda ise en düşük bulundu. flovsiometrik inceleme ile ise aynı sonuç elde edilmedi.



## KAYNAKLAR

1. Aagard-Tillery KM, Silver R, Dalton J. Immunology of normal pregnancy. *Semin Fetal Neonat Med* 2006; 11: 279-295.
2. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. Fifth edition 2005; p. 289-292.
3. Agrawal S, Pandey MK. The potential role of HLA-G polymorphism in maternal tolerance to the developing fetus. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; 12: 749-756.
4. American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), Practice Bulletin no. 33. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 2002; 99:159-167.
5. Bachetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 227-235.
6. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. 17th edition. W.B.Saunders Company, U.S.A. 2002; Türkçe Çeviri Ed. Akçay T, 2008; 1: 551- 577.
7. Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol* 2004, 72: 203- 212.
8. Brown MA, Rad PY, Halonen MJ. Method of birth alters interferon-gamma and interleukin-12 production by cord blood mononuclear cells. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14: 106–111.
9. Bulla R, Fischetti F, Bossi F, Tedesco F. Feto-maternal immune interaction at the placental level. *Lupus* 2004; 13: 625-629.

**10.** Can G, İnce Z. (2010).Preterm doğanlar, İntrauterin Büyüme Geriliği, Makrozomi,Çoğul gebelikler. İçinde O. Neyzi, T. Ertugrul (Ed.), *Pediyatri 1*. İstanbul: Nobel Matbaacılık ; 367-385.

**11.** Can G, Çoban A, İnce Z. Yenidoğan ve Hastalıkları. O. Neyzi, T. Ertuğrul (eds). *Pediyatri cilt I*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002: 296-431.

**12.** Chirico G, Gasparoni A, Ciardelli L, Martinotti L, Rondini G. Leukocyte counts in relation to the method of delivery during the first five days of life. *Bio Neonate* 1999; 75: 294-299.

**13.** Chng WJ, Tan GB, Kuperan P. Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow-cytometry: influence of age, sex, and race and comparison with other published studies. *Clin Diag Lab Immunol* 2004; 11: 168-173.

**14.** Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L, Hsu ML. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 1997; 7: 273-282.

**15.** Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hauth JC, Wenstrom KD.Hypertensive disorders in pregnancy.In. *Williams obstetrics*. 2001:561–567.

**16.** Cunningham FG, Mac Donald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap J, Hankins GDV, Clark SL. *Williams Obstetrics*. 21th edition Connecticut, the McGraw- Hill 2001; p:567-609.

**17.** Dietl J, Hönig A, Kammerer U, Rieger L. Natural killer cells and dendritic cells at the human fetomaternal interface: an effective cooperation? *Placenta* 2006; 27: 341-347.

**18.** Dokun AO, Chu DT, Yang L, Bendelac AS, Yokoyama WM. Analysis of in situ NK cell responses during viral infection. *J Immunol* 2001; 167: 5286-5293.

- 19.** Douagi I, Colcci F, Di Santo JP, Cumano A. Identification of the earliest prethymic bipotent T/NK progenitor in murine fetal liver. *Blood* 2004 103: 530-537.
- 20.** Engle W.A. A Recommendation for the Definition of “Late Preterm” (Near-Term) and the Birth Weight–Gestational Age Classification System. *Seminars in Perinatology*, 2006 : 2-7.
- 21.** Fatma ÇAKMAK ÇELİK 2007 Uzmanlık Tez Çalışması. Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesinde İzlenen Çok Düşük Doğum Ağırlıklı Bebeklerde Morbidite Ve Mortalite (2007).
- 22.** Fogleman KA, Herring AH, Kaczor D, Pusek SN, Jo H, Thorp JM. Factors that influence the timing of spontaneous labor at term. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007; 20: 813-817.
- 23.** Frazier JP, Cleary TG, Pickering LK, Kohl S, ROSS PJ. Leukocyte function in healthy neonates following vaginal and cesarean section deliveries. *J Pediatr*. 1982; 101: 269-272.
- 24.** Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, Ross ME, Wang WC, et al. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol* 1998; 161: 400-408.
- 25.** Gershon RK and Kondo K. Cell interaction in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970; 18: 723-737.
- 26.** Gessler P, Dahinden C. Increased respiratory burst and increased expression of complement receptor-3 (CD11b/CD18) and of IL-8 receptor-A in neutrophil granulocytes from newborns after vaginal delivery. *Biol Neonate* 2003; 83: 107-112.
- 27.** Groenlund MM, Nuutila J, Pelto L, Llius EM, Isolauri E, Salminen S, Kero P, Lehtonen OP. Mode of delivery directs the phagocyte functions of infants for the first 6 months of life. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 521-526.

- 28.** Guleria I, Sayegh MH. Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance. *J Immunol* 2007; 178: 3345-3351.
- 29.** Guma, M., Angulo, A., Vilches, C., Gomez-Lozano, N., Malats, N., Lopez-Botet, M., 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104, 3664–3671.
- 30.** Hahn S., Gupta A.K., Troeger C., Rusterholz C., Holzgreve W., 2006, Disturbances in placental immunology: ready for therapeutic interventions? *Springer Semin Immunopathol*, 27: 477-493.
- 31.** Hamilton BE, Hoyert DL, Martin JA, et al. Annual summary of vital statistics: 2010-2011. *Pediatrics* 2013;131:548.
- 32.** Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006, 12: 1065-1074.
- 33.** Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human deciduas. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 373-378.
- 34.** Heron M, Sutton PD, Xu J, Ventura SJ, Strobino DM, Guyer B. Annual study of vital statistics: 2007. *Pediatrics* 2010; 125:4-15.
- 35.** Hiby SE, Walker M, O’Shaughnessy M, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffet A. Combination of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 2004; 200: 957-965.
- 36.** Ikawa T, Kawamoto H, Fujimoto S, Katsura Y. Commitment of common T/Natural killer (NK) progenitors in the murine fetal thymus revealed by a single progenitor assay. *J Exp Med* 1999; 190: 1617-1626.
- 37.** Ikincioğullari A, Kendirli T, Doğu F, Eğin Y, Reisli I, Cin S, Babacan E. Peripheral blood lymphocyte subsets in healthy Turkish children. *Turk J Pediatr.* 2004; 46: 125-130.

- 38.** Khan K, Wojdla D, Say L, UNDP/UNFPA/WHO/World Bank Special Programme Research, Development, and Research Training in Human Reproduction. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review 2006. *The Lancet*, Volume 367, Issue 9516, Pages 1066 – 1074.
- 39.** Kero J, Gissler M, Grönlund M, Kero P, Koskinen P, Hemminki E, Isolauri E. Mode of delivery and asthma – Is there a connection? *Ped Res* 2002; 52: 6-11.
- 40.** Kim S, Iizuka K, Kangs HS, Dokun A, French AR. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol* 2002; 3: 523-528.
- 41.** King A, Allan, D.S, Bowen M., Powis S.J, Joseph S, Verma S, Hiby S.E, McMichael A.J, Loke Y.W, Braud V.M, 2000a. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur. J. Immunol.* 30, 1623–1631.
- 42.** Kusumi M, Yamashita T, Fujii T, Nagamatsu T, Kozuma S, Taketani Y. Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. *J Reprod Immunol.* 2006 70(1-2):33-42.
- 43.** Lapaire O, Hösli I, Daellenbach R, Huang D, Jaeggi C, Mergenthaler S, Ahan S, Holzgreve W. Impact of fetal-maternal microchimerism on women's health-a review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007; 20: 1-5.
- 44.** LaBonte M.L, Choi E.I, Letvin N.L, 2004. Molecular determinants regulating the pairing of NKG2 molecules with CD94 for cell surface heterodimer expression. *J. Immunol.* 172, 6902–6912.
- 45.** Malamitsi-Puchner A, ProtonotarioU E, Boutsikou T, Makrakis E, Sarandakou E, Creatsas G. The influence of the mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period. *Early Human Development* 2005; 81: 387-392.

46. Medavar PB. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates: revention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Symp Soc Exp Biol* 1953; 7: 320-338.
47. Negele K, Heinrich J, Borte M, Von Berg A, SchaaF B, Lehman I, Wichmann HE, Bolte G, the Lisa Study Group. Mode of delivery and development of atopic disease during the first 2 years of life. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15: 48-54.
48. Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* 2006; 118: 1-10.
49. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, Van Den Brandt PA, Stobberingh EE. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118: 511-521.
50. PeriStats [online database]. White Plains, NY: March of Dimes; 2006. Available from: <http://www.marchofdimes.com/peristats/> [accessed on April 2006].
51. Petrou S. The economic consequences of preterm birth during the first 10 years of life. *BJOG* 2005;112 Suppl 1;5-10.
52. Petrou S, Mehta Z, Hockley C, Cook-Mozaffari P, Henderson J, Goldacre M. The impact of preterm birth on hospital inpatient admissions and costduring the first 5 years of life. *Pediatrics* 2003;112:1290-1297.
53. Petrova A and Mehta R. Dysfunction of innate immunity and associated pathology in neonates. *Indian J Ped* 2007; 74: 185-191.
54. Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, ROmagnani S. Defective production of both leukaemia inhibitory factor and type-2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 1993; 4: 1020-1024.
55. Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martínez-Torrecuadrada JL, Ling KL, PrataP S, Toms C, Fox BC, Cerundolo V, Powrie F, Banham AH. Analysis of

FOXP3 protein expression in human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 2005; 35:1681-1691.

**56.** Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of immune system in preeclampsia. *Mol Aspec Med.* 1990; 28:192-209.

**57.** Saito S, Tsukaguchi N, Hasegawa T, Michimata T, Tsuda H, Narita N. Distribution of Th1, Th2 and Th0 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. *Am J Reprod Immunol* 1999; 42: 240- 245.

**58.** Saito S, Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J, Proportion of peripheral blood and decidual CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol.* 2007 July; 149(1): 139–145.

**59.** Saito A, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T, Ito M. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in fetomaternal tolerance. *Semin Immunopathol* 2007; 29: 115-122.

**60.** Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995; 1: 1151-1164.

**61.** Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 347-353.

**62.** Scott JR., Gibbs RS., Karlan BY., Haney AF. *Danforth's Obstetrics and Gynecology* 9th Philadelphia. p. 653-62. ed. 2003; 16:257-271.

**64.** Somerset D, Zheng AY, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cell subset. *Immunology* 2004; 112: 38-43.

**65.** Sterio D.C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microscopy*, (1984). 134(2), 127-136.

**66.** Stoll BJ, The High Risk Infant. In: Nelson Text Book of Pediatrics, Behrman RE, Kligman RM, Jenson HB. 17. ed. Elsevier Science, USA, 2004: 547-559.

**67.** Tabiasco J, Rabot M, Aguerre-Girr M, El Costa H, Berrebi A, Parant O, Laskarin G, Juretic K, Bensussan A, Rukavina D, Le Bouteiller P. Human Decidual NK Cells: Unique Phenotype and Functional Properties – A Review Erratum in: *Placenta*. 2006 : 1034-1035.

**68.** Tamara Tilburgs, Barbara J. van der Mast, Nicole M.A. Nagtzaam Dave L. Roelen, Sicco A. Scherjon, Frans H.J. Claas. Expression of NK cell receptors on decidual T cells in human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology* 80 (2009): 22–32.

**69.** Thornton CA, Capristo CC, Power LL, Holloway JA, Popplewell EJ, Diaper ND, Warner JO. The Effect of Labor on Neonatal T-Cell Phenotype and Function. *Ped Res* 2003; 54: 119-124.

**70.** Tjoa ML, Oudejans CB, van Vugt JM, N-Blankenstein MA, van Wijk IJ. Markers for presymptomatic prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Hypertens Pregnancy* 2004; 23(2):171-189.

**71.** Tuckerman E, Laird SM, Prakash A, Li TC. Prognostic value of the measurement of uterine natural killer cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2007: 2208-2213.

**72.** Türk Neonatoloji Derneği Bülteni. Türkiye'de Yenidoğan Bakım Ünitelerinde Mortalite 2006; 4: 10-14.

**73.** Türkiye'de Yenidoğan Bakım Ünitelerinde Mortalite, Türk Neonatoloji Derneği Bülteni. (Ed. Yurdakök M.), Türk Neonatoloji Derneği. 2012; 24: 60-61.



**74.** Varuna R Aluvihare, Marinos Kallikourdis & Alexander G Betz Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus . *Nature Immunology* 5, 2004; 266 – 271.

**75.** Walker, M ve Hull, A. Preterm labor and birth. "Avery's Diseases of the Newborn" Ed. Taeusch, H. W. ve Ballard R.A., Seventh Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia-USA, 1998: 144-153.

**76.** Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14: 353-356.

**77.** Wing K, Ekmark A, Karlsson H, Rudin A, Suri - Payer E. Characterization of human CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* 2002; 106: 190–199.

**78.** Wold AS, Arıcı A. Natural killer cells and reproductive failure. *Curr Op Obstet Gynecol* 2005, 17: 231-241.