



Gebelik İmmünolojisinden Transplantasyon İmmünolojisine Çıkarılan Dersler



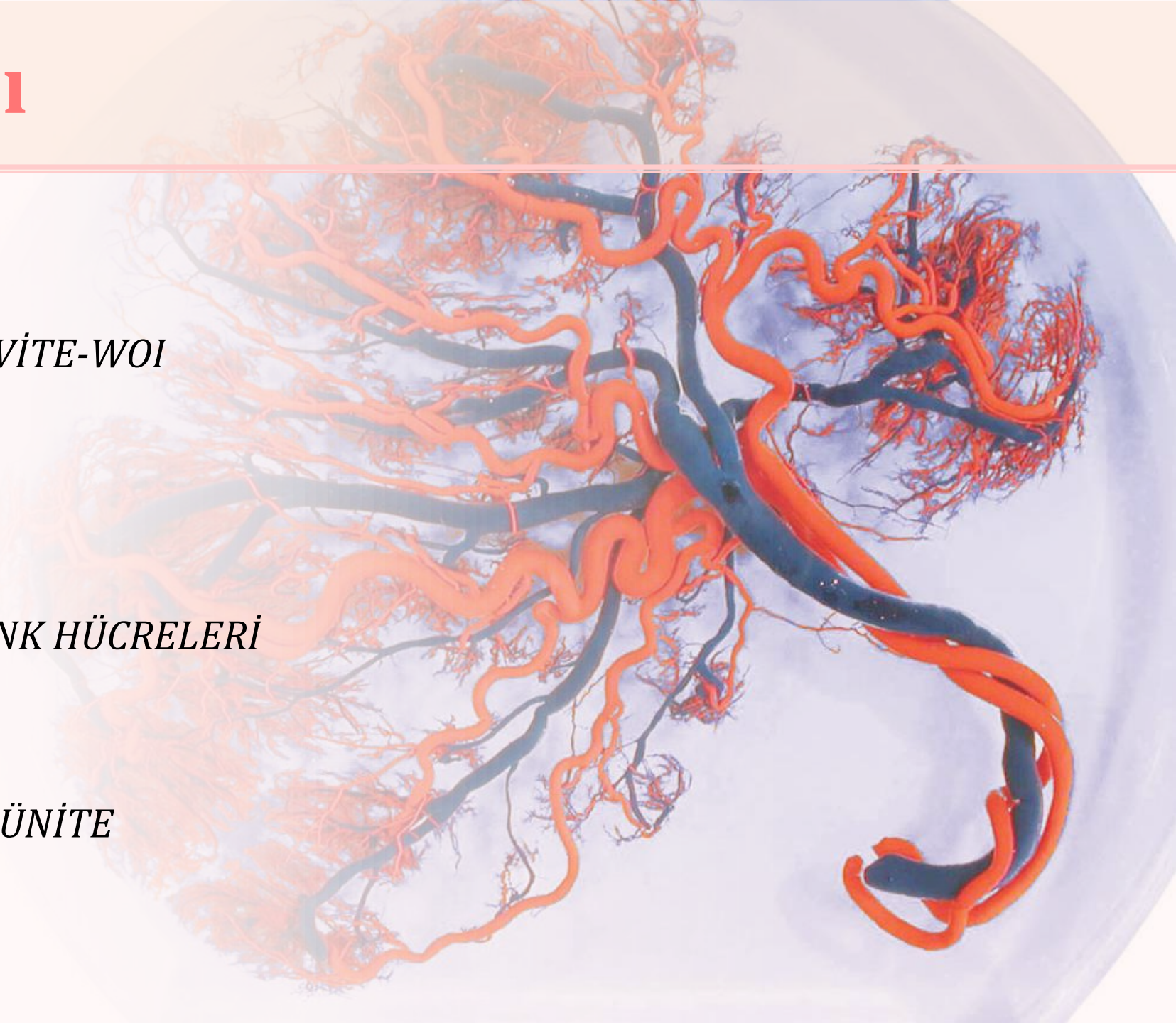
Prof.Dr. Uğur Muşabak

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

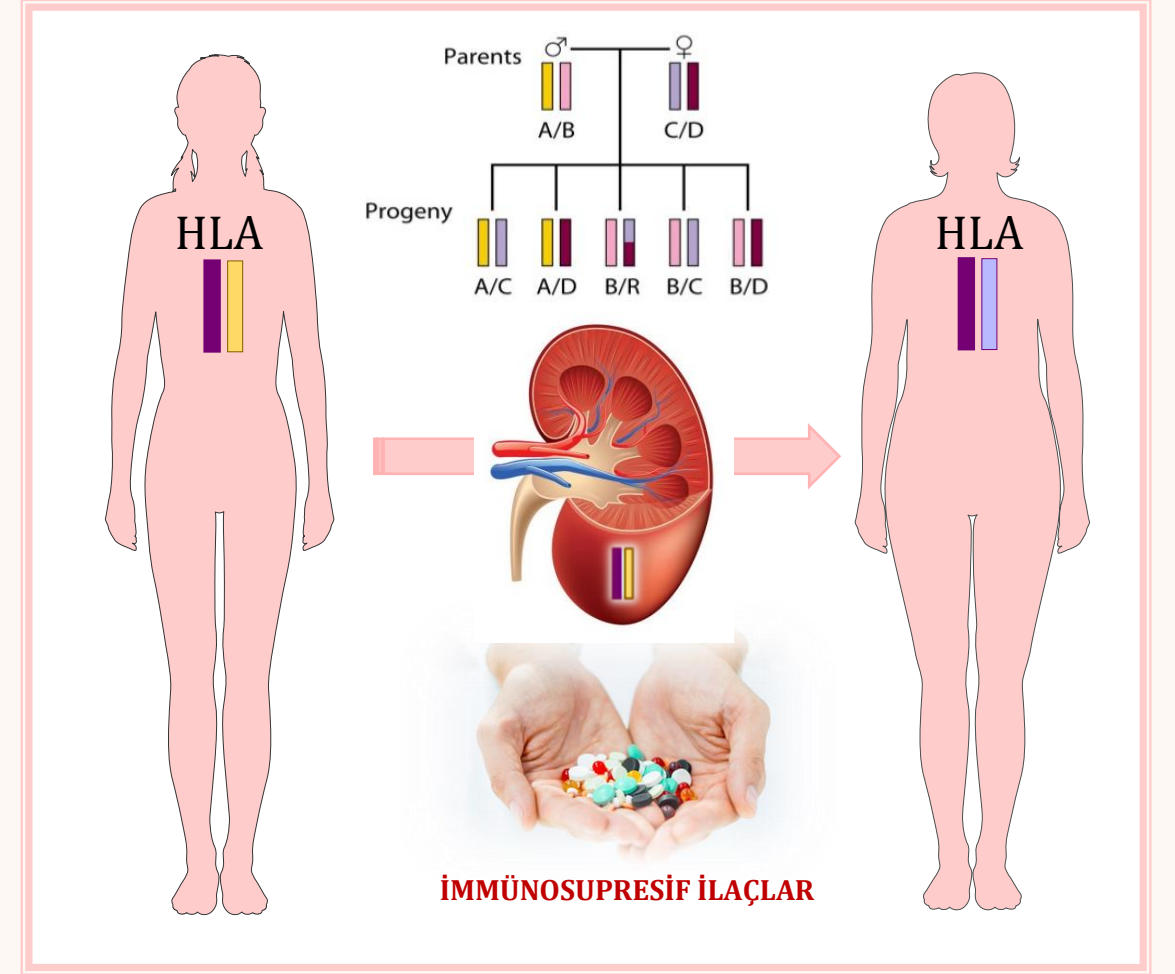
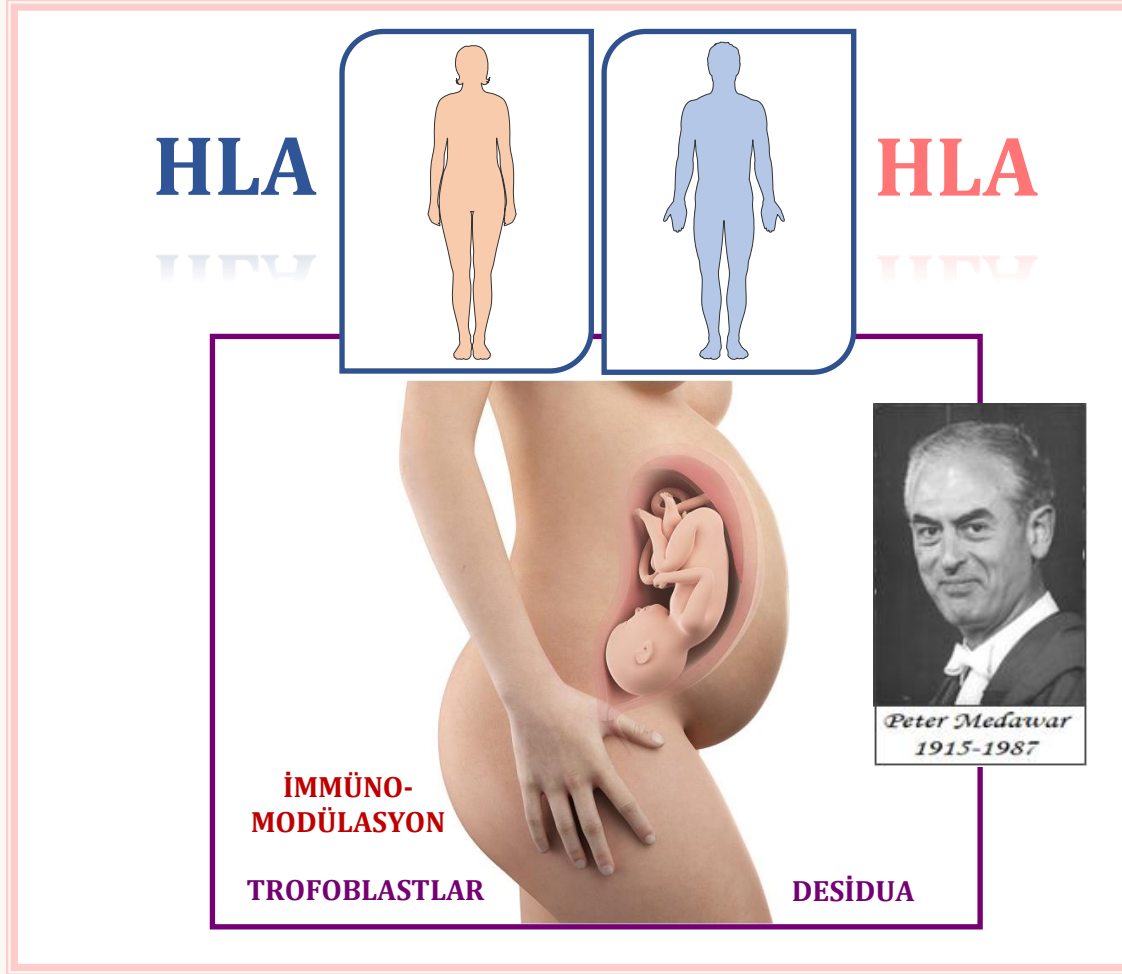
İmmünoloji ve Allerji Hastalıkları Bilim Dalı
Doku Tipleme ve Akım Sitometri Laboratuvarı
uhmusabak@baskent.edu.tr

Anlatım planı

- İ *ENDOMETRİAL DÖNGÜ*
- İ *ENDOMETRİYAL RESEPTİVİTE-WOI*
- İ *İMLANTASYON SÜRECİ*
- İ *DESİDUALİZASYON*
- İ *DESİDUAL HÜCRELER – dNK HÜCRELERİ*
- İ *BAŞKENT DENEYİMİ*
- İ *GEBELİK EVRELERİ - İMMÜNİTE*



Yarı haplotip uyumlu fetüs: Semiallograt



İmmün tolerans: yeni görüş

- ✿ Yapılan çalışmalar, **fetomaternal ara yüzde (FM-AY)** bulunan **bağışıklık hücrelerinin** fetusa karşı immün yanıt oluşturmak yerine **immün tolerans** geliştirdiğini göstermiş; gebeliğin **gerçekleşmesi** ve **devamlılığının** bu şekilde sağlandığı ortaya koyulmuştur.
- ✿ İmmün toleranstan **desiduada** bulunan **bağışıklık** hücreleri ve **maternal periferel tolerans** mknzm'ları sorumlu!...
- ✿ İTS hücrelerin **neler** olduğunu, immün **fenotiplerini** ve **fonksiyonlarını** belirleyen başlıca faktörler: hormon ve benzeri maddeler **plasenta** kaynaklı sinyaller ve **mikrobiyotadır**.



Başarılı gebelik koşulları

- ✿ İnsanlarda ve primatlarda **gebeliğin gerçekleşmesi için**: Embriyonun
 - + Başarılı implantasyonu
 - + Desidualizasyon
 - + Plasentasyon gereklidir.
- ✿ Gebelikte bir **sonraki** adıma geçmek için **bu aşamaların sağlıklı bir şekilde tamamlanması** gerekir.
- ✿ İmplantasyon aşamasında embriyo ve reseptif endometriyum arasında sıkı bir etkileşim gerçekleşir. (**aracılar**: sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar, prostaglandinler, hücre adezyon molekülleri, ECM kaynaklı faktörler).



İmplantasyon başarısızlığı

- ✦ İmplantasyon başarısızlığı, **üremede** en önemli **sınırlayıcı** basamaklardan biridir. [döngü başına başarılı implantasyon oranı %30]
- ✦ "**İmplantasyon başarısızlığı**" terimi ile **embriyonun** hem **spontan** hem de **IVF** (in vitro fertilizasyon) sonrası maternal endometriuma **implante olamadığı** durumlar ifade edilir.
- ✦ **Beş** veya daha **fazla** kaliteli embriyonun transferinden sonra implantasyon başarısızlığının meydana geldiği durum, **tekrarlayan** implantasyon başarısızlığı (**RIF**) olarak tanımlanır.



Endometrial döngü

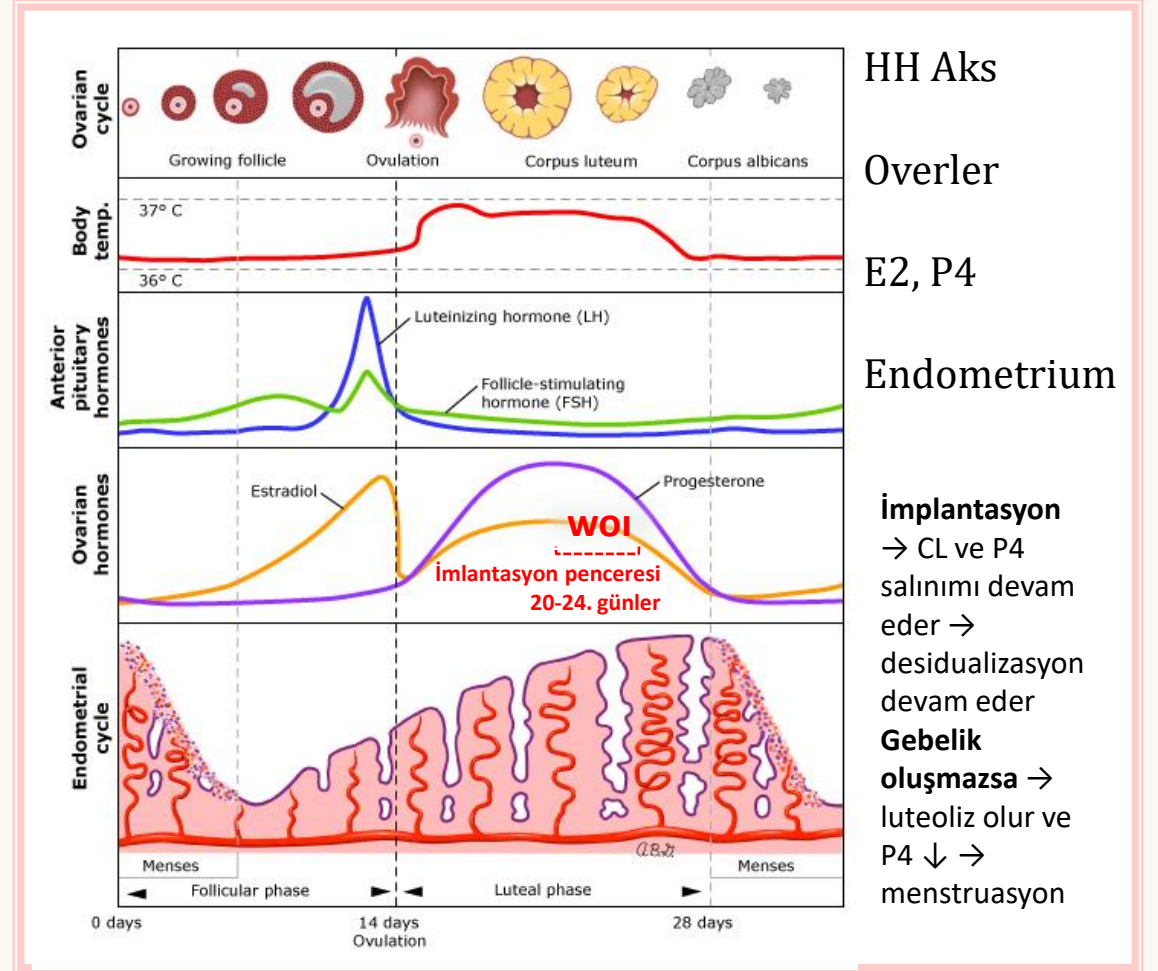
✎ Endometriyum:

- ✚ **Epiteliyal** h.ler: tek sıralı kolumnar
- ✚ **Mezenkimal** h.ler endometrial stroma
- ✚ **Endotelyal** h.ler: kan damarlı, spiral a
- ✚ **İmmün** h.ler: dNK, NKT, T, B, DH, M.

✎ Her siklusta gelişip **dökülen** tabaka **Fonksiyonel** tabaka:

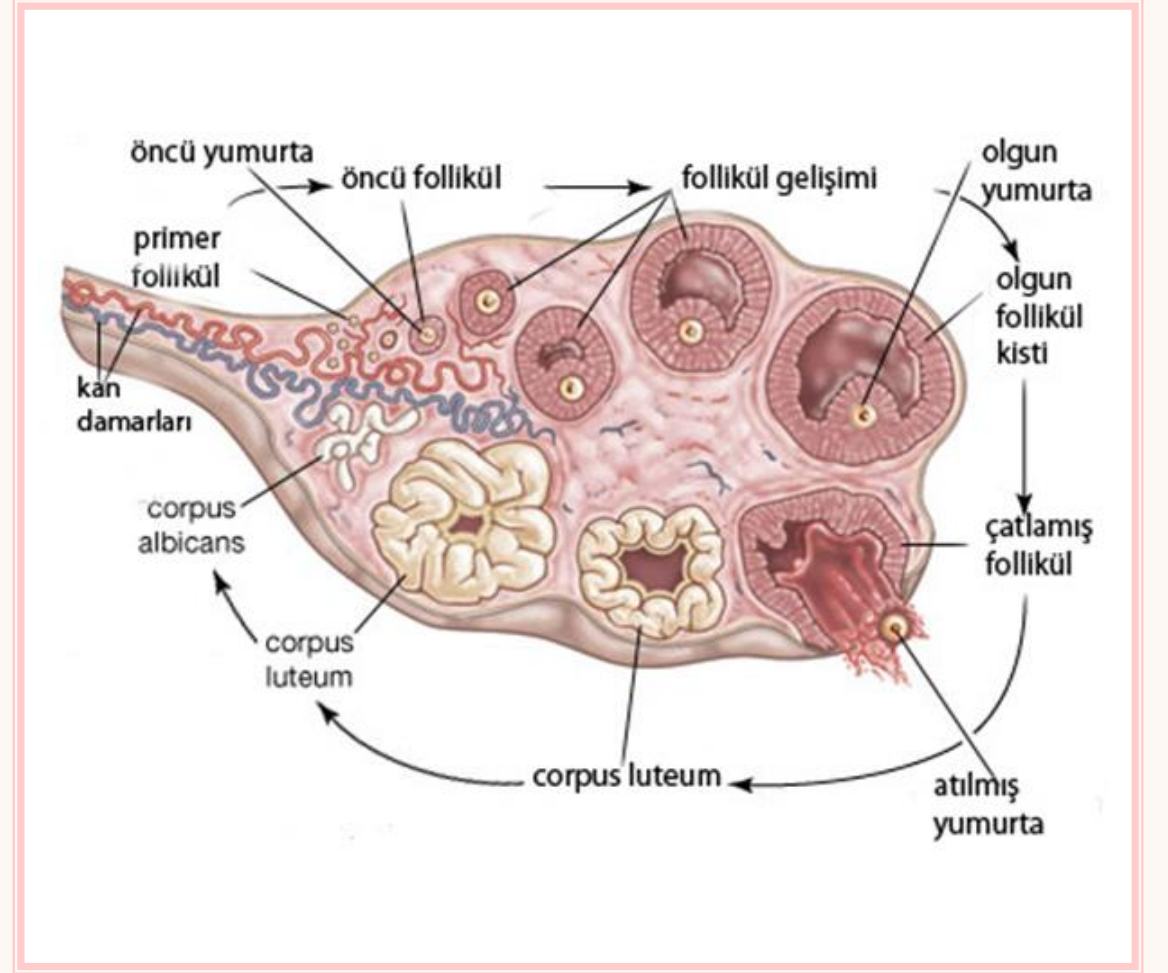
✎ Fonksiyonel endometriyumunu **yenileyen** tabaka **Bazal** tabaka.

✎ Ovulasyon öncesi **proliferatif** faz (**foliküler**): östrojen, EGF, TGF α , FGF9, VEGF. Ovulasyon sonrası **sekretuar** (luteal) faz: **progesteron** hakimiyeti



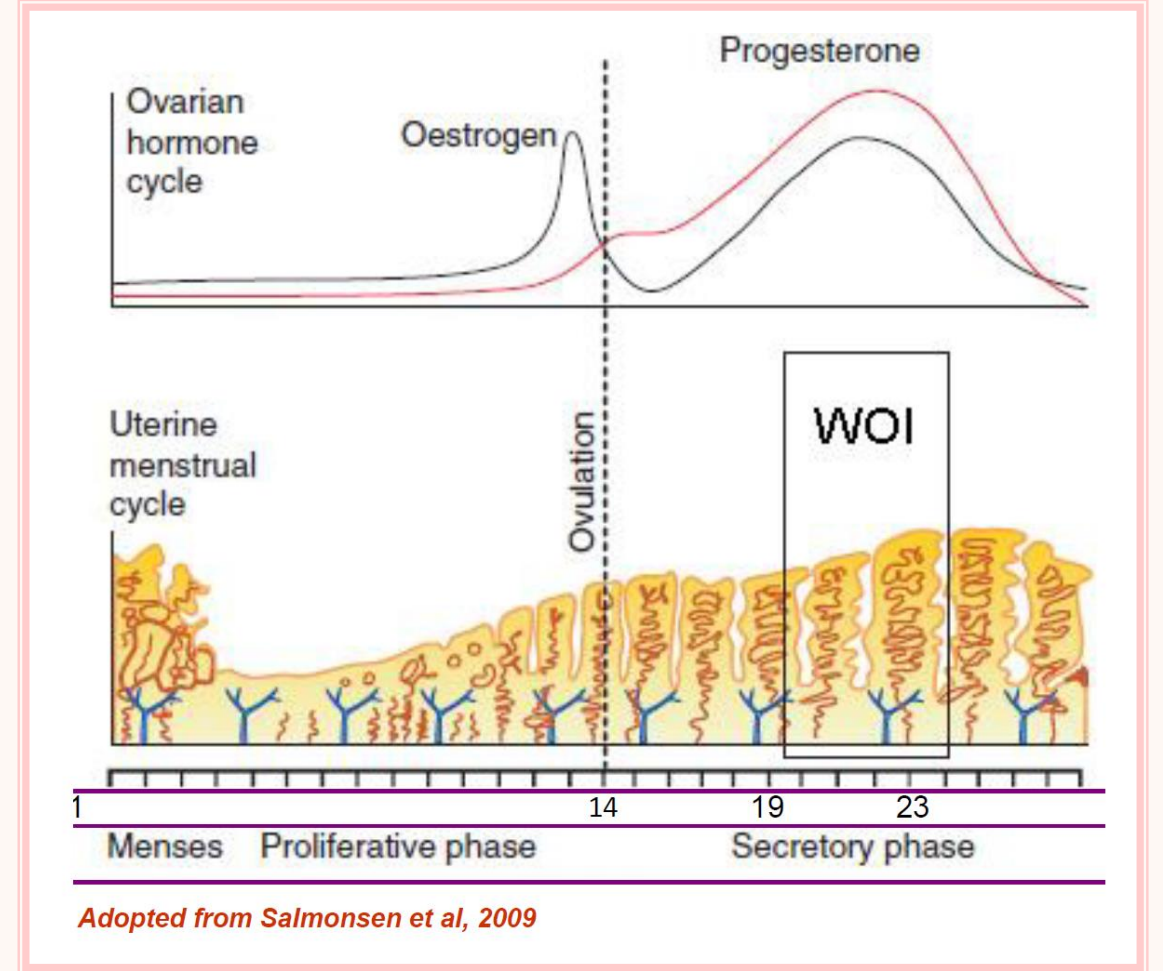
Endometrial döngü

- ✚ **Sekretuar (luteal) fazda fonksiyonel tabakada predesidual** değişiklikler meydana gelir (23-28. günler).
- ✚ Endometrial **bezlerin miktarı**, kıvrımları ve **salgıları** artar.
- ✚ **Spiral arterler**: uzar ve kıvrımlarında artış olur.
- ✚ Stromada **dNK hücreleri (CD56bright)**, **DH'ler** ve **T hücreleri** birikir.
- ✚ **İmplantasyon** gerçekleşirse → **korpus luteum** ve **progesteron** salınımı devam eder → **desidualizasyon**.
- ✚ **Gebelik** oluşmazsa → **luteoliz** olur ve progesteron ↓ → **menstruasyon**



Endometrial reseptivite: WOI

- Östrojen (E2) ve progesteron (P4), endometriyal döngü sırasında morfolojik ve işlevsel değişikliklere neden olur.
- **Sekretuar fazda** uterus, sadece **kısa bir süre** için **blastosist** implantasyonuna elverişlidir (**reseptif endometrium**).
- **İmplantasyon penceresi (WOI)** olarak adlandırılan bu dönem, ovulasyondan **6-10** gün sonra ya da **midsekretuar** fazda siklusun **20-24.** günleri arasındadır.
- **WOI** sırasında endometriyum reseptivitesi **en yüksek** seviyededir.
- Moleküler çalışmalar yapılarak birçok türde “**WOI imzası**” tanımlanmıştır



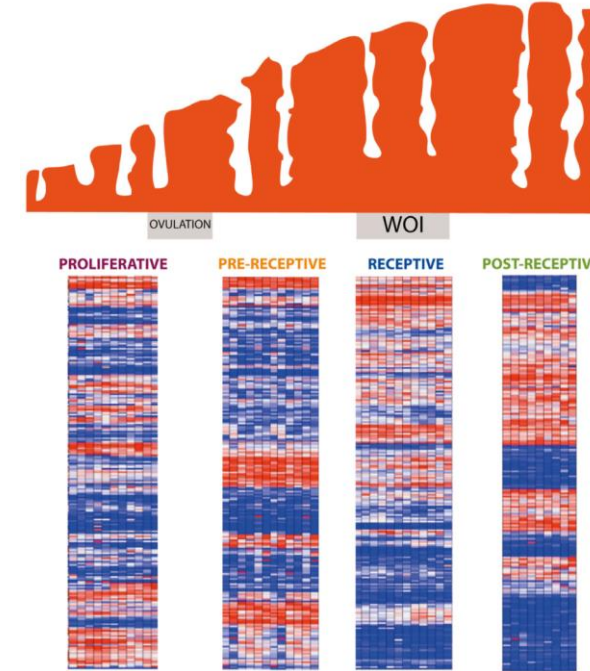
Endometrial reseptivite: Transkriptomik

- ✎ 21. yy başından beri, WOI sırasında endometriyumun global **transkriptomik imzasını** belirlemek için bir dizi çalışma yapılmıştır.
- ✎ Yöntemlerdeki farklılıklar nedeniyle çalışmalar arasında önemli farklılıklar olmasına rağmen, WOI sırasında anlamlı bir şekilde ifade edilen endometriyal **gen varyantları** tespit edilmiş, **veritabanı** geliştirme fırsatı doğmuştur.
- ✎ **238 gen** taranabilen **ERA**: (endometrial receptivity array) oluşturulmuş. Bu metod, tanısal bir araç olarak geleneksel yöntemlerden daha üstün (doğruluk ve tekrarlanabilirlik)

Transcriptomics of the human endometrium

PATRICIA DÍAZ-GIMENO^{1*}, MARIA RUÍZ-ALONSO², DAVID BLESA^{1,2} and CARLOS SIMÓN^{1,2,3}

Int. J. Dev. Biol. **58**: 127-137 (2014)
doi: 10.1387/ijdb.130340pd



Transkriptomikler gen ifadesinin mRNA seviyesinde karakterize eder. **Transkriptomik imza, biyolojik bir süreci veya hastalığı tanımlar ve hastalık fenotiplerini belirler.**

Endometrial transcriptomics profile. Evolution of endometrial tissue over time and the gene expression profile at each given stage. Heatmap showing the ERA gene expression profiles in each endometrial cycle stage (proliferative, pre-receptive, receptive, and post-receptive).

Endometrial reseptivite: WOI

✎ E. reseptiviteyi belirleyen moleküller

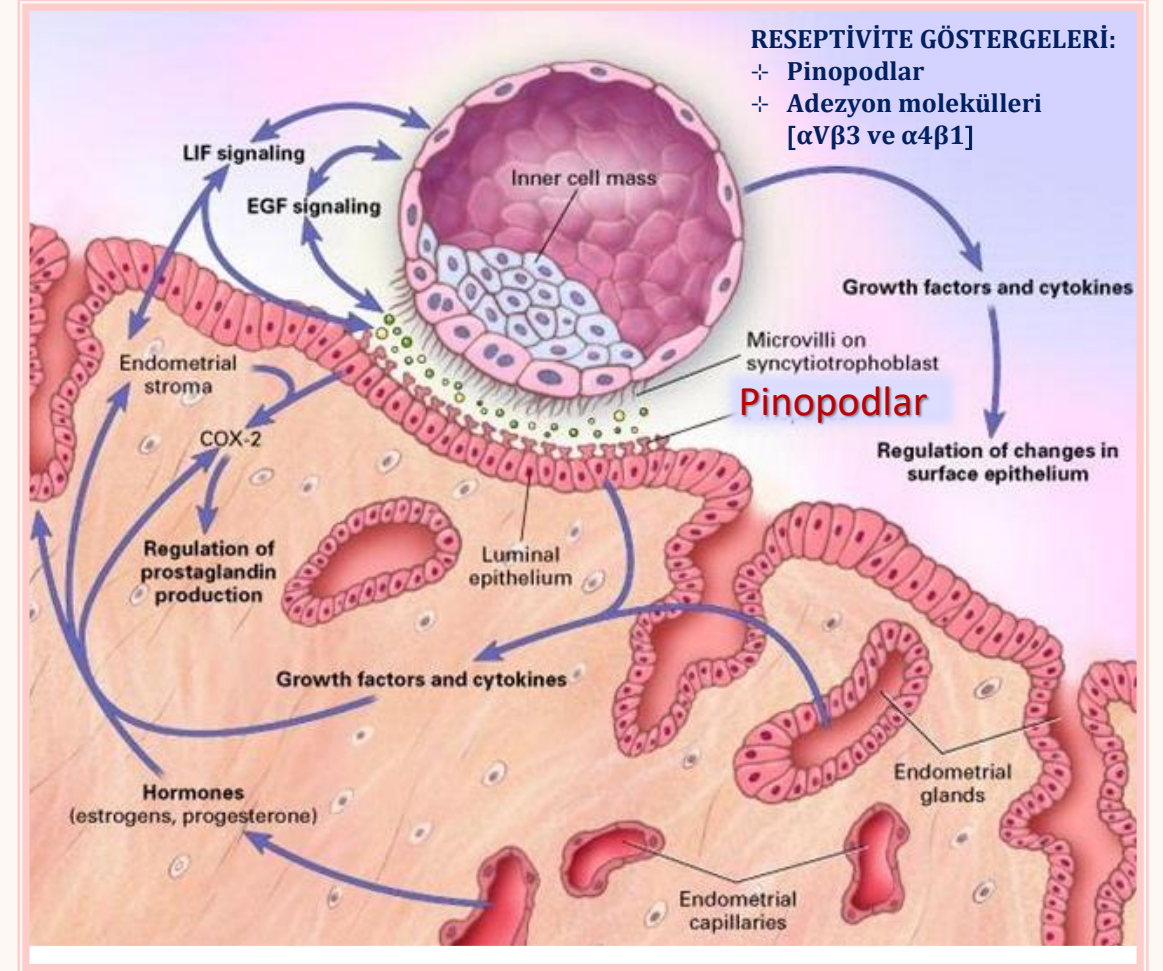
✎ **Pinopodlar:** epitelin lüminal yüzeyinde blastokist implantasyonu için gerekli olan çiçek benzeri **mikrovilluslar**.

✎ **Selektin** ligandları: **TB** hücreleri, yüzeyinde ifade edilen **L-selektine** bağlanarak **implantasyon** alanı belirlenir.

✎ **Müsin1 (MUC1)**, müsin benzeri büyük bir **transmembran** glikoproteini.

✎ **İntegrinler**, endometriyum **reseptivitesini** gösteren **en iyi belirteçlerdir**. $\alpha V\beta 3$ (pinopodlarda).

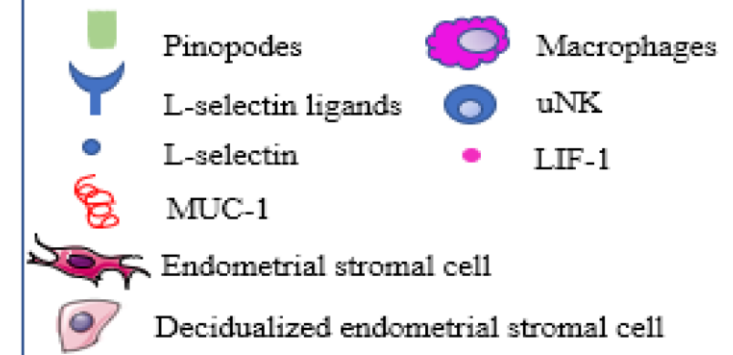
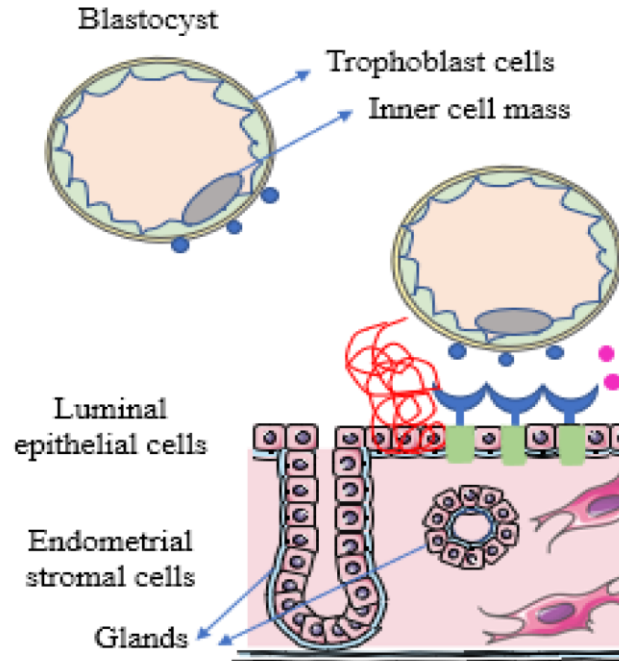
✎ **Osteopontin:** ep. yüzeyinde $\alpha v\beta 3$ **integrine** bağlanan bir **glikoproteindir**



İmplantasyon süreci: apozisyon

HUMAN IMPLANTATION AND DECIDUALIZATION

Window of implantation



Apozisyon aşamasında **L-selektin**, karbohidrat **ligandları** ile etkileşime girerek **blastokistin** uterus **epiteline** bağlanmasına aracılık eder. **MUC1**, L-selektinin endometriyum yüzeyindeki ligandına bağlanmasında düzenleyici görev yapar.

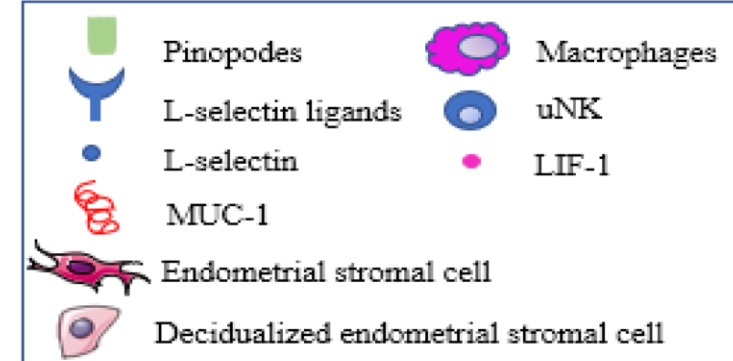
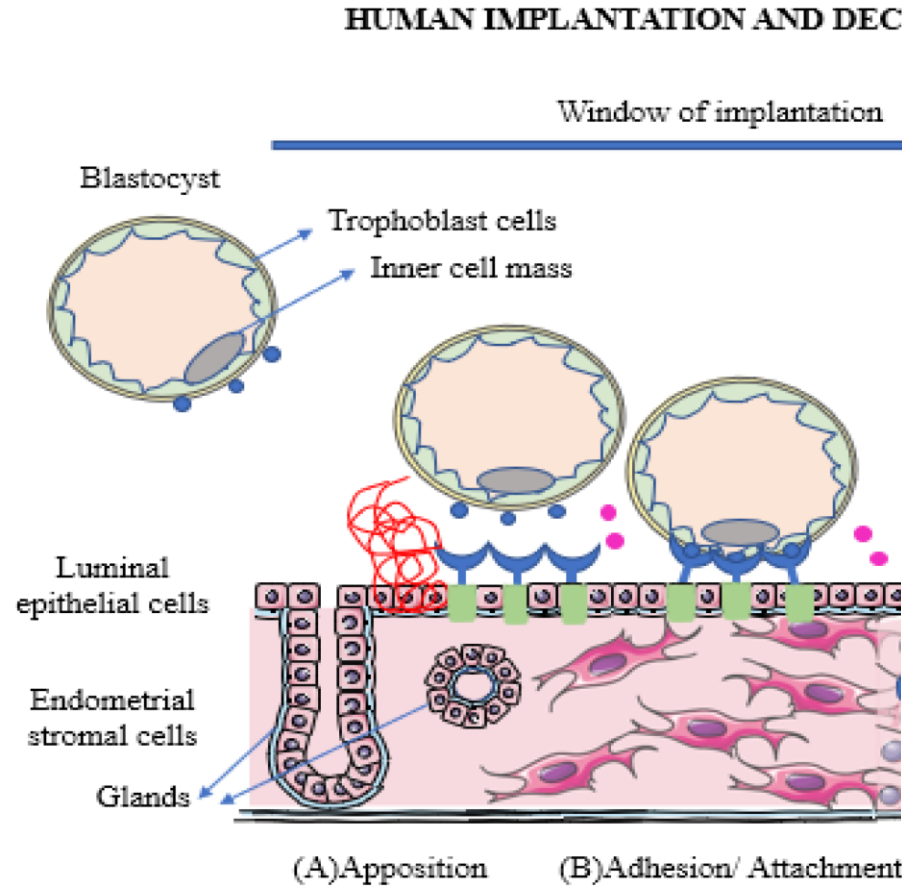
(A) Apposition

(B) Adhesion/ Attachment

(C) Invasion/ Penetration

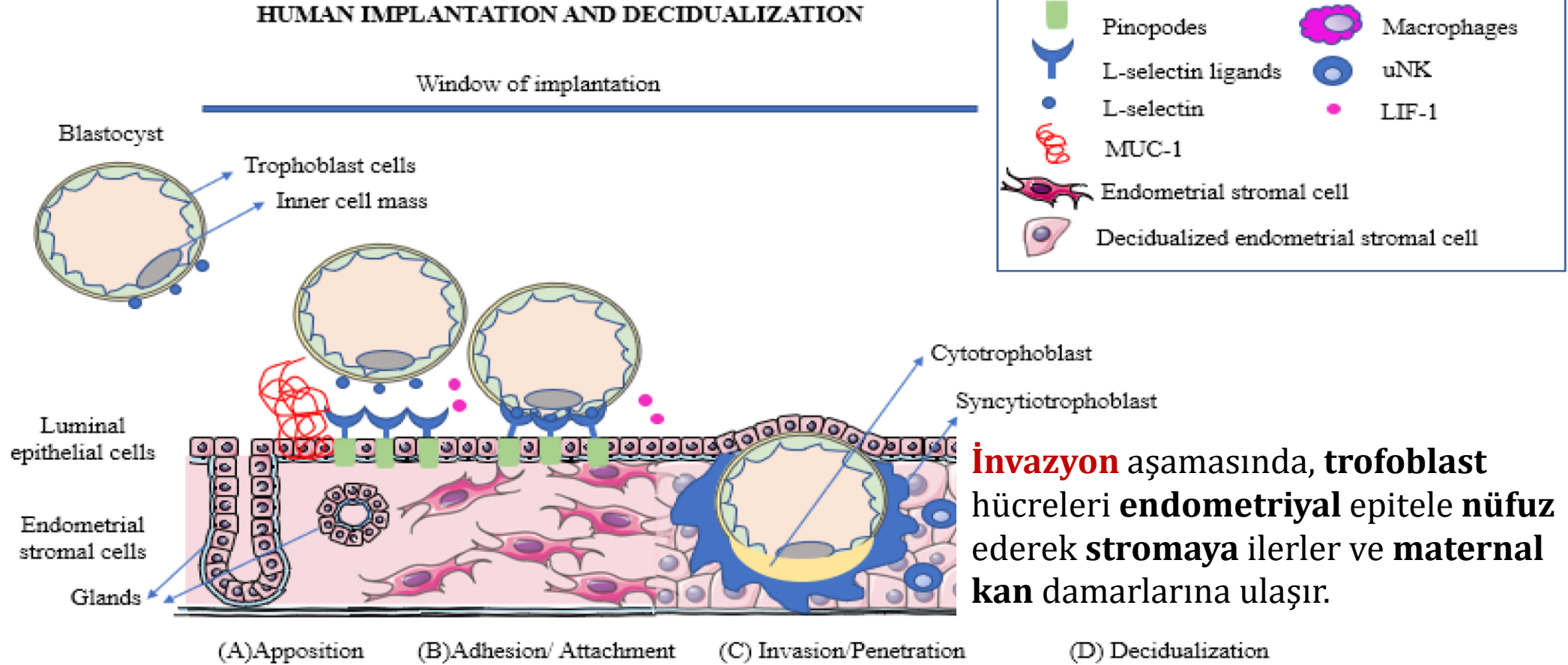
(D) Decidualization

İmplantasyon süreci: adezyon



Adezyon aşamasında ise endometriyal epitel yüzeyinde ifade edilen integrin $\alpha v \beta 3$ ile ligandı **OPN** arasında bağlantı kurulur. Bu da **trofoblastın endometrium** tarafından tanınmasını sağlar

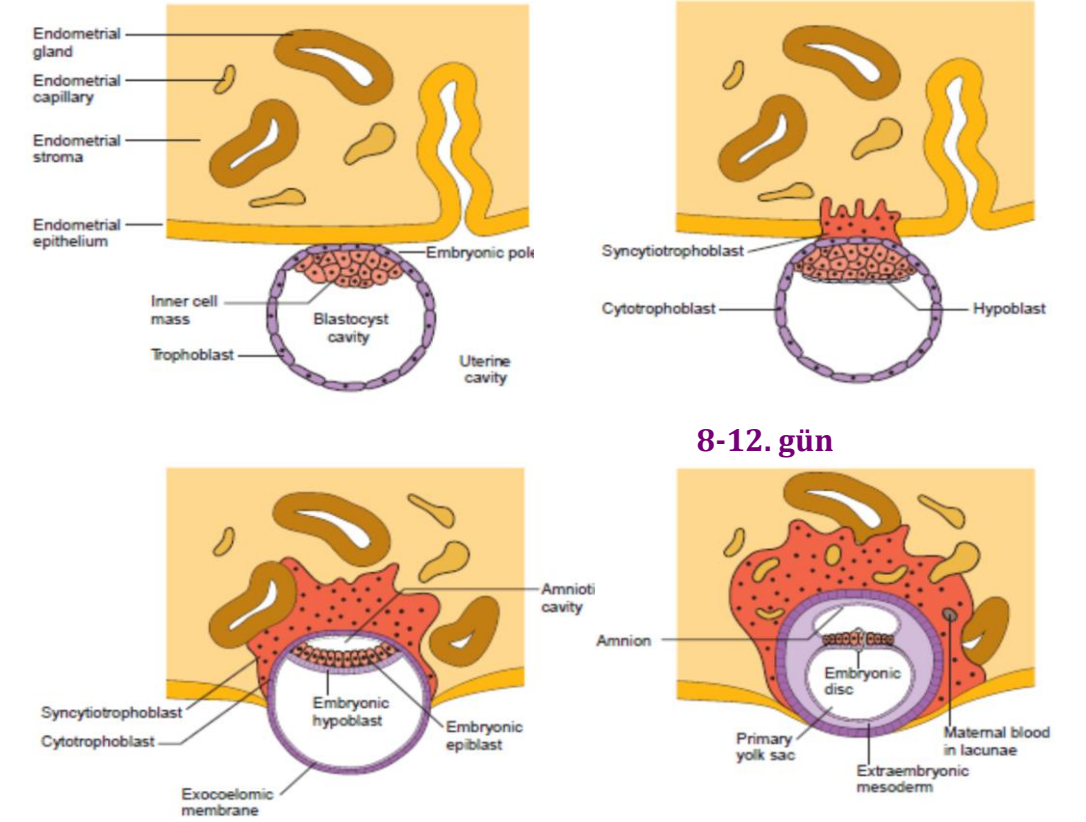
İmplantasyon süreci: invazyon



İmplantasyon süreci: invazyon

- ✎ **TB hücreleri** endometriyal epitel hücreleri arasındaki **boşluklardan** geçerek **bazal membrana** ulaşır.
- ✎ **TB'lardan** salgılanan **MMP'ler** **bazal membran** ve **ECM** yıkımına yol açarak TB'ların **stromaya ulaşmasını** sağlar. TB'ların endometriyuma yerleşmesinde **integrinler** rol oynar. **Endometrium**a göç eden TB'lardan **sinsitiyo-TB** ve **sito-TB'lar** gelişir. **Blastokist** ovulasyondan **8 gün** sonra tamamen stroma içine gömülür ve üzeri **fibrin** ile kaplanır. **12. gün STB'ların** içerisinde, trabeküllerle ayrılmış sıvı dolu boşluklar (**lakünler**) ortaya çıkar.

STB'ler maternal kan damarlarıyla temas eder ve anne kanı lakuna içine geçerek gelişen konsept (embriyo/fetus ve plasenta) için **oksijen** ve **beslenme** kaynağı oluşturur. CTB'lar, birincil koryonik villusları oluşturmak üzere STB trabeküllerine doğru büyür.

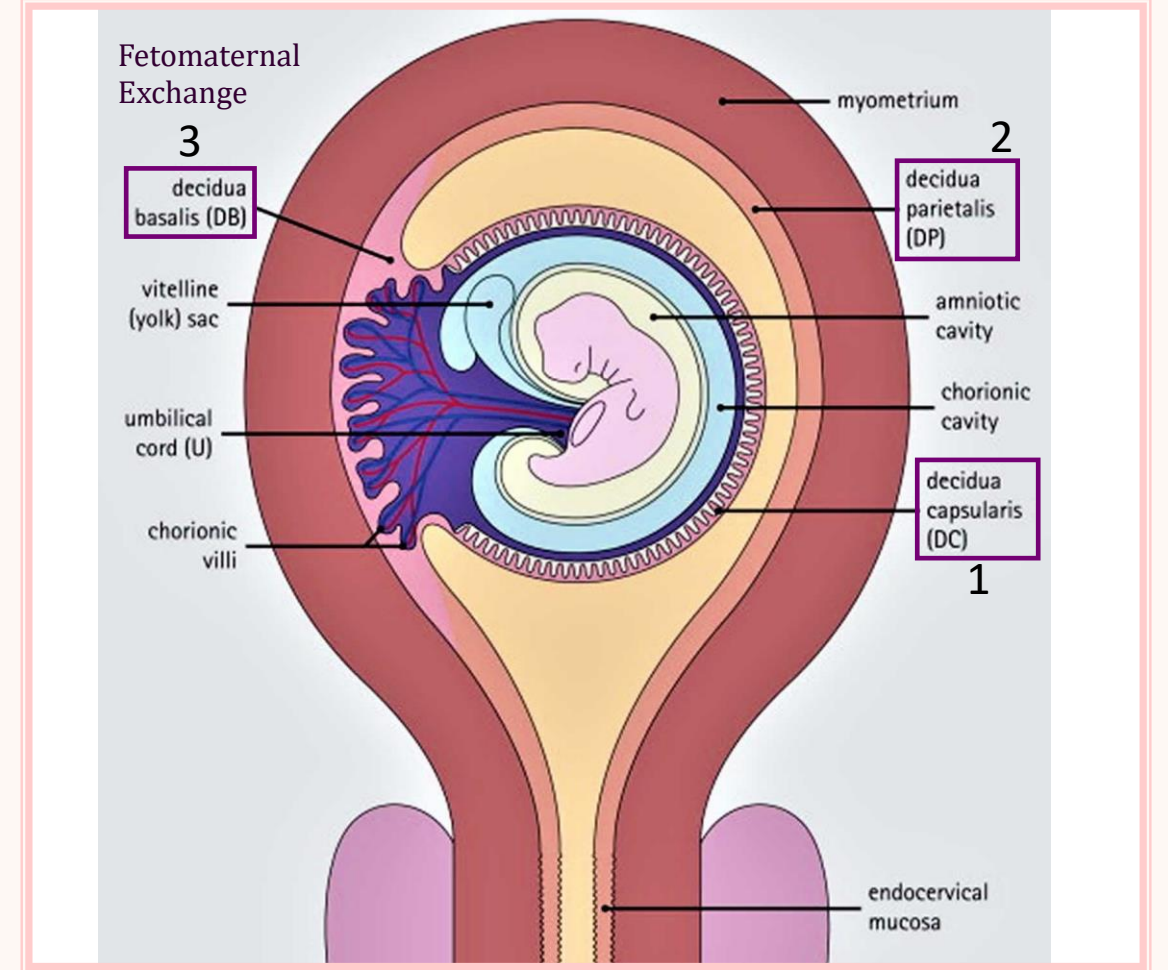


Kontrollü trofoblast invazyonu

✿ **Desidua**, bir yandan trofoblast **invazyonunu uyaran** bir **mikroçevre** oluştururken, diğer yandan trofoblast hücrelerinin invazyonunu **sınırlayan** bir ECM oluşturmaktadır. Böylelikle endometrium **hasardan korunmuş** olur.

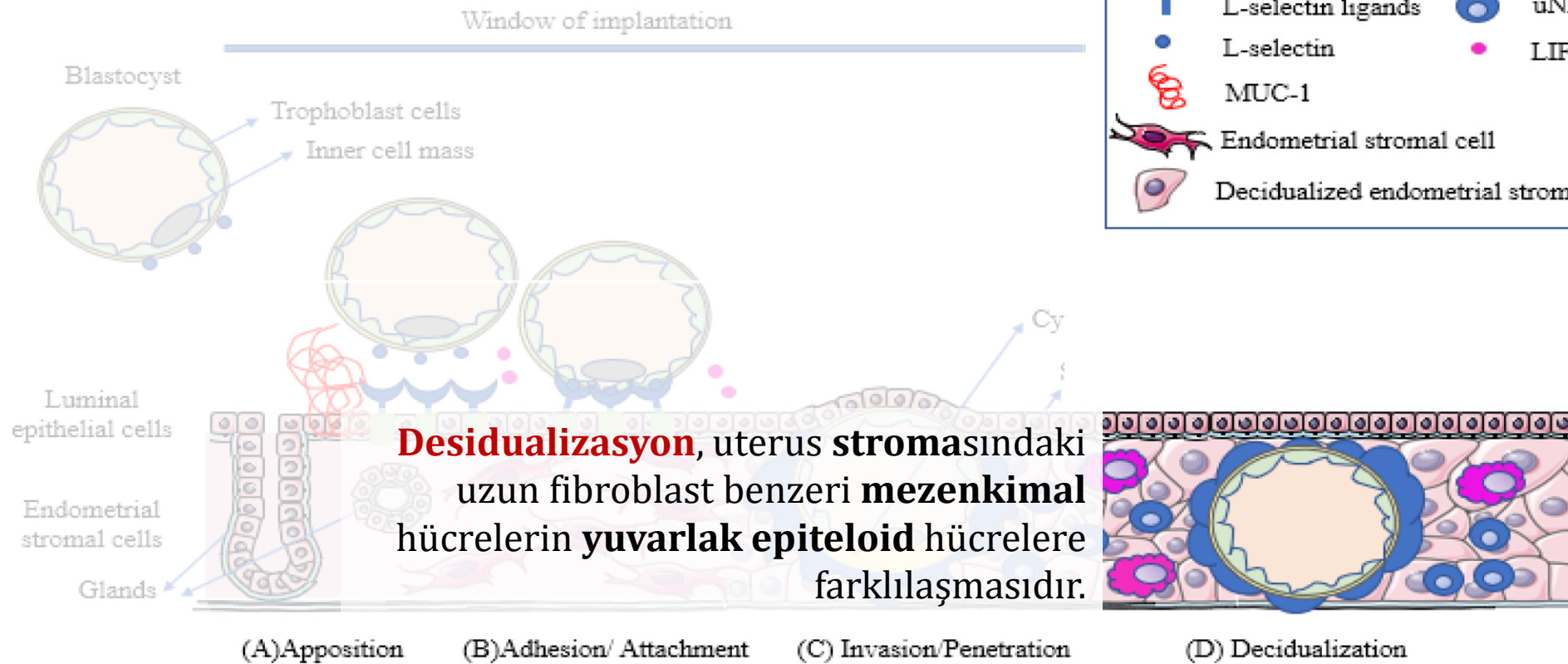
✿ Desidualize **stromal hücrelerde** progesteronun etkisi ile **TIMP-3** ifadesi artarken, TIMP-1,-2 ifadesi değişiklik göstermez. [MMP'lerin etkileri, metalloproteinaz doku inhibitörleri (**TIMP**) tarafından inhibe edilir].

✿ Ayrıca desidual stromal hücrelerden **TGF β** salgılanarak **MMP** üretimi **inhibe** edilir. (MMP kontrolü sağlanır)



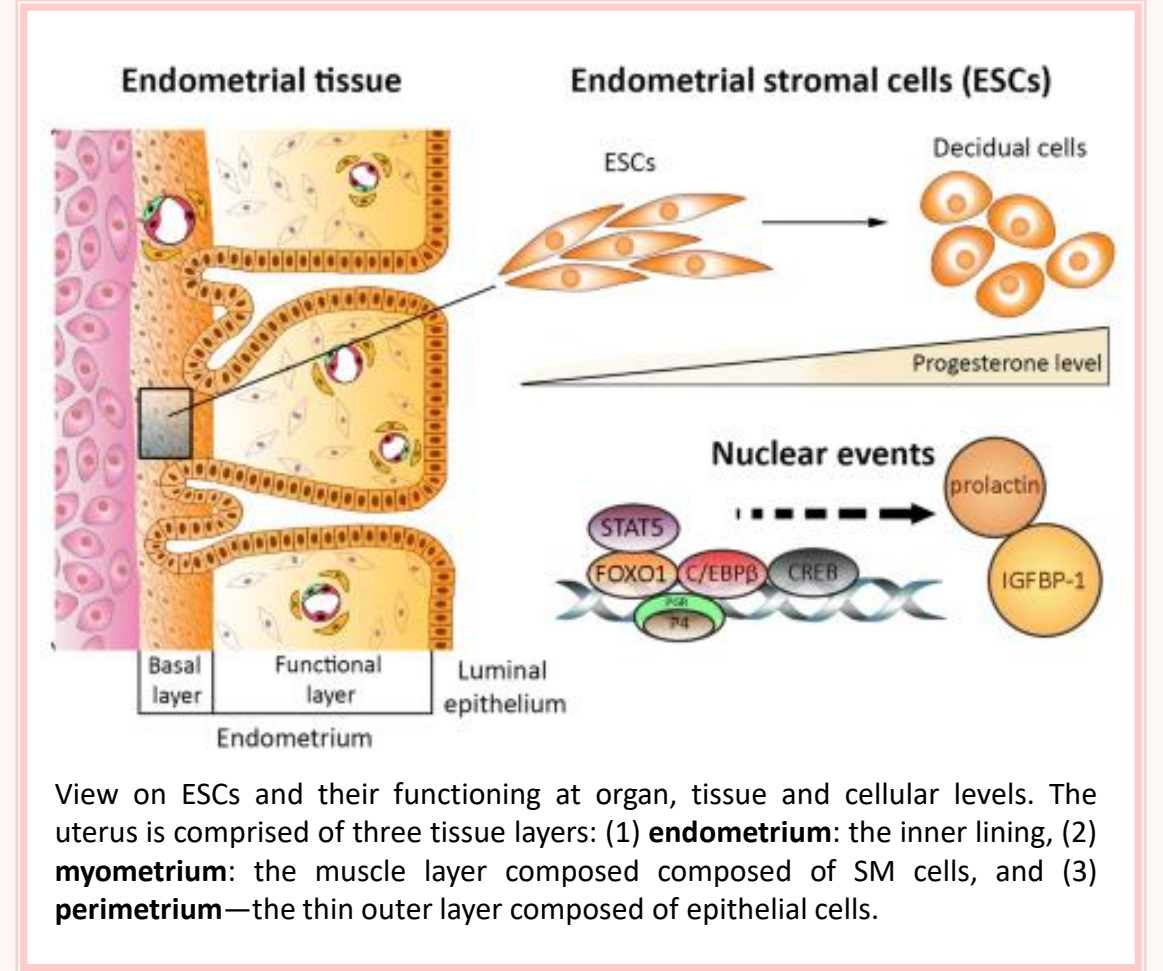
Desidualizasyon süreci

HUMAN IMPLANTATION AND DECIDUALIZATION



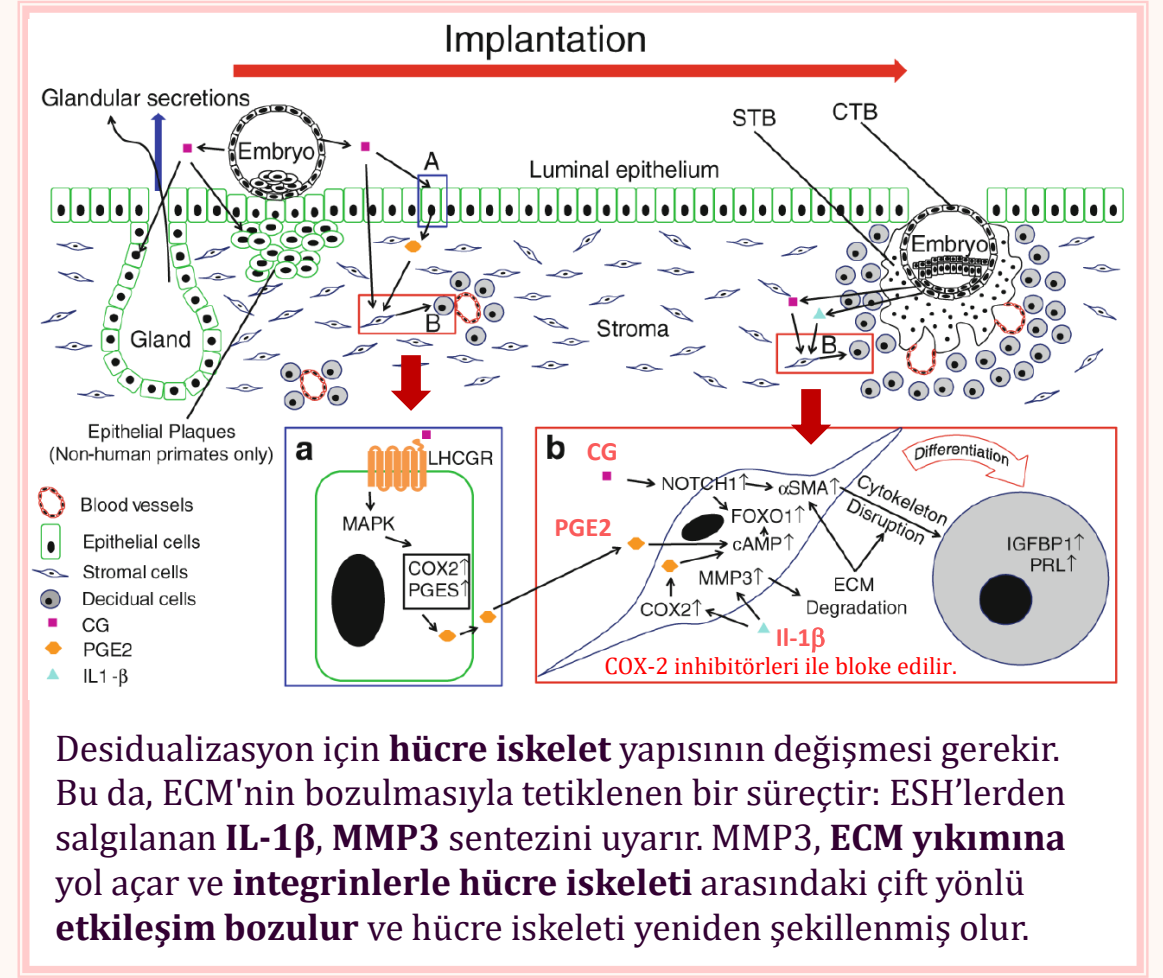
Desidualizasyon

- ❖ Desiual hücreler **epiteloid hücrelerin** özelliklerini göstermektedir:
- ❖ Hücrenin progresif **genişlemesi**, çekirdeğin yuvarlanması, **nükleollerin** artması ve karmaşıklığı, kaba **ER** ve **Golgi** kompleksinin genişlemesi, **glikojen** ve **lipid** damlacıklarının sitoplazmik birikimi ve salgı granülleri.
- ❖ Bu hücreler arasında, bağlantı noktaları vardır ancak bunlar desmozom değildir. (TB invazyonuna yardımcı olmak için).
- ❖ Desidual hücreler tarafından üretilen **ECM proteinleri**: dekorin, laminin, tip IV kolajen, fibronektin, proteoglikanlar.



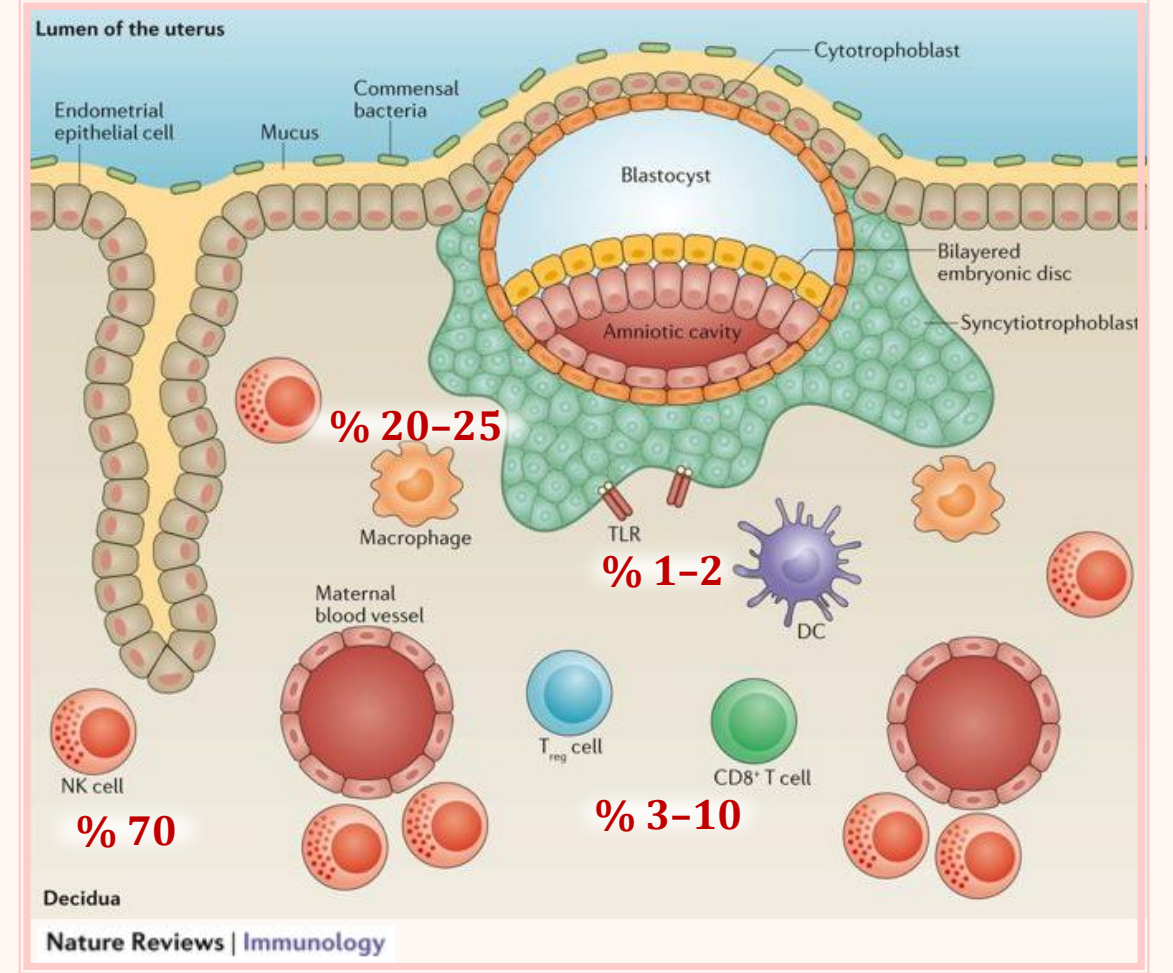
Desidualizasyon

- Desidualizasyonda önemli **cAMP** ↑ seviyesi **gebelikte PGE2, hCG** ile ilgilidir.
- (a) **hCG** endometriyal **epitel** hücrelerinde **PGE2** üretimini kontrol eden enzimlerin (**COX2, PGES**) artmasını sağlar; (b) **hCG** ESC'lerde → **IL-1β** ile birlikte **COX2, PGE2** ve **cAMP** seviyesini yükseltir; **αSMA** ifadesini artırır. (c) **hCG** uyarısıyla **NOTCH αSMA** ve **FOXO1**'in ifadesini düzenleyerek **desidualizasyonda** rol oynar. Süreç tamamlandığında **IGFBP1** ve **PRL** ifadesi artar, **NOTCH1** ve **αSMA** azalır.
- LIF** reseptivitede rol oynayan **IL-6** ailesinden önemli bir sitokin.



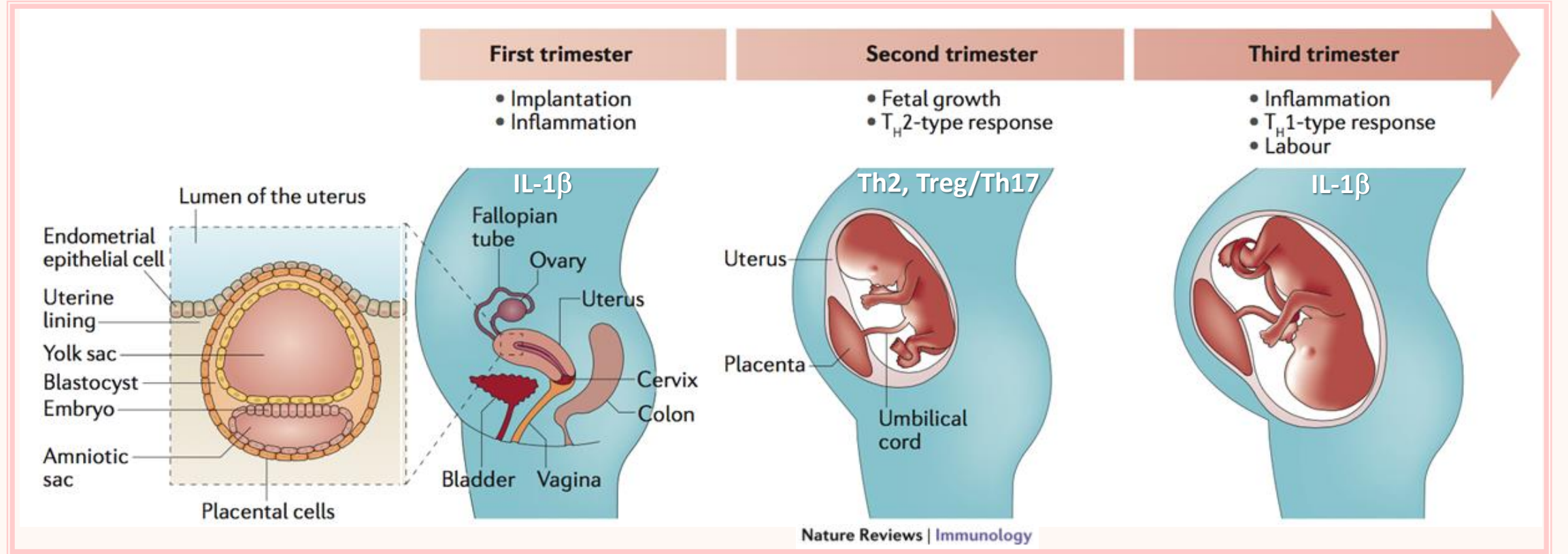
Desiduada hücresel dağılım

- ❖ Desiduada primer **hücresel elemanlar**:
- ❖ **Desidualize stromal** hücreler ve maternal **Kİ** kökenli hücreler:
- ❖ Desidual **KİKH**'ler → **%70'i uNK** (CD16⁺CD56^{bright}NK) hücresi, **%20-25'i** makrofaj (**M2**), **%1-2'si** maternal dendritik hücre (**DC**), **%3-10'u T** hücresi (**CD8⁺, n-iTreg**), çok düşük oranda **B** hücresi bulunur. Bu hücreler...
- ❖ Sitokin kemokin, anjiogenik faktörler
- ❖ Desidual immün hücrelerin kalitatif ya da kantitatif yetersizliği trofoblast **in-vazyonunu** bozar, **anjiogenezi** azaltır ve **rejeksiyona** uygun zemin hazırlar.



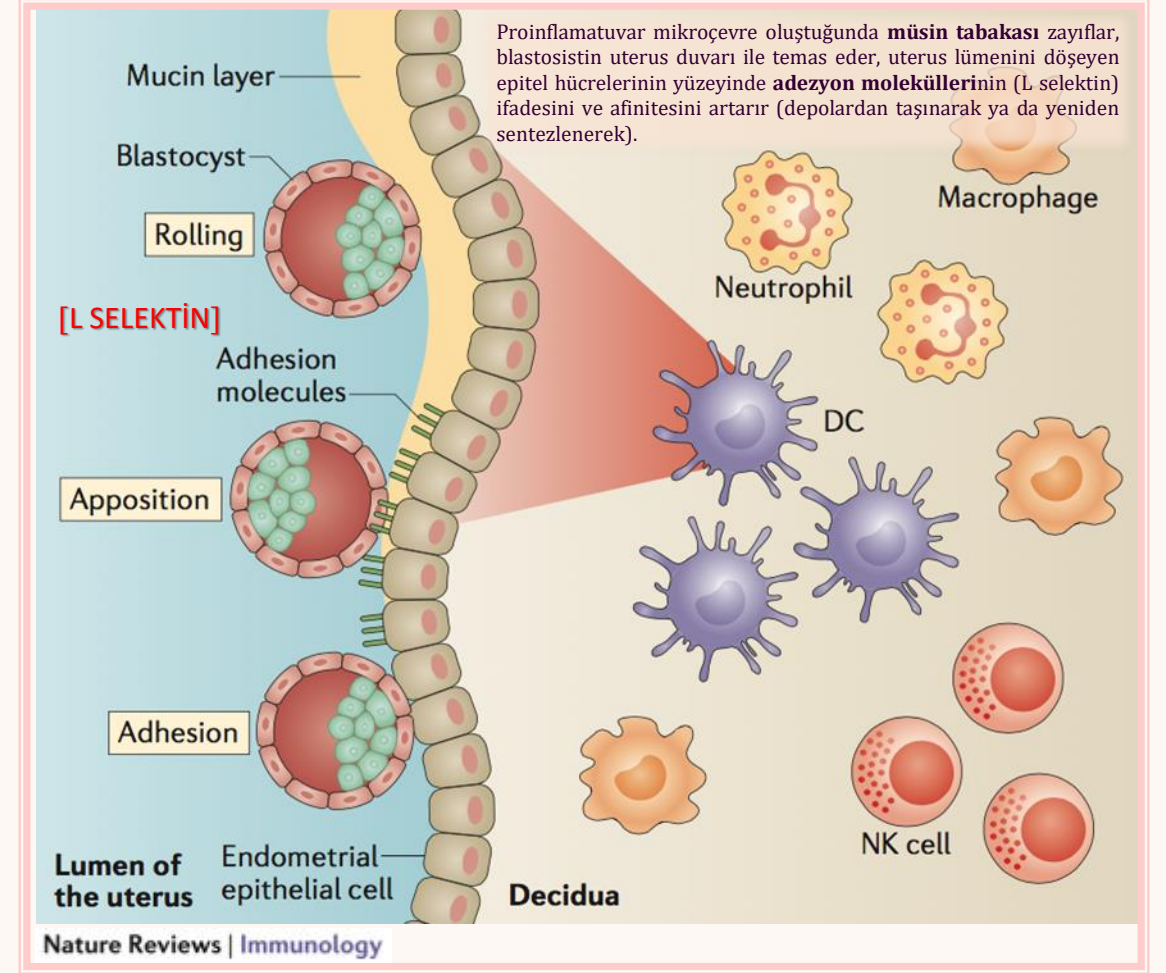
Gebelik evreleri:

- Gebeliğin başarısı, anne bağışıklık sisteminin ve fetüsün bu süreçte mey. gel. değişimlere uyum sağlama yeteneğine bağlıdır. [implantasyon, inflamasyon, TH2(FG)/TH1(L)]

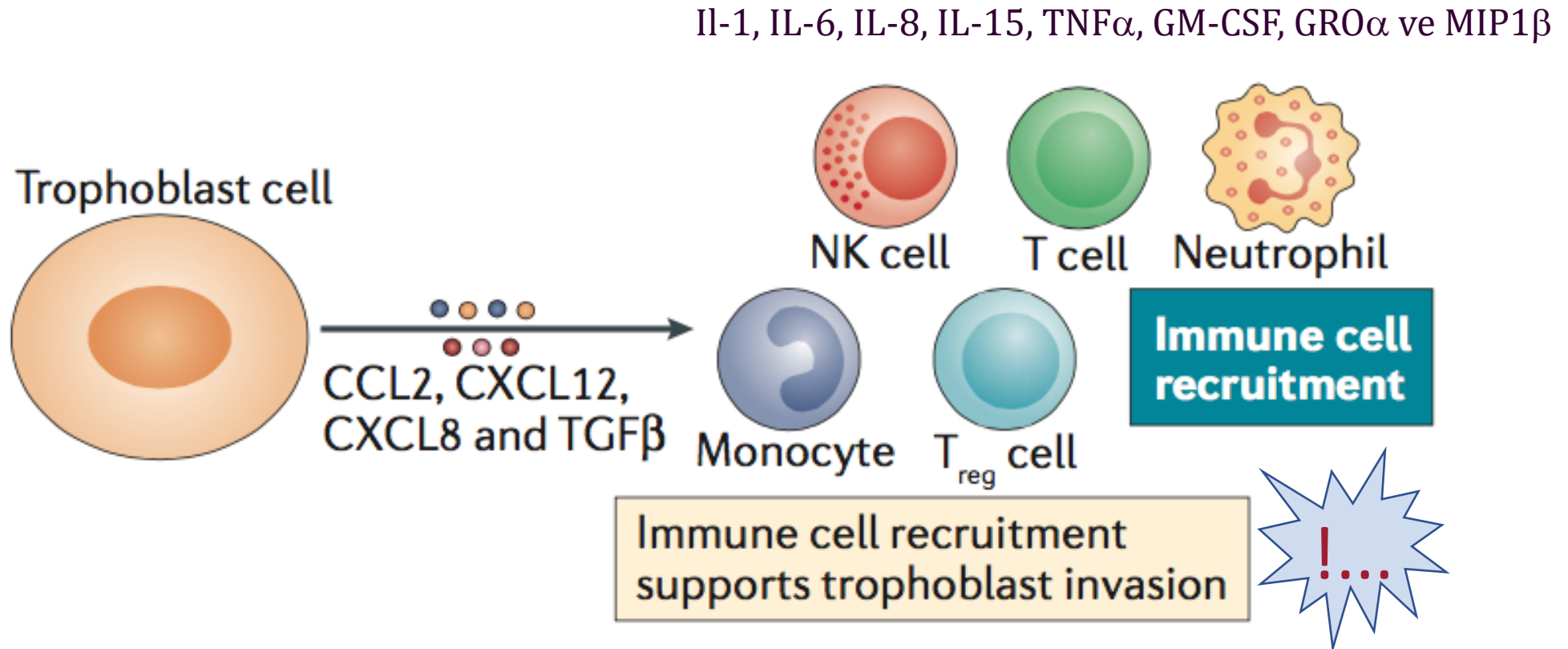


İnflamatuvar başlangıç

- ❖ Birinci trimester, implantasyon ve plasantasyonu sağlayan **proinflamatuvar** bir aşamaya karşılık gelir. (önce doku hasarı, ardından onarım süreci).
- ❖ Proinflamatuvar **mikroçevre** implantasyon bölgesinde **endometrial stromal** hücrelerden salgılanan **sitokin** ve **kemokinlerin** (IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, TNF α , GM-CSF, GRO α , MIP1 β) oluşturduğu **inflamatuvar** sinyaller **trofoblastların** endometriyum duvarına **invazyonunu** sağlarken,
- ❖ Trofoblastlar **MCP1**, **SDF1** ve **IL-8** salgılayarak **bağışıklık hücrelerinin** bu bölgede toplanmaya teşvik eder.



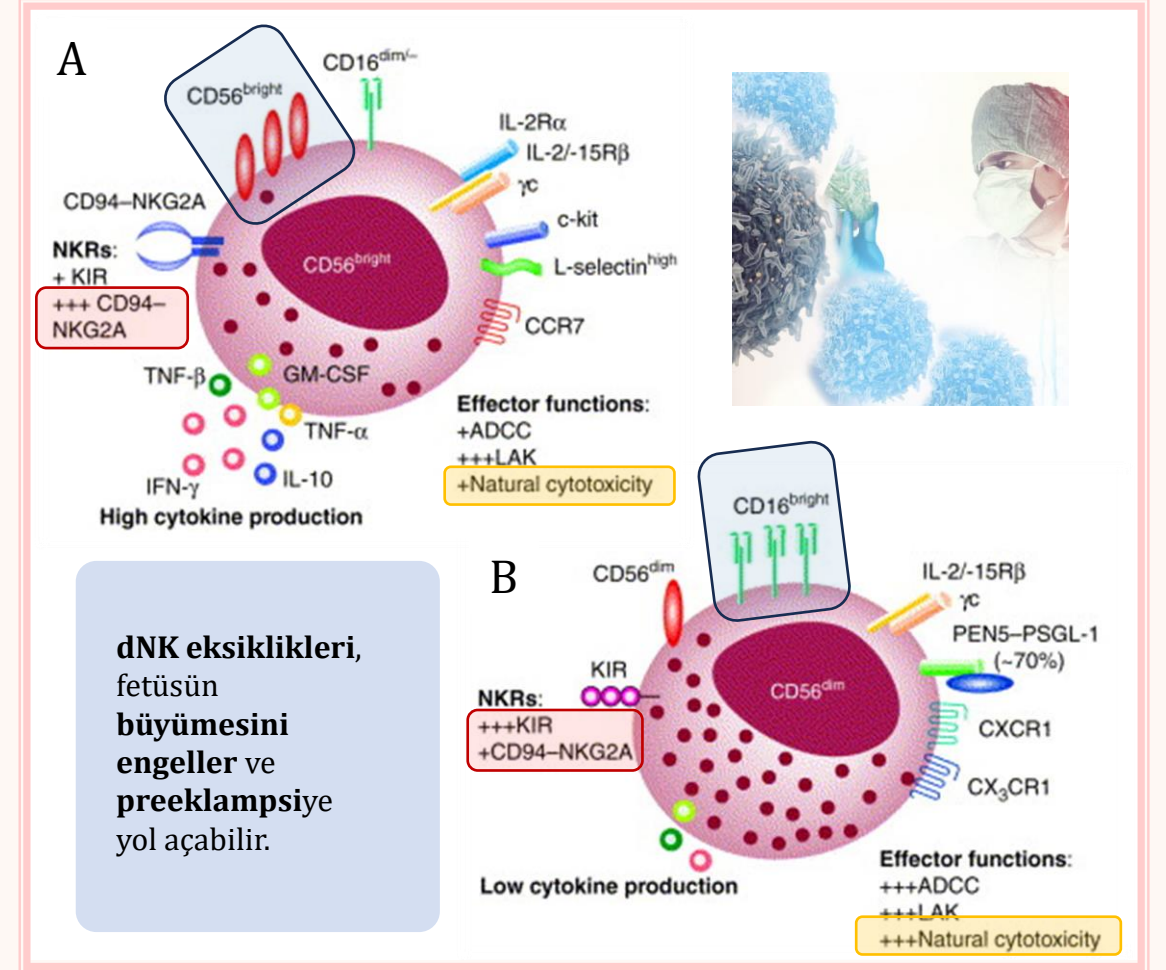
İnflamatuvar başlangıç



CCL2: MCP1, CXCL12: SDF1, CXCL8: IL-8

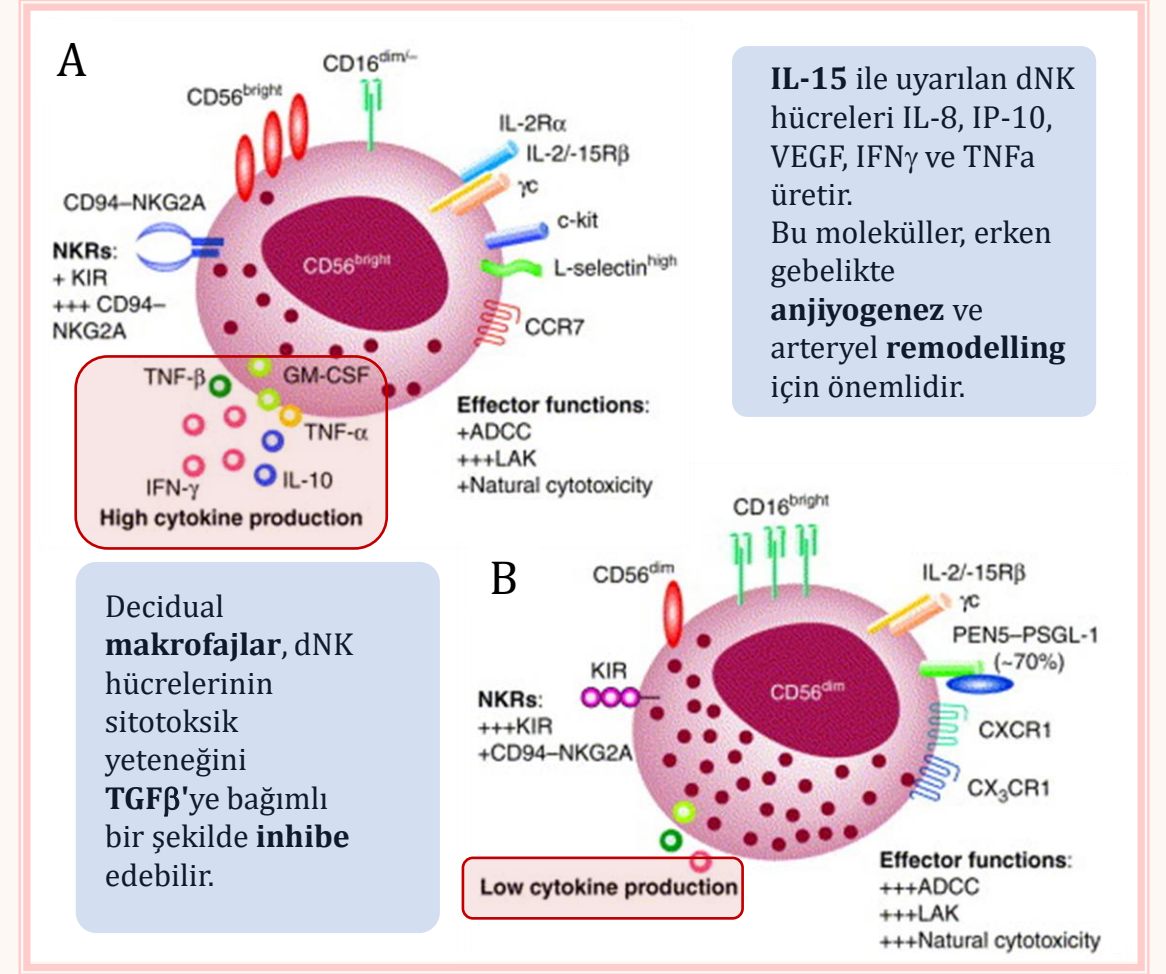
dNK hücreleri

- ❖ **Desidüal NK hücreleri**, immün fenotipleri ve işlevleri açısından **periferal** kanda bulunan NK hücrelerinden farklıdır. **dNK** hücrelerinin %70'inde immün fenotip **CD56^{bright}CD16^{dim}** ve **sitotoksik aktiviteleri düşüktür**. (Periferal kanda tam tersi imm.fenotip).
- ❖ Ayrıca **dNK** hücrelerinde yüksek oranda **KIR, KLRD1 (CD94), KLRC1 (NKG2A), CD49a (CXCR6)** ifadesi vardır ve **CD69** ifade eden hücre oranı artmıştır.
- ❖ **dNK** hücrelerinde, **pNK** hücrelerine kıyasla, **CD94** ve **NKG2A reseptör** ifadesi daha fazla. Bunlar **HLA-C** ve **HLA-E** ile bağlanarak **inhibitör sinyal** oluşturur.



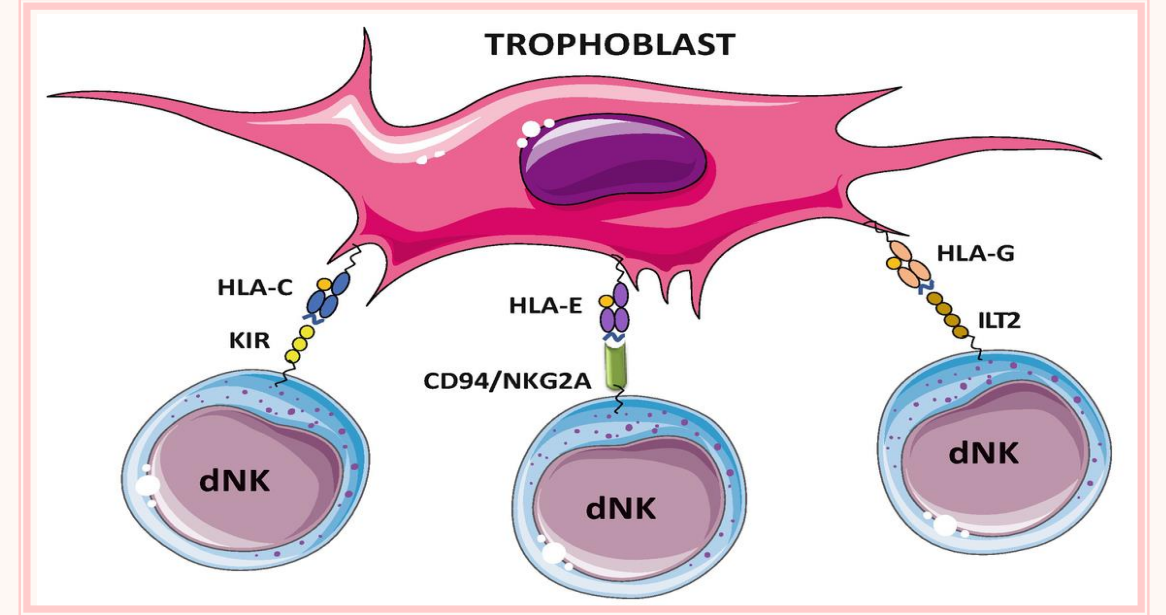
dNK hücreleri

- ✎ dNK hücrelerinin **sitokin** üretme kapasitesi **pNK** hücrelerinden **yüksektir**.
- ✎ Salgıladıkları sitokinler ve büyüme faktörleri, **FM** **ara yüzde** yeterli kan akışını sağlamak için **anjiogenezi** uyarır,
- ✎ Ayrıca hamilelik sırasında toleransın sürdürülmesinde rol oynar.
- ✎ dNK hücrelerinin **sitotoksitesi düşüktür**: sitotoksik yetenek için granüllere sahip olmalarına rağmen, bu granüller verimli bir şekilde çalışmaz (**TGFβ**).
- ✎ dNK hücrelerinin **sitotoksik** yeteneği, **EV trofoblastlarda** ifade edilen **HLA-E** ve **HLA-G**'nin tanınmasıyla azalır.



TB'larda HLA ifadesi

- ❖ **Villöz TB hücreleri** (anne kanıyla temas halindeki plasental hücreler) hiçbir **MHC** molekülü **ifade etmez**. Bu da onları **imm.** olarak **görünmez** kılar.
- ❖ Bu hücrelerin dış tabakası kalın bir **glikokaliks**e sahiptir. Bu da immün tanımayı daha da bozar ve aynı zamanda **sitolitik** saldırıya direnme yeteneği olan **sinsityum** oluşturur (STB).
- ❖ **Ekstravillöz TB'lar** ise (rahim iç yüzeyini istila eden plasenta hücreleri)
- ❖ **CD8+T** hücreleri tarafından tanınma yeteneği sınırlı olan ancak **NK** hücreleri ve **makrofajlar** için ana ligandlar olan



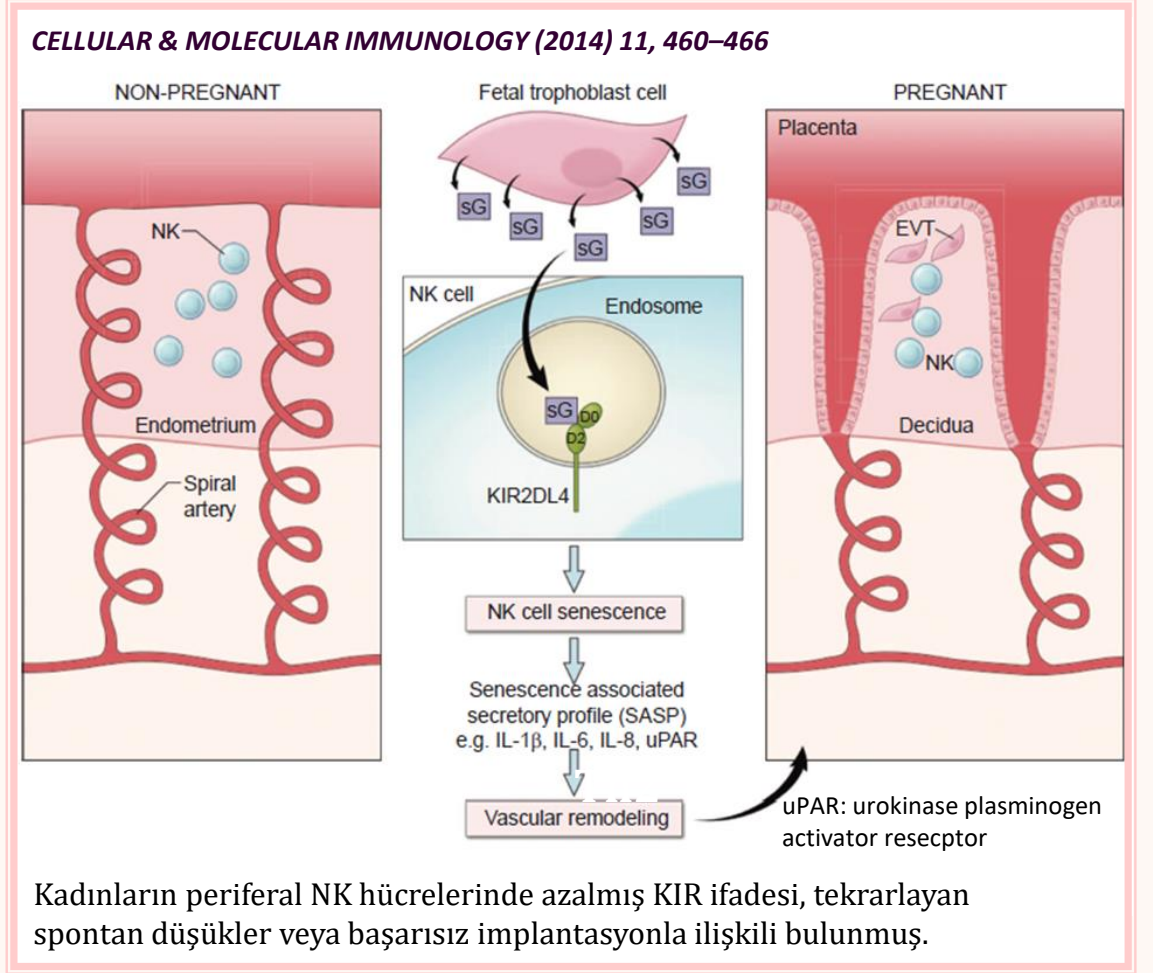
- ❖ MHC moleküllerini (**HLA-C**, **HLA-E** ve **HLA-G** ifade eder. Gebeliğin **6. haftası**
- ❖ EVT'larda **HLA-A** ve **HLA-B** moleküllerinin ifadesi **sınırlı** iken, **HLA sınıf-II** molekülleri **ifade edilmemektedir!**..

dNK hücreleri

• Solubl **HLA-G (sHLA-G)**, NK hücre alt gruplarında yaygın şekilde ifade edilen **KIR2DL4** ligandına bağlanarak hücresel yaşlanma sinyallerini uyarır: buna bağlı olarak **NK hücrelerinin sitotoksitesi azalırken sekresyon profili** değişir (**SASP**). Üretilen sitokinler (IL-1 β , IL-6, IL-8, uPAR) **vaskülarizasyonu** teşvik eder.

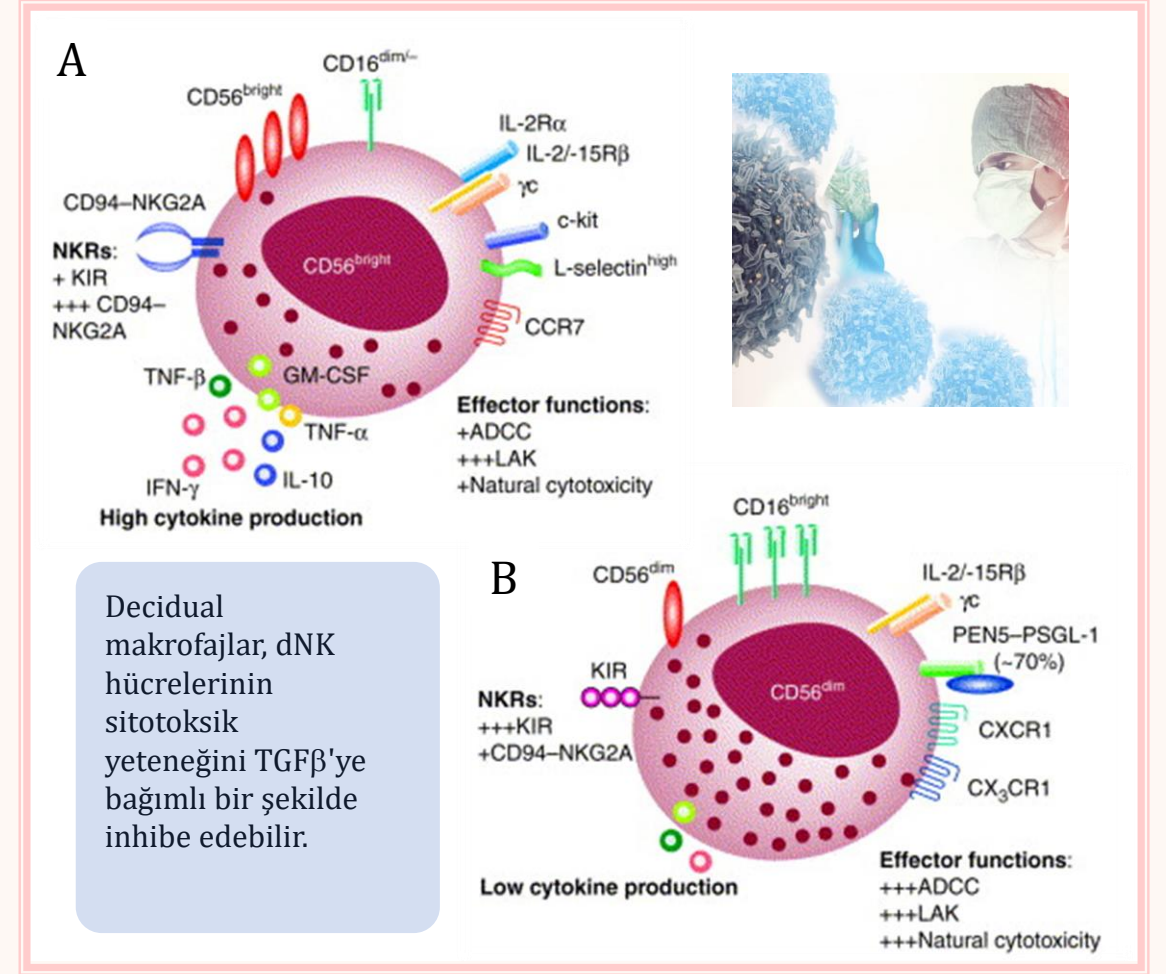
• Ancak, **dNK hücre sitotoksitesi**, inflammatuar bir ortamda artabilir!....

• Örn: **CMV** ile enfekte hücreler dNK hücrelerini **NKG2C/D/E reseptörleri** aracılığıyla **aktif** ederek **sitotoksik** özellik kazandırır!...



dNK hücreleri

- dNK tarafından üretilen $IFN\gamma$, desiduada **CD14+** hücrelerden **IDO** (indoleamine 2 3-dioxygenase) ifadesini uyarır.
- dNK hücreleri, desiduada bulunan **CD14+** hücreleri ve **T** hücreleri ile birlikte kültüre edildiğinde **Treg oluşumunun** uyarıldığı gösterilmiştir. dNK'ler farklı **TLR**'lerle uyarıldığında farklı miktarlarda sitokin ($IFN\gamma$, IL-6, $TNF\alpha$) üretir: TLR3 veya TLR9 ile en yüksek miktar; TLR2, TLR3 ve TLR9 ile $TNF\alpha$ lehine üretim gözlenmiş.
- Ayrıca dNK h.leri **IL-8**, **CCL5**, **CCL3** ve **CCL4** gibi hem **granülositleri** hem de **T hücrelerini** çekebilen kemokinler üretir.



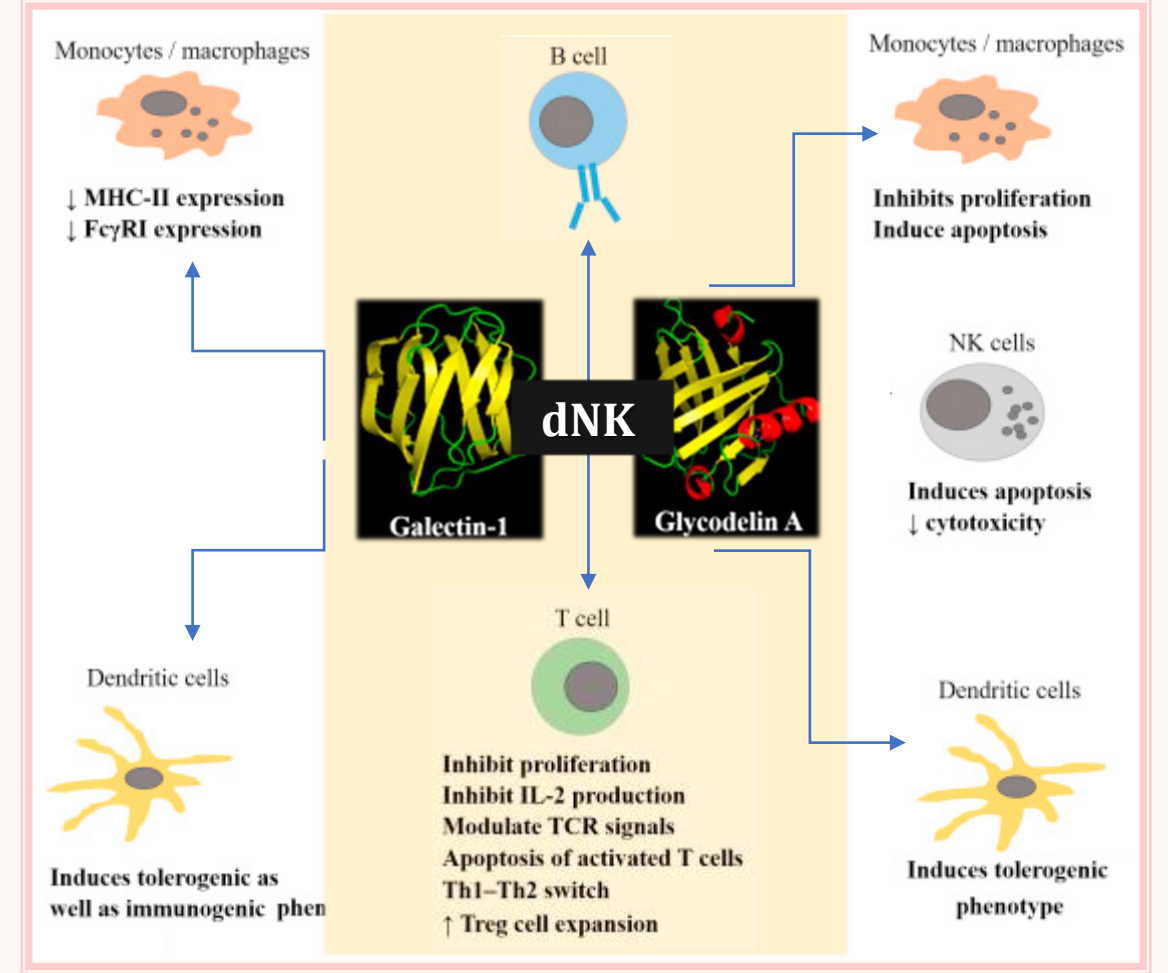
dNK hücreleri

❖ dNK hücreleri, **galektin-1** ve **glikodelin-A** gibi immünomodülatör molekülleri ifade eder. Bu moleküller **T hücrelerinin** işlevlerini değiştirir (toleran fenotip).

❖ **Galektin-1**, desidua'da **T hücrelerinin** çoğalmasını baskılar ve aktive **T hücrelerinin apoptozunu** destekleyerek **hayatta kalmasını engeller**.

❖ **Glikodelin-A**, T hücre yüzeyindeki **CD45** ile etkileşime girerek **T hücresi aktivasyonunu önler**.

❖ dNK işlevlerinde bozulma **rekürren spontan abortus** ile ilişkili.



Başkent Üniversitesi Deneyimi

The Role of Analysis of NK Cell Subsets in Peripheral Blood and Uterine Lavage Samples in Evaluation of Patients with Recurrent Implantation Failure

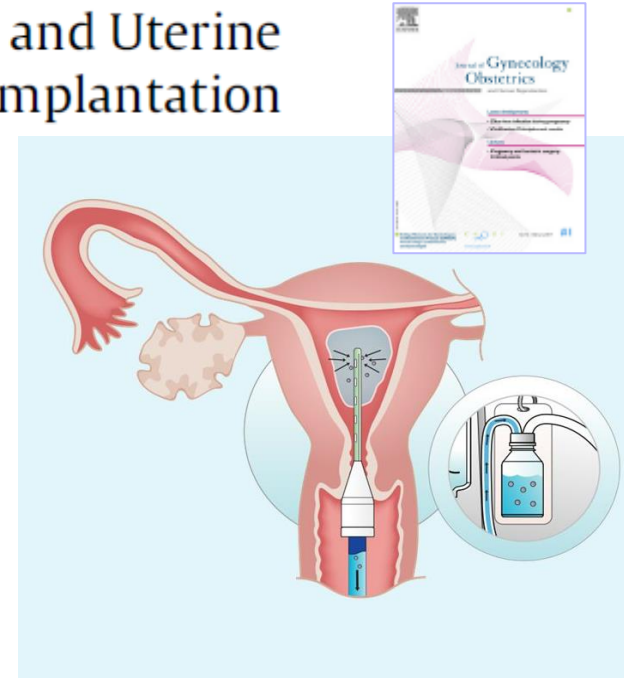
Yusuf Aytac Tohma^a, Ugur Musabak^b, Emre Gunakan^c, Huseyin Akilli^c, Gogsen Onalan^a, Hulusi Bulent Zeyneloglu^{a,*}

Objective: In this study, we aimed to determine the role of analyses of NK cell subsets in peripheral blood and uterine lavage samples in evaluation of patients with unexplained RIF.

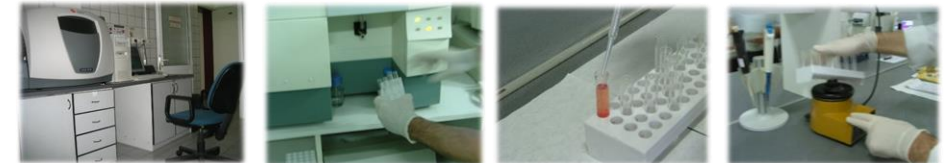
Methods: This retrospective single-institution case-control study included two different cohorts between 2017-2019. **First cohort** included patients examined with **peripheral blood samples** for evaluation of possible immunologic problems in patients with **unexplained recurrent implantation failure**; in the study period, a total of **75 consecutive patients with RIF (study group; n: 42)** or **infertile patients without RIF (control group; n: 33)** were included. **Second cohort** included those patients whose uterine samples were assessed for immunologic problems; **RIF (study group ; n: 16)** or **infertile patients without RIF (control group; n: 25)**.

Results: In the first cohort, the percentage of NK cells (CD3-CD16⁺56⁺) is statistically significantly lower (9.8 vs. 12.6, respectively, p: 0.038) in the study group than those of the controls whereas there was no statistical significance in the absolute number of NK cells (CD3-CD16⁺56⁺). In the second cohort, the only remarkable finding in uterine lavage samples was significantly increased uNKs cells (CD3-CD16^{dim}56^{bright}) percentages in controls (9.95 vs 12.7, respectively, p: 0.026) compared to those of study group.

Conclusion: Our data shows that the **analysis of NK cell subtypes in peripheral blood does not seem appropriate to investigate the patients with RIF and we suggest that uterine lavage samples instead of peripheral blood samples be implemented and evaluated.**



Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction :



Başkent Üniversitesi Deneyimi

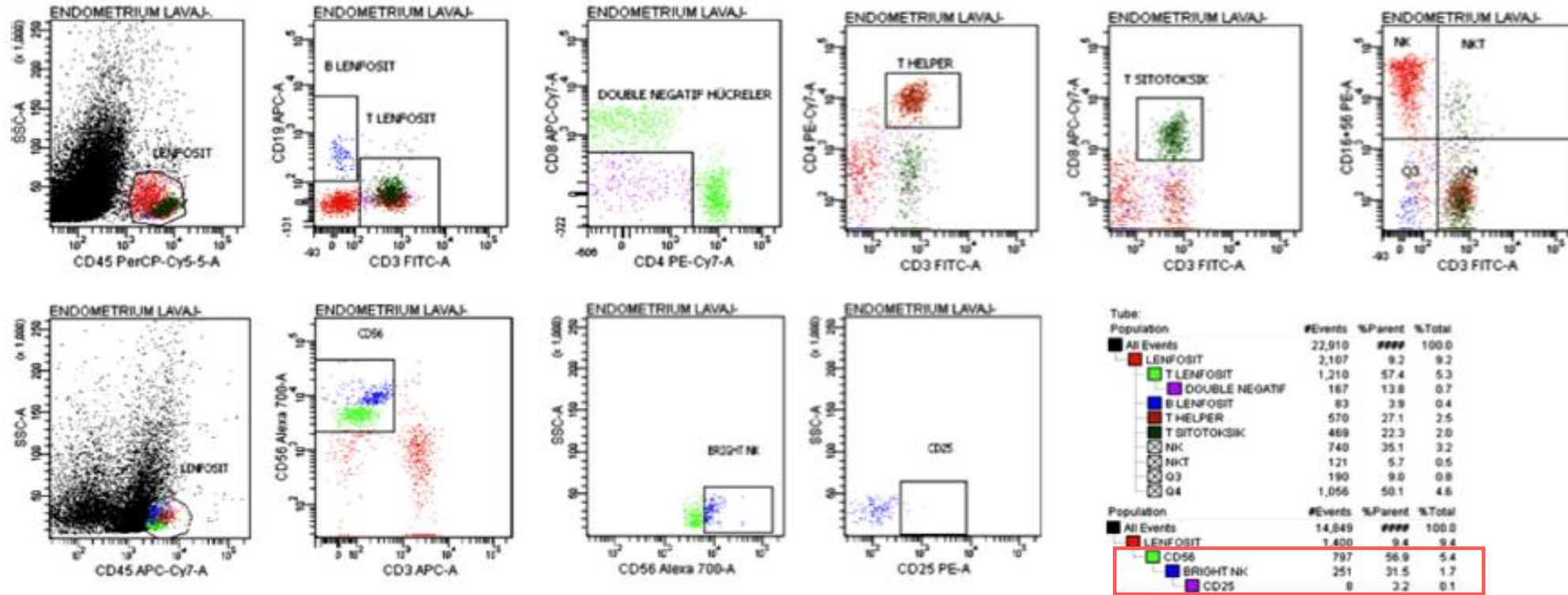


Fig.1. A representative dot-plots from a lavage sample randomly chosen from the infertile patients without RIF (controls). At first, the cell population including lymphocytes and NK cell subsets was gated using CD45-Side Scatter dot plot. After discarding of unwanted cell debris by gating strategy, the analyses were made only on live cell population compatible with lymphocytes (CD45brightSSlow).

Başkent Üniversitesi Deneyimi

Periferal kan NK

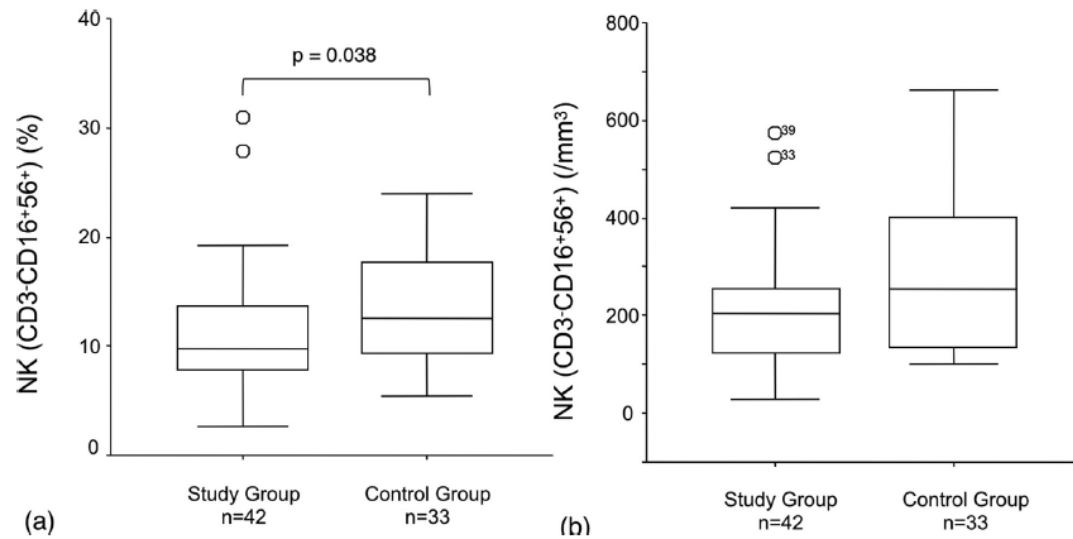


Table 2

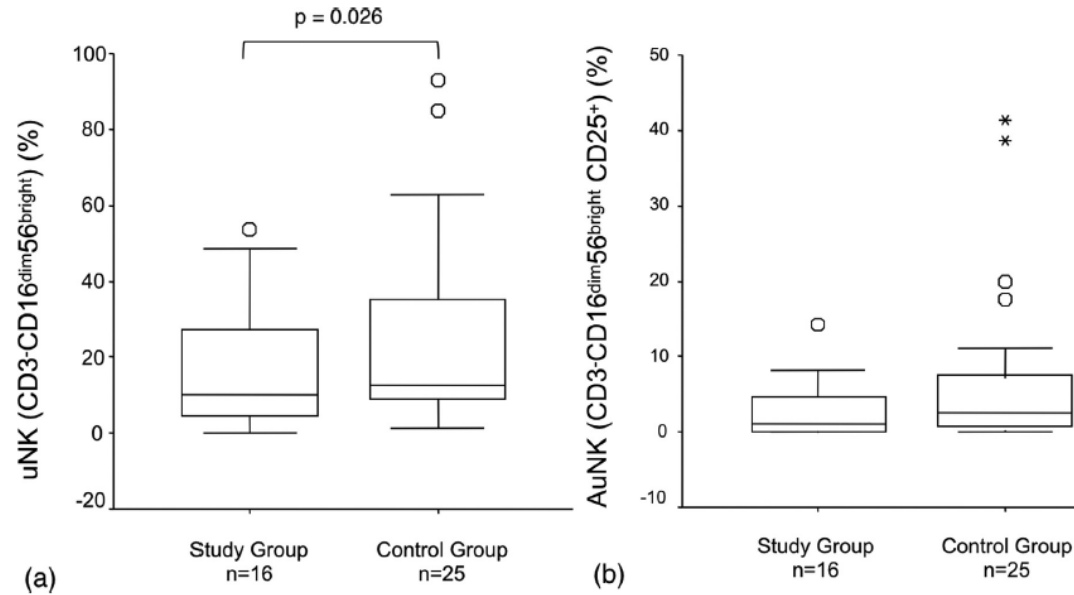
Comparisons of the percentages and absolute counts of peripheral blood natural killer cell subsets in the groups. The values were given as median(range) notation.

Fig. 2. Comparison of data from peripheral blood samples of patients with RIF (recurrent implantation failure) and controls. Boxes show the ranges of 1 st and 3rd quartiles and extreme values, with the thick horizontal bars representing median values. The differences between two groups were evaluated by the Mann-Whitney U-test. P-values are indicated above the boxes when a level of significance <0.05 was reached in comparisons of the study groups.

Natural killer cell subsets	Study Group (n = 42)	Control Group (n = 33)	p-value
Percentages (%)			
CD3 ⁺	76.4 (8.4-87.1)	74.8 (62.7-85.0)	0.436
CD4 ⁺	44.8 (33.0-57.3)	44.8 (28.0-63.2)	0.430
CD8 ⁺	24.9 (13.4-34.5)	26.1 (9.6-37.9)	0.658
CD19 ⁺	11.3 (6.0-24.8)	9.7 (3.3-18.3)	0.090
NK (CD3-CD16 ⁺ 56 ⁺)	9.8 (2.7-30.9)	12.6 (5.4-24.0)	0.038
NKT (CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺)	1.3 (0.2-5.5)	1.5 (0.1-8.1)	0.970
uNK (CD3-CD16 ^{dim} 56 ^{bright})	4.7 (0.2-28.5)	3.2 (0.2-17.0)	0.962
AuNK (CD3-CD16 ^{dim} 56 ^{bright} CD25 ⁺)	6.1 (1.2-25.2)	5.7 (1.1-21.3)	0.433
DNT	1.2 (0.3-3.7)	1.1 (0.4-3.6)	0.525
Absolute counts (/mm³)			
CD3 ⁺	1273.5 (697.0-3316.0)	1341.0 (859.0-2168.0)	0.806
CD4 ⁺	818.5 (390.0-1982.0)	830.0 (441.0-1485.0)	0.866
CD8 ⁺	419.5 (175.0-1169.0)	467.5 (131.0-725.0)	0.582
CD19 ⁺	205.0 (93.8-712.0)	179.5 (72.0-419.0)	0.210
NK (CD3-CD16 ⁺ 56 ⁺)	205.0 (28.0-575.0)	253.0 (101.0-662.0)	0.063
NKT (CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺)	24.1 (2.5-201.0)	24.0 (1.1-178.0)	0.933
uNK (CD3-CD16 ^{dim} 56 ^{bright})	9.2 (2.4-27.0)	9.0 (3.6-22.4)	0.611
AuNK (CD3-CD16 ^{dim} 56 ^{bright} CD25 ⁺)	0.5 (0.06-3.2)	0.5 (0.07-2.4)	0.690

Başkent Üniversitesi Deneyimi

Uterin lavaj NK



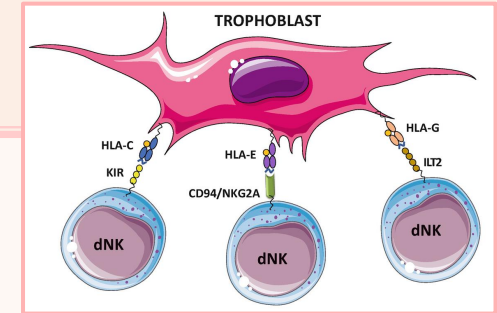
	Study Group (n = 16)	Control Group (n = 25)	p-value
Percentages (%)			
CD3 ⁺	74.8 (38.6-97.4)	81.9 (51.9-95.4)	0.139
CD4 ⁺	28.9 (17.6-53.8)	31.9 (16.5-61.5)	0.552
CD8 ⁺	27.3 (12.4-68.2)	35.5 (15.4-61.5)	0.063
CD19 ⁺	0.600 (.0-4.5)	0.5 (.0-3.6)	0.947
NK (CD3-CD16 ⁺ 56 ⁺)	18.9 (2.6-60.0)	19.7 (3.5-40.6)	0.570
NKT (CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺)	4.15(.0-28.6)	7.7 (0.3-27.9)	0.237
uNK (CD3-CD16 ^{dim} 56 ^{bright})	9.95 (.0-57.0)	12.7 (1.4-93.1)	0.026
AuNK (CD3-CD16 ^{dim} 56 ^{bright} CD25 ⁺)	1.05 (.0-14.3)	2.6 (.0-42.6)	0.295
DNT	0.55 (.0-2.7)	0.9 (0.1-9.0)	0.419

Table 3

Comparisons of the percentages of **intrauterine lavage fluid natural killer cell subsets** in the groups. The values were given as median(range) notation.

Fig. 3. Comparison of data from uterine lavage fluids of patients with RIF (recurrent implantation failure) and controls. Boxes show the ranges of 1 st and 3rd quartiles and extreme values, with the thick horizontal bars representing median values. The differences between two groups were evaluated by the Mann-Whitney U-test. P-values are indicated above the boxes when a level of significance <0.05 was reached in comparisons of the study groups. * represent extreme value.

KIR-HLA uyumu!....



- Haplotype A: 3DL3, 2DL3, 2DP1, 2DL1, 3DP1, 2DL4, 3DL1, 2DS4, 3DL2.
- Haplotype B: absence of all haplotype A genes

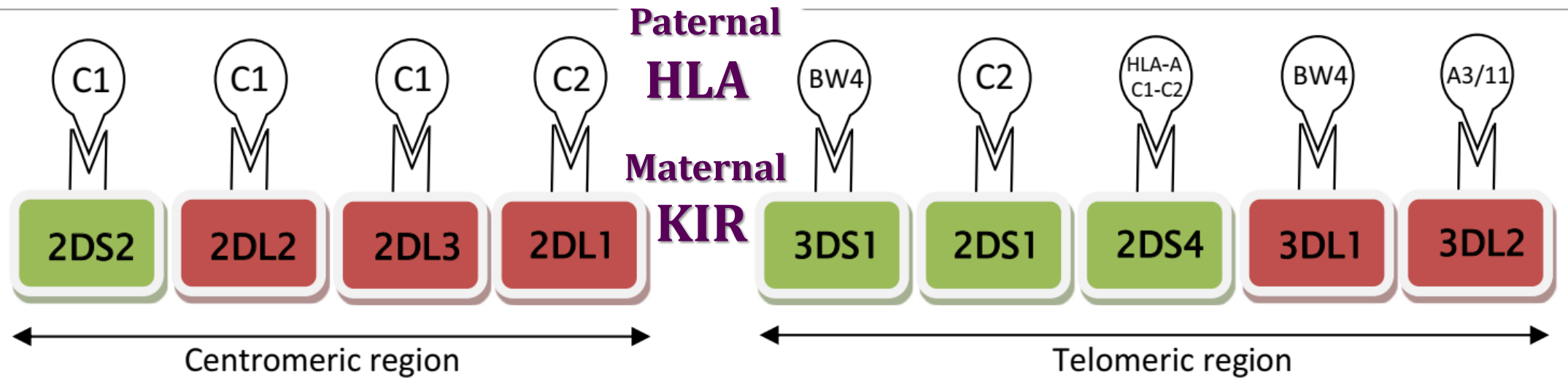


FIGURE 1 | Schematic diagram of activating (green) and inhibitory (red) receptors on natural killer cells, arranged according to centromeric/telomeric location. These receptors are known to interact specifically with HLA ligands (HLA C1 or C2, HLA A and B BW4). HLA-C group 1 (C1) allotypes serve as ligands for KIRs 2DS2, 2DL2, and 2DL3; HLA-C group 2 (C2) functions as ligands for KIRs 2DL1 and 2DS1.

KIR-HLA uyumu!...

Maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and paternal human leukocyte antigen ligands in recurrent pregnancy loss cases in Turkey

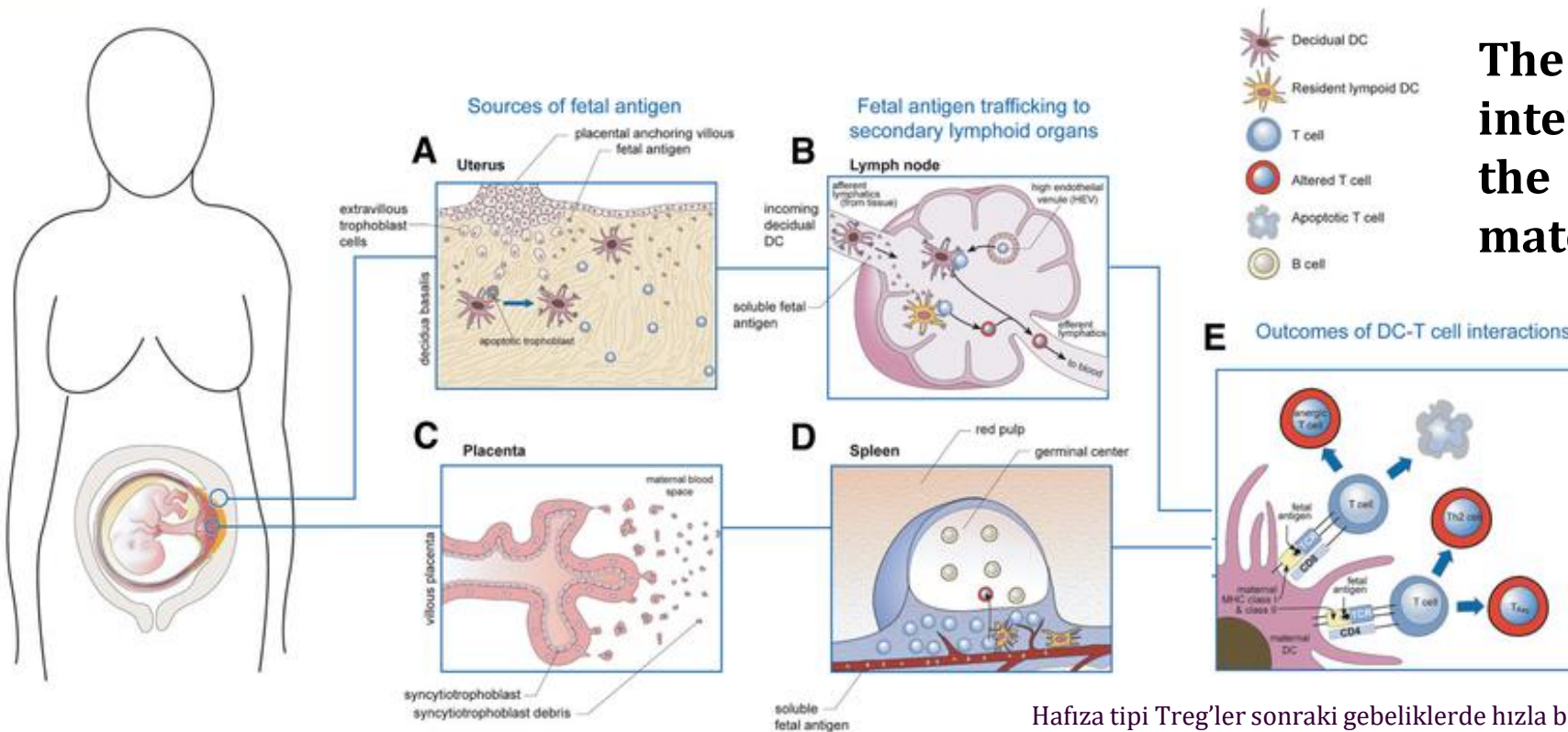
Mehmet Onur Elbaşı^{1,*}, Aysin Tulunay², Hale Karagözoğlu³, Semra Kahraman⁴, Emel Ekşioğlu-Demiralp^{1,*}

Methods: Compatibility between partners for human leukocyte antigen (HLA) genotypes and the relationships between maternal killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) and paternal HLA-Bw4/Bw6 and HLA-C1/C2 supra-groups were investigated in 25 couples with RPL in comparison to healthy couples with children. HLA and KIR genotyping was performed using polymerase chain reaction with sequence-specific primers and/or sequence-specific oligonucleotides.

Maternal **KIR** ve paternal **HLA** arasında **inhibitör** etkileşim

Results: HLA class I incompatibility between partners, especially in HLA-B alleles, was more common in the RPL group ($p=0.01$). HLA-C2 homozygosity was more frequent in the male partners of RPL couples than in other groups ($p=0.03$). The **KIR2DL5** gene frequency was significantly higher in both the female and male partners of RPL couples, whereas the **KIR2DS3** gene frequency in male partners of RPL couples was significantly reduced ($p=0.03$). The presence of **KIR2DL3** in women with RPL was correlated with the presence of **HLA-C2** alleles in their spouses ($p=0.03$).

Fetal Ag'lere duyarlılık kazanma!. (DH)



The hidden maternal-fetal interface: Events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance

Int J Dev Biol. 2010 ; 54(2-3): 421–430.

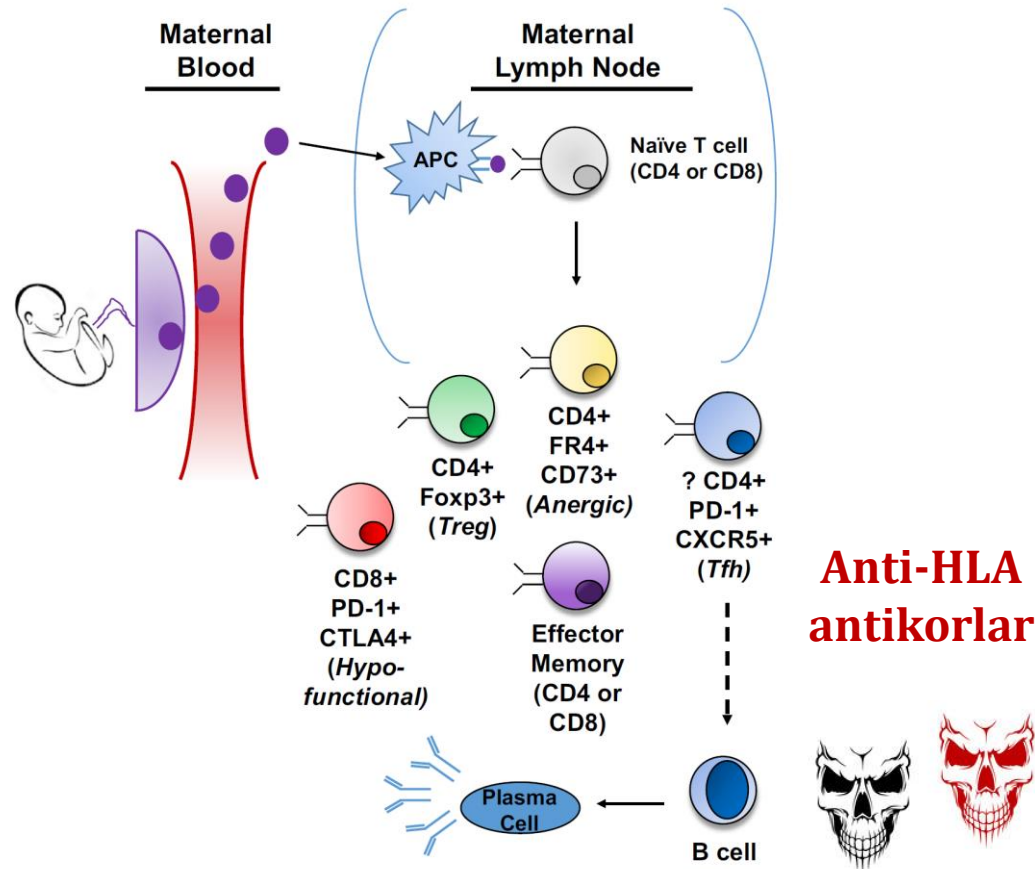
SLO'da **antijen sunum şekline** uygun olarak (retinoik asit, TGF β ,IDO eşliğinde sunum) **CD4+ T** hücrelerinden **iTreg**'ler gelişir: fetal antijenlere **rektif olan** hücreler **apoptoza** uğrar.

Gerek **santral** gerekse **perifer**al kökenli Tregler feto-maternal ara yüzde apoptozdan kaçan ve kan yoluyla implantasyon bölgesine ulaşan **efektör T** hücrelerini **baskılar**, düşükleri **önler**.

Hafıza tipi Treg'ler sonraki gebeliklerde hızla birikir ve düzenleyici işlevlerine devam ederler.

Fig. 1. Role of **maternal dendritic cells** in the **induction** of fetal tolerance. **Fetal antigens** released from **trophoblast** cells as a consequence of **apoptotic** cell death (A) or by **shedding** of **syncytiotrophoblast** debris (C) traffic into the **mother**, where they may be taken up and displayed by **maternal dendritic cells** (DC) within the **uterus**, **spleen** or **lymph node** (A,B,D). Apoptotic debris or cells program the **dendritic cells** to take on a **tolerogenic** phenotype. Peripheral T cell tolerance would subsequently be induced through apoptosis, anergy, or conversion to T R cells (E).

Fetal Ag'lere duyarlılık kazanma!. (DH)



Biologic mechanisms and clinical consequences of pregnancy alloimmunization

Paige M. Porrett

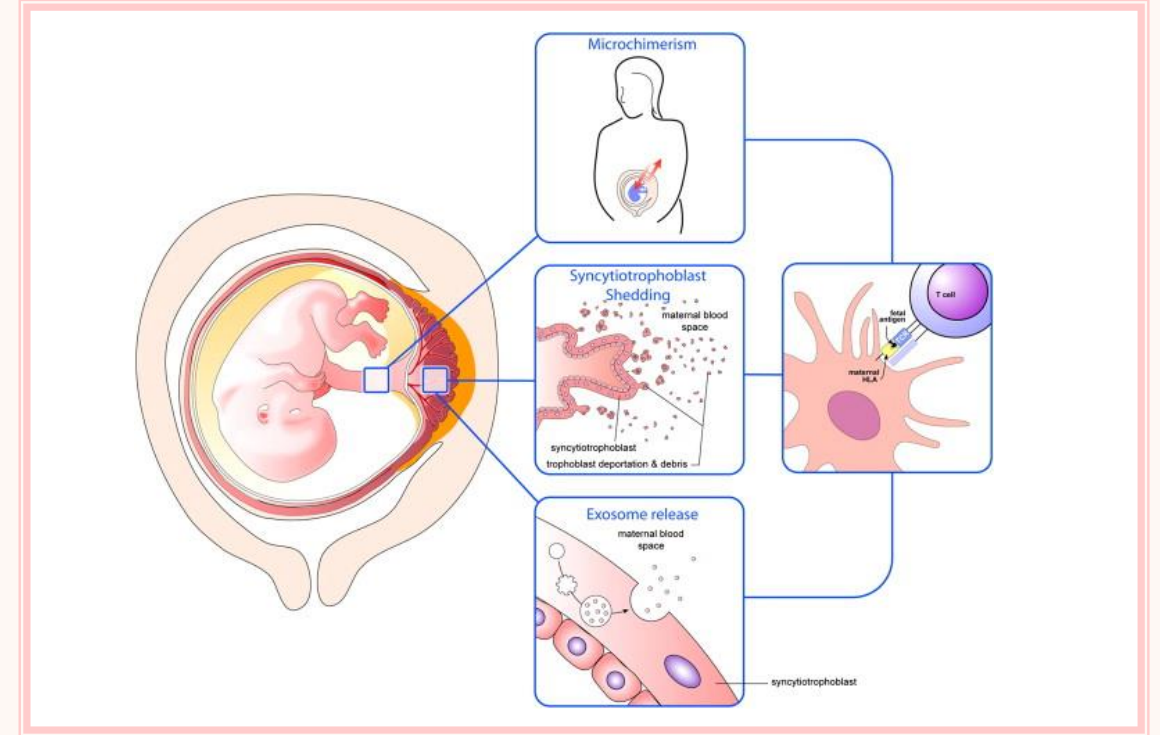
FIGURE 2: Model of maternal T cell **priming** by **fetal** antigens. Fetal cells and cellular components (ie, microvesicles) (purple) cross the placenta into the maternal **bloodstream**, where they circulate to the **secondary** lymphoid organs. Fetal **antigens** are presented by the maternal **APC** and **prime** maternal CD4 and CD8+ T cells. Potential T cell fates induced by fetal antigen are shown, including PD-1+ CTLA4+ **CD8+ T** cells with **attenuated** effector functions (**red**), CD4+Foxp3+ **regulatory T** cells (**green**), CD4+ FR4+ CD73+ **anergic T** cells (**yellow**), and **effector memory** cells (**purple**). While CD4+ PD-1+ CXCR5+ **T follicular helper** cells (Tfhs) (**blue**) have been demonstrated in the placenta, they have yet to be examined in the maternal lymph node.

Fetal Ag'lere duyarlılık kazanma!. (Exo)

✎ **DH'lerin** lenfoid organlara **göç** etme yeteneğinin **azalması fetal kökenli peptitlerin** lenf düğümlerine ulaşma ve APC'ler tarafından alınma olasılığını ortadan **kaldırmaz!...**

✎ Fetal peptitleri taşıyan **eksozomlar**, plasental dokular tarafından kolayca üretilir ve antijen sunumuna katkıda bulunabilir (SLO'da **resident** DH'lerle).

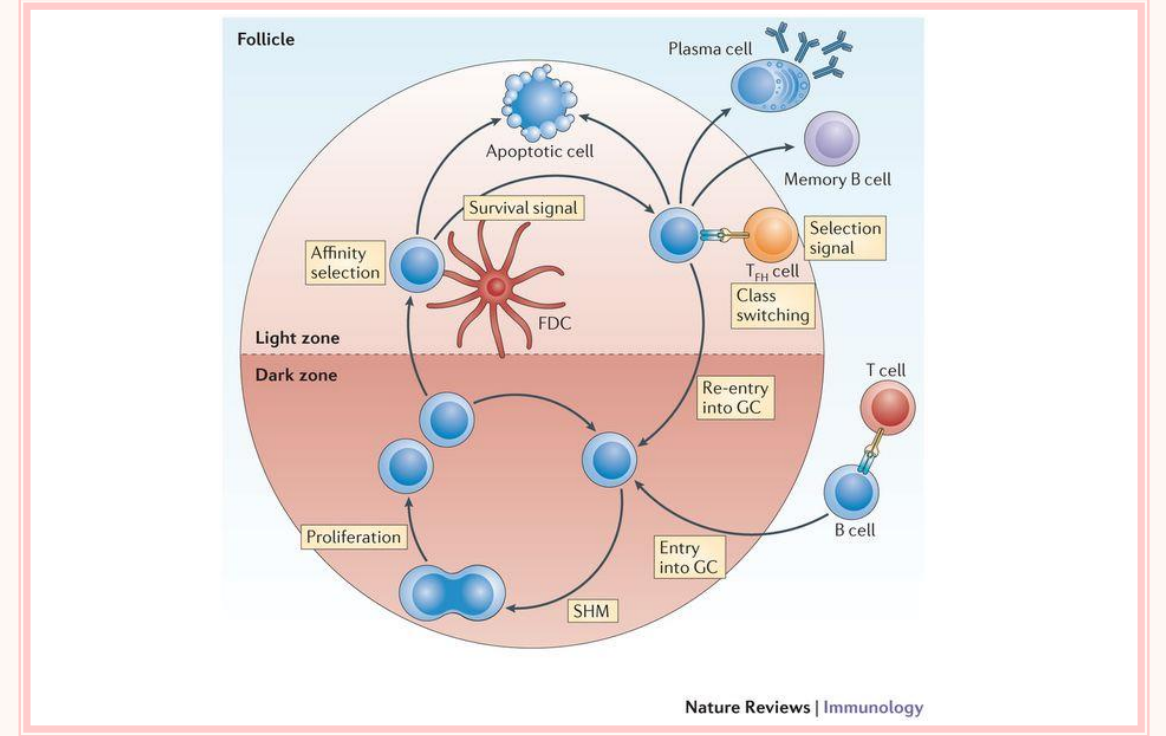
✎ Diğer taraftan $TNF\alpha$ ile uyarılan miyometriyumda CCL5, CXCL9 ve CXCL-11 üretilirken desiduada bu olmaz; böylelikle bu kemokinlerin ligandını taşıyan (CXCR3) Th1 hücreleri miyometriyuma doğru hareketlenir. *



Çalışmalar, desidua'da gen susturmanın efektör T hücrelerinin fetomaternal ara yüze göçünü engellediğini öne sürüyor.

Fetal Ag'lere duyarlılık kazanma!...

- ❖ Hem normal gebelik hem de spontan düşükler, **alloantikor** sentezini uyarır.
- ❖ **Anti-HLA antikorlar**, **26. gebelik** haftasında veya sonrasında ortaya çıkar.
- ❖ **Duyarlı** kadınlar, **duyarlı olmayanlara** kıyasla daha **yüksek parite** (gebelik) oranlarına sahiptir.
- ❖ Kadınların **1/2-3'ü** doğumdan sonra ilk gebeliklerinde HLA'ya karşı duyarlılık geliştirir ve sıklık parite ile artar.
- ❖ Her iki HLA sınıf antijenlere karşı antikor gelişse de **HLA sınıf-I'e** karşı gelişen antikorların **sıklığı**, **HLA sınıf II'ye** göre daha **fazladır**.



Erkek eşten veya çocuklarından böbrek alan kadınlarda **ret oranı** daha yüksektir. İmmünolojik risk faktörü!...

Fetal Ag'lere duyarlılık kazanma!....

Detection of anti-HLA antibodies in maternal blood in the second trimester to identify patients at risk for antibody-mediated maternal anti-fetal rejection and spontaneous preterm delivery

JoonHo Lee, MD¹, Roberto Romero, MD, D(Med)Sci¹, Yi Xu, PhD¹, Jezid Miranda, MD^{1,2},

Am J Reprod Immunol. 2013 August ; 70(2): 162–175.

Methods of Study—This longitudinal case-control study included pregnant women with spontaneous preterm deliveries (n=310) and control patients with normal term pregnancies (n=620), matched for maternal age and gravidity. Maternal plasma samples obtained at 14-16, 16-20, 20-24, and 24-28 weeks of gestation were analyzed for HLA Class I and Class II PRA positivity using flow cytometry.

Results—1) Patients with spontaneous preterm delivery were more likely to exhibit HLA Class I (adjusted OR=2.54, $p<0.0001$) and Class II (adjusted OR=1.98, $p=0.002$) PRA positivity than those delivering at term; 2) HLA Class I PRA positivity for patients with spontaneous preterm delivery between 28-34 weeks (adjusted OR=2.88; $p=0.001$) and after 34 weeks of gestation (adjusted OR=2.53; $p<0.0001$) was higher than for those delivering at term; 3) HLA Class II PRA positivity for patients with spontaneous preterm delivery after 34 weeks of gestation was higher than for those delivering at term (adjusted OR=2.04; $p=0.002$); 4) multiparous women were at higher risk for HLA Class I PRA positivity than nulliparous women (adjusted OR=0.097, $p<0.0001$ for nulliparity); 5) nulliparous women had a higher rate of HLA Class I PRA positivity with advancing gestational age ($p=0.001$); and 6) 78% of women whose fetuses were genotyped had allo-antibodies specific against fetal HLA class I antigens.

Conclusions—Pregnant women with positive HLA class I or class II PRA during the second trimester are at an increased risk for spontaneous preterm delivery due to antibody-mediated maternal anti-fetal rejection.

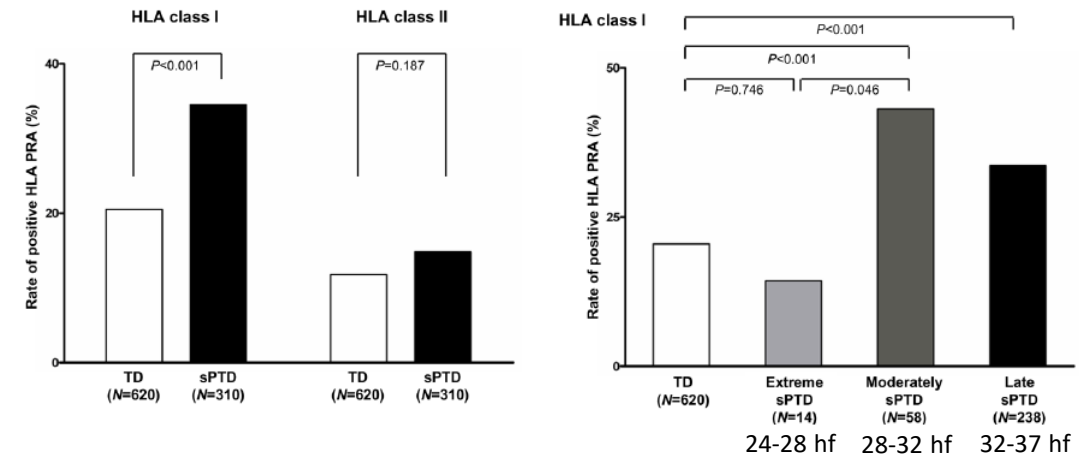
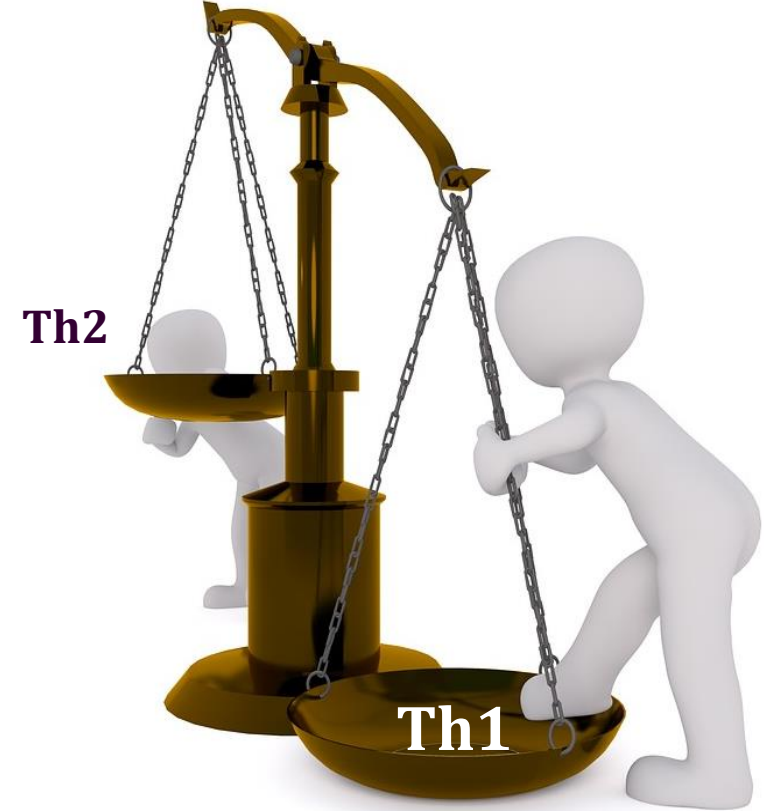


Figure 1. HLA PRA in maternal plasma

(A) HLA class I and class II PRA positive rates in normal term delivery and spontaneous preterm delivery cases, (B) HLA class I PRA positive rate according to gestational age at delivery. HLA, human leukocyte antigen; PRA, panel-reactive antibody; TD, normal term delivery; sPTD, spontaneous preterm delivery; extreme sPTD, delivered before 28 + 0 weeks of gestation; moderate sPTD, delivered between 28 + 0-33 + 6 weeks of gestation; late sPTD, delivered between 34 + 0-36 + 6 weeks of gestation.

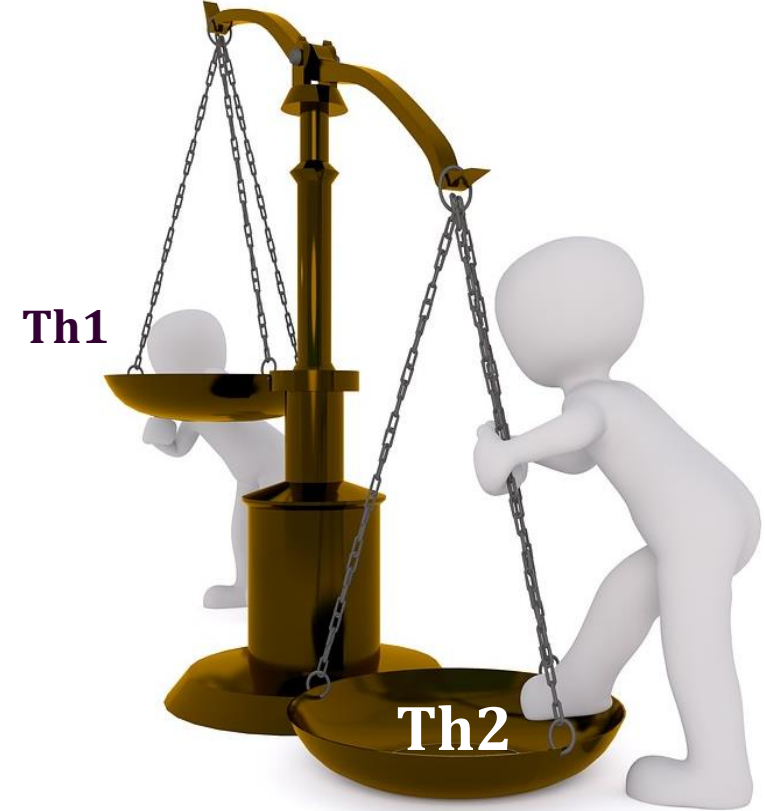
Birinci trimester

- ✎ ilk trimesterde ise **Th1** hücrelerinin (CXCR3+CCR4-CCR6-) **desidua**'da perifer kana (maternal) göre daha yüksek,
- ✎ **Th2** ve **Th17**'nin **daha düşük** oranda olduğu gösterilmiş: Bu hücrelerin **CD8+** hücre **aktivasyonunda** rol oynadığı ileri sürülmüş
- ✎ Desidua'daki **Th1** hücreleri yüksek oranda, **IFN γ** üretirler (ancak bu sitokinin asıl kaynağı **dNK**'leridir.)
- ✎ **Preeklampsili** hastalarda periferik kan **IFN γ** konsantrasyonu yüksek bulunmuş. Buna uygun olarak **Th1** hücrelerinin oranı da yüksek bulunmuştur.



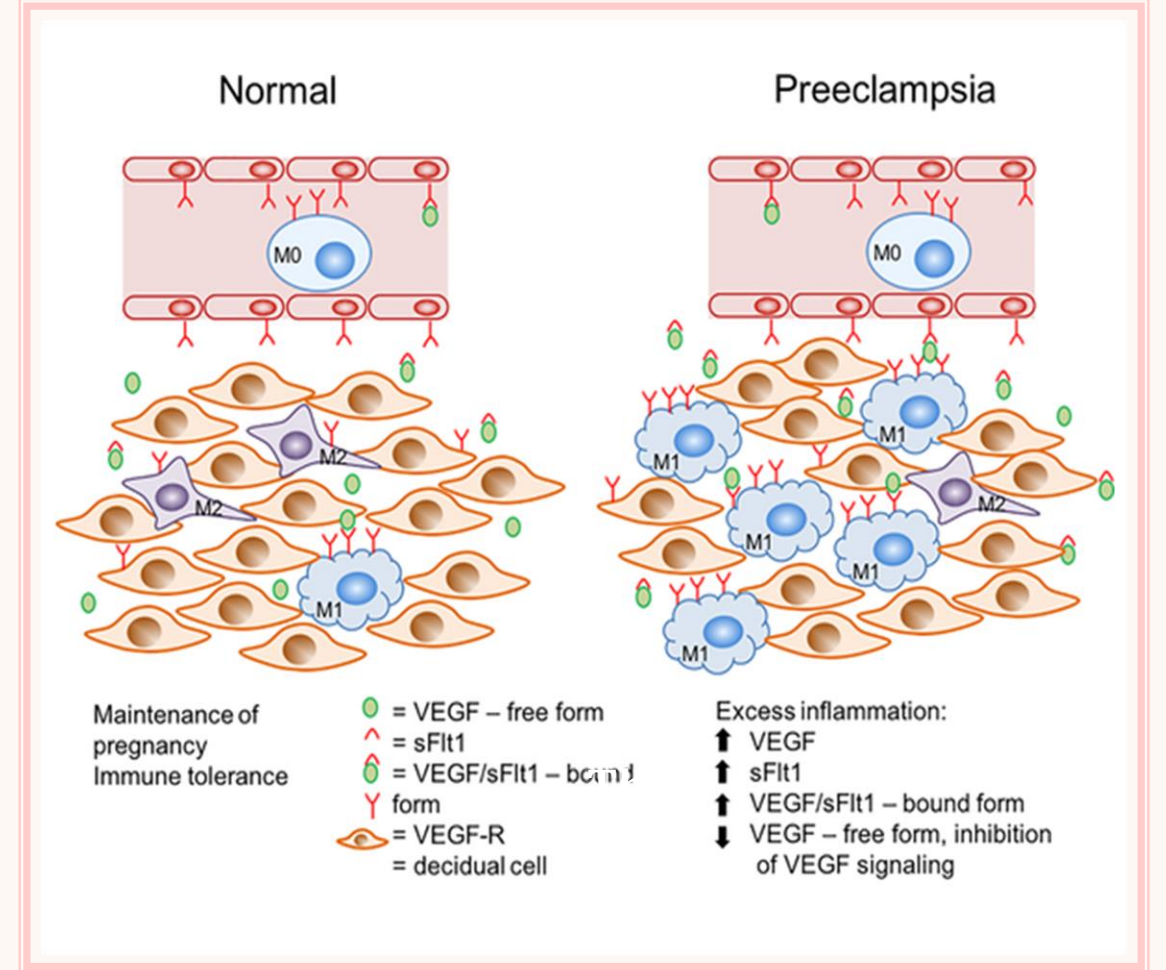
İkinci trimester

- ✎ **Başarılı bir implantasyonun** ardından, **fetal büyüme** ve gelişme hızlanır.
- ✎ Bu aşamada **anne, plasenta** ve **fetus simbiyotiktir**: inflamatuvar ortam yerini **anti-inflamatuvar** ortama bırakır, (**Th2** hakimiyeti).
- ✎ Bu aşamada **proinflamatuvar** sinyallerin devam etmesi ya da **araya** bir bir **enfeksiyon** girmesi **gebeliği tehlikeye** atabilir ve düşüğe yol açabilir.
- ✎ **Anti-inflamatuvar** ortam oluşmasına katkıda bulunan hücreler: **tDC'ler**, **M2 makrofajlar**, **desidual NK hücreleri**, **Treg** ve **Breg hücreleridir**.

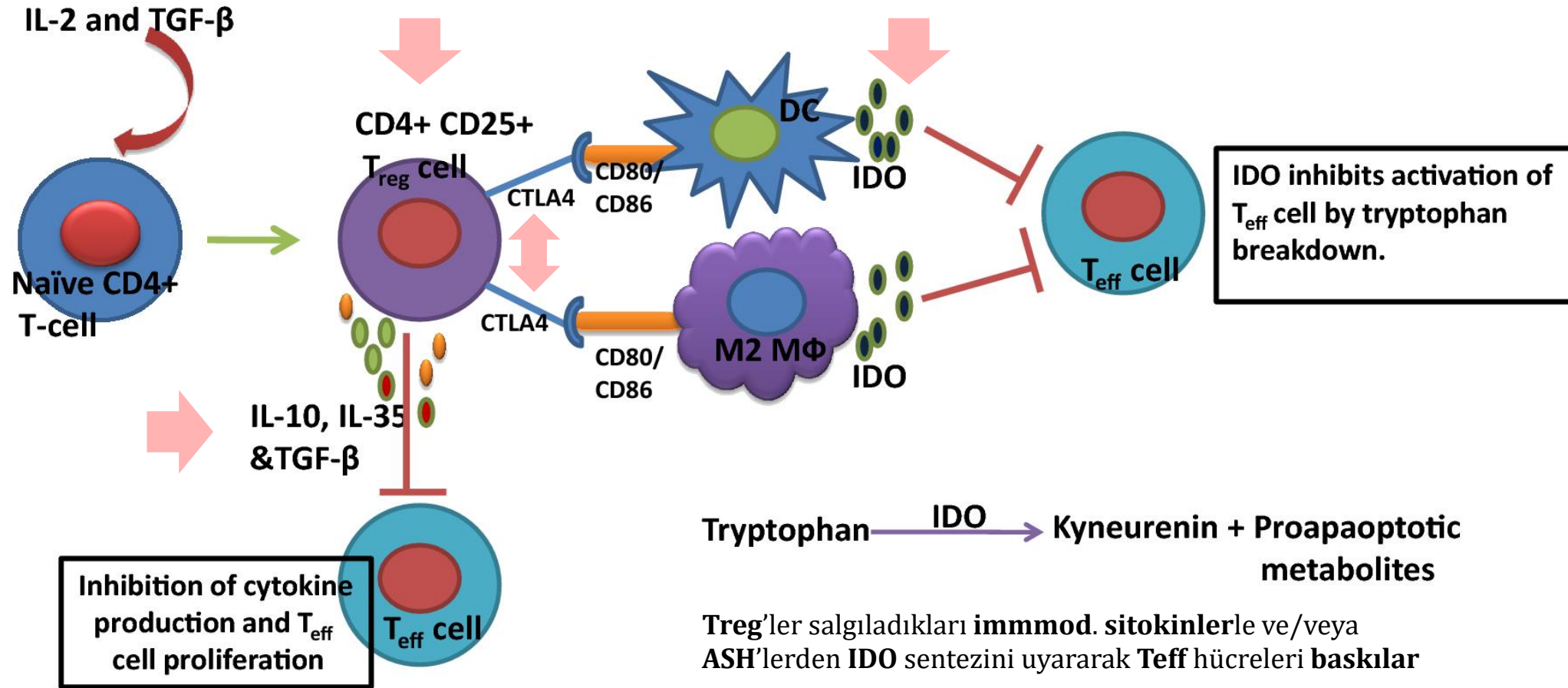


İkinci trimester

- ✎ **M2** fenotipindeki **desidual** makrofajlar, trofoblast invazyonu ve plasenta gelişmesi esnasında **doku yenilenme**sinde rol oynar ve ağırlıklı olarak **anti-inflamatuvar** sitokin salgırlar.
- ✎ **Fagositik** kapasiteleri **yüksek** olan desidual makrofajlar **apoptoza** giden hücreleri ve **hasarlı hücreleri** etkin bir şekilde uzaklaştırır.
- ✎ Böylelikle **baba antijenlerinin** anne bağışıklık sistemi ile **karşılaşması** en aza **indirgenerek** fetusa karşı zararlı bir **immün yanıt** oluşması **engellenir**.
- ✎ [M1 inflamatuvar fenotip]

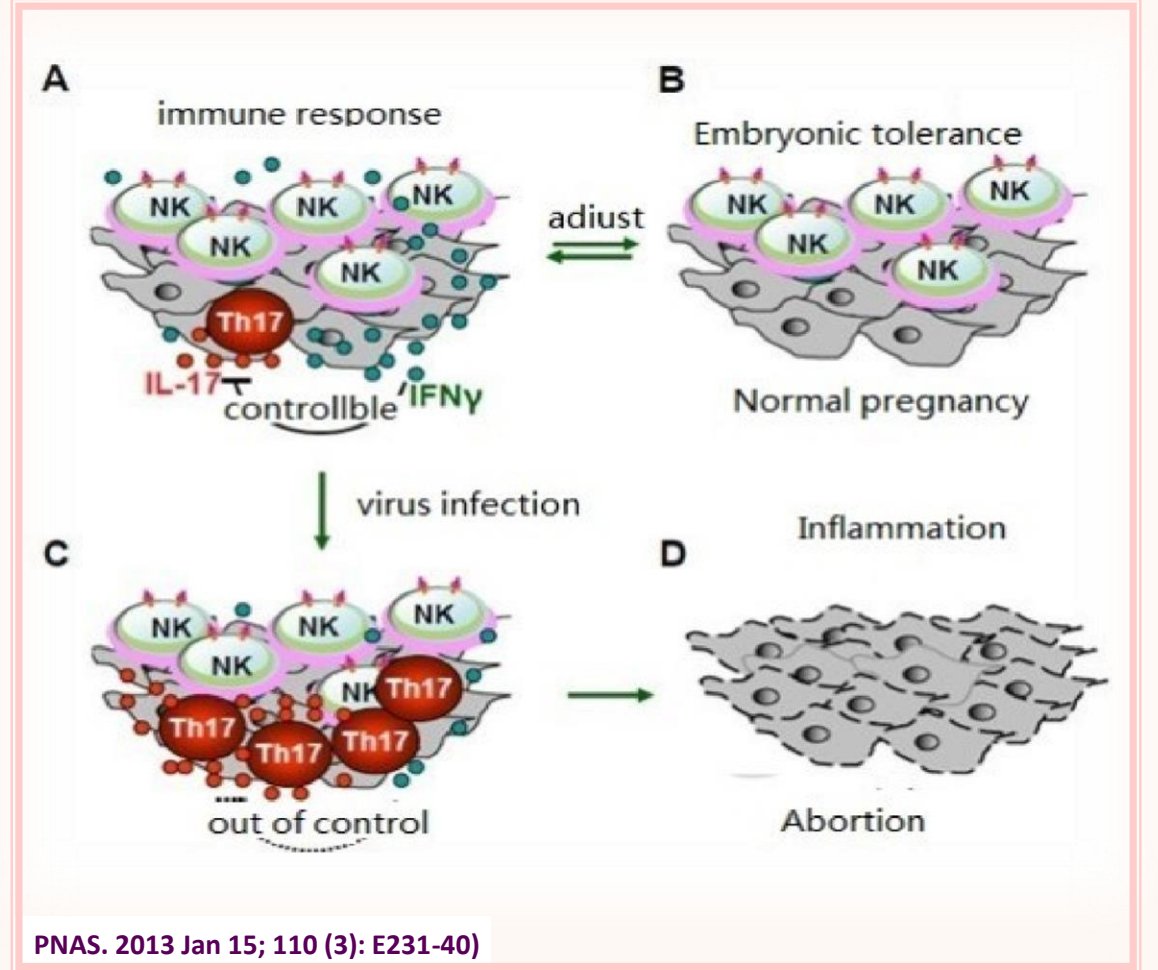


İkinci trimester



İkinci trimester

- Uterusta **Th17** hücre popülasyonu da bulunur ve bu hücreler Treg hücreler kadar olmasa da gebelikte çoğalır.
- Proinflamatuar fenotipe sahip olan **Th17** hücreleri **feto-maternal** ara yüzde **mikrobiyal** enfeksiyonlara karşı **savunma** görevi yaparken, **Treg'ler** bu hücrelerin işlevlerini **düzenler**.
- Uterusta ya da dolaşımında bulunan **Th17** hücre sayılarında ya da **Th17/Treg** oranında tespit edilen değişikliklerin spontan **düşüklerde**, **preeklampside** ve **erken doğumda** etkili olduğu gösterilmiştir.



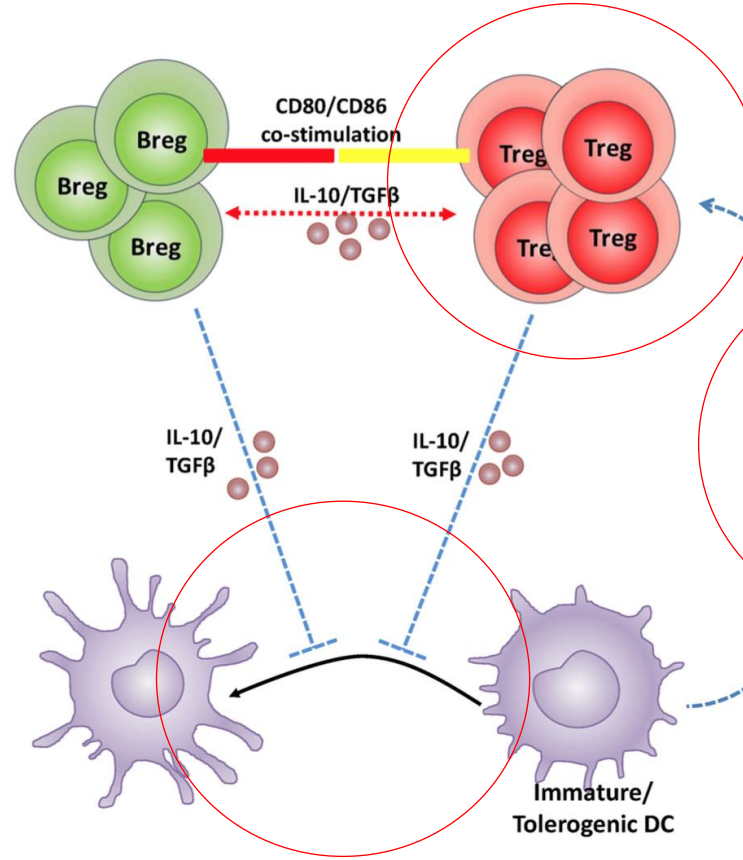
İkinci trimester

B-regs

Induction and expansion of Tregs:
CD80/CD86 costimulation
IL-10 and TGF β production

Inhibition of DC maturation

Düzenleyici B (Bregs) hücreleri
şu anda fetomaternal arayüzde
araştırmanın odak noktasıdır



IL-10 ve TGF β üreten Breg'ler, FM ara yüzde yüksek seviyelerde tespit edilebilir. **Bunun** fetal rejeksiyona neden olan **proinflamatuvar yanıtı dengelediği** düşünülür.

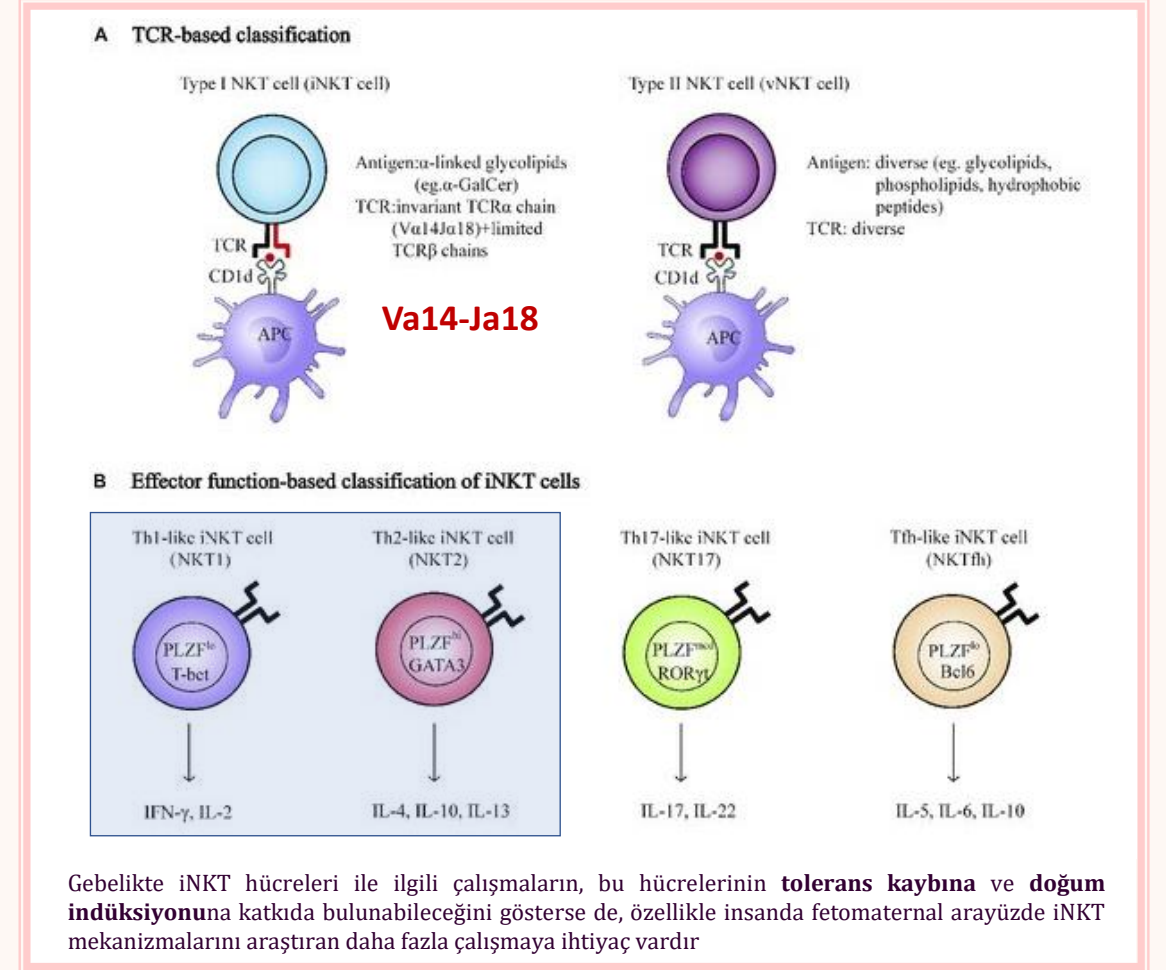
Expansion of the Treg population via IL-10

İkinci trimester

- ✎ **$\gamma\delta$ T Hücreleri:** Gebelik ve fetomaternal toleransda rolü ile ilgili olarak **yeterince** tartışılmayan bir hücre popülasyonu
- ✎ Bu hücreler, yetişkin **periferik** kanında dolaşan **T hücrelerinin %5-10'unu** oluşturur (**V δ 2 hakim**) ve innate ve adaptif bağışıklık arasında bir köprü oluşturur.
- ✎ Bu hücrelerin **desidua'da oranı benzer**dir, ancak fenotipleri bakımından desidua **parietalis** ve **bazalis** arasında büyük ölçüde farklılık vardır. İlkinde, % **50'den** fazlası **V δ 1'i** eksprese ederken, ikincisi daha çok periferik kanı andırır ve % **90'dan** fazlası **V δ 2** eksprese eder.
- ✎ Sağlıklı hamile kadınlarla gebeliği erken sonlandırma riski taşıyan kadınları karşılaştıran periferik kan çalışmaları, **V δ 2/V δ 1** oranındaki artışın **Th1/Th2** dengesinde değişme ve **gebeliği erken sonlandırma riski** ile ilişkili körele olduğunu göstermiştir.
- ✎ Göbek **kordonu** kanında, **$\gamma\delta$ T** hücreleri **periferik** kandan **daha düşük** olup, lenfositlerin % 1'inden azını temsil eder.
- ✎ Ayrıca, göbek **kordonu** kanındaki **$\gamma\delta$ T** hücreleri **daha naiftir** ve V δ 2'nin bol olduğu periferik kanın tersine **V δ 1** alt tipi daha baskındır..

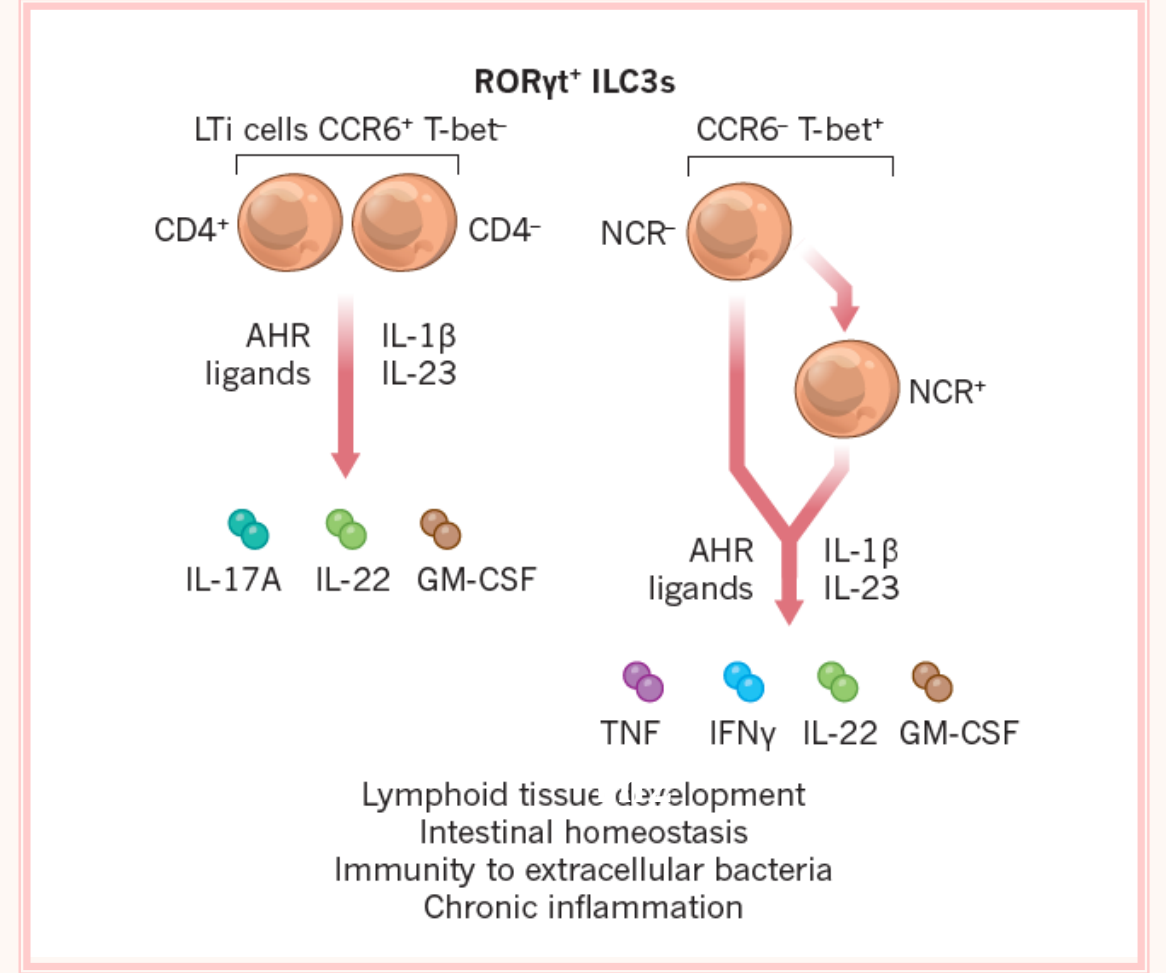
İkinci trimester

- ✎ **iNKT Hücreleri:** nonklasik MHC kompleksi **CD1d** tarafından **sunulan glikolipidlerle** etkileşerek aktive olur.
- ✎ Bu hücreler **güçlü efektör** hücrelerdir ve Th1L: **IFN γ** , **G-CSF**, **TNF α** , Th2L: **IL-4**, **IL-13**, ve **IL-10** gibi sitokinler üretebilirler. Ayrıca, Fas/FasL yolu yoluyla **sitotoksik kabiliyete** sahiptirler.
- ✎ İn-vitro anti-CD3 ile uyarılan desidual iNKT hücreleri, IL-4'ten ziyade IFN γ ve G-CSF üretir. Bu nedenle, fetomaternal ara yüzde iNKT'ler tarafından yapılan immünomodülasyonun, IFN γ ile ilişkili olduğu tahmin edilir.



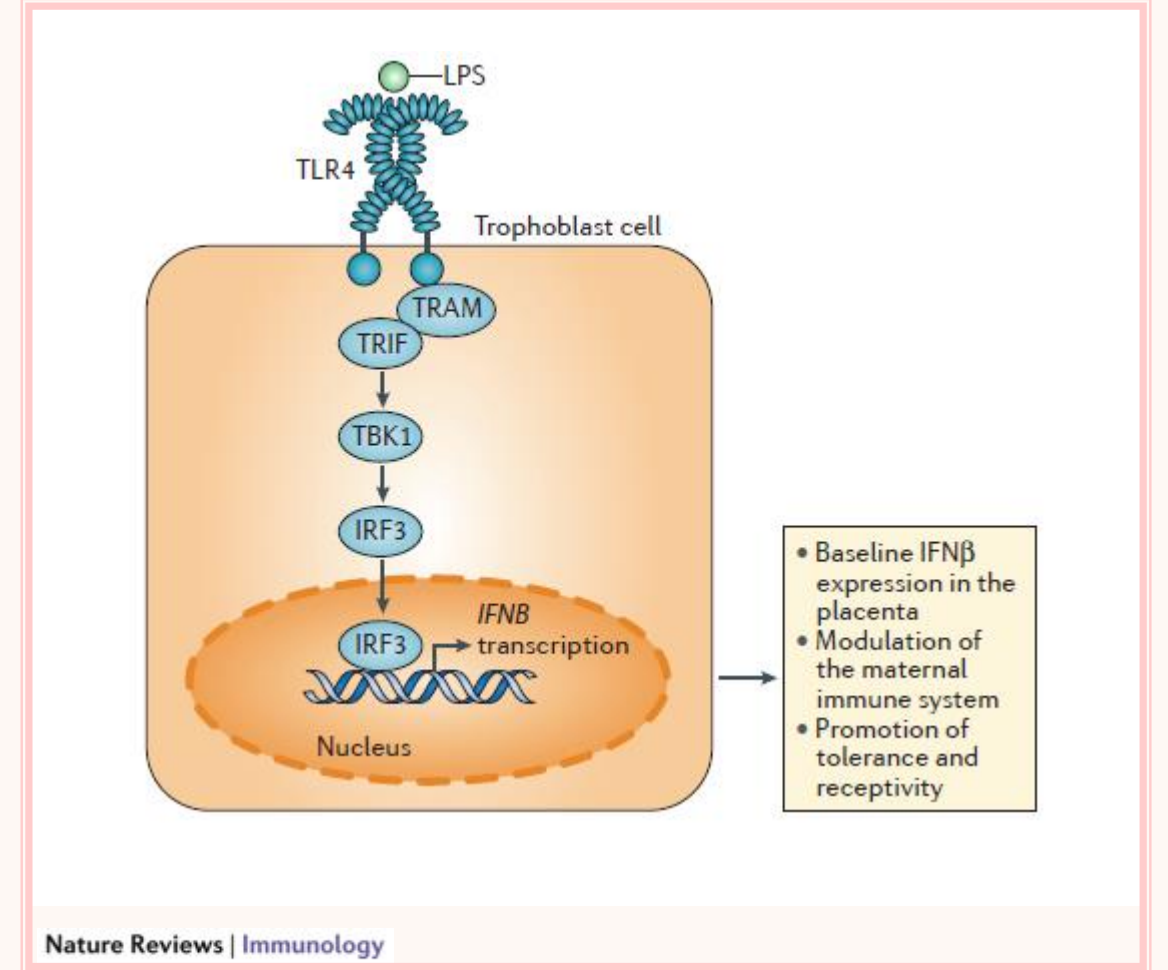
İkinci trimester

- ✎ **ILC'ler:** 3 tip ILC var. Desiduada **ILC1** ve **ILC3** grupları var: bunlar fenotipik ve fonksiyonel heterojenliğe sahiptir.
- ✎ İnsanda **ilk trimesterde** desiduada **2 tip ILC3** bulunduğu gösterilmiş, bunlardan birinin **IL-22** ve **IL-8** ürettiği, diğerinin ise **TNF α** ve **IL-17A** ürettiği gösterilmiştir. Ayrıca desiduada **IFN γ** üreten **ILC1** hücreleri de vardır.
- ✎ Dolayısıyla, **ILC3'ün** ilk trimesterde **nötrofillerin** desiduaya **toplanmasına** katkıda bulunduğu ve **mikrobiyal savunmada** rolleri olduğu ileri sürülmüş, ancak fetomaternal **toleranstaki** rolleri henüz açıklanamamıştır.



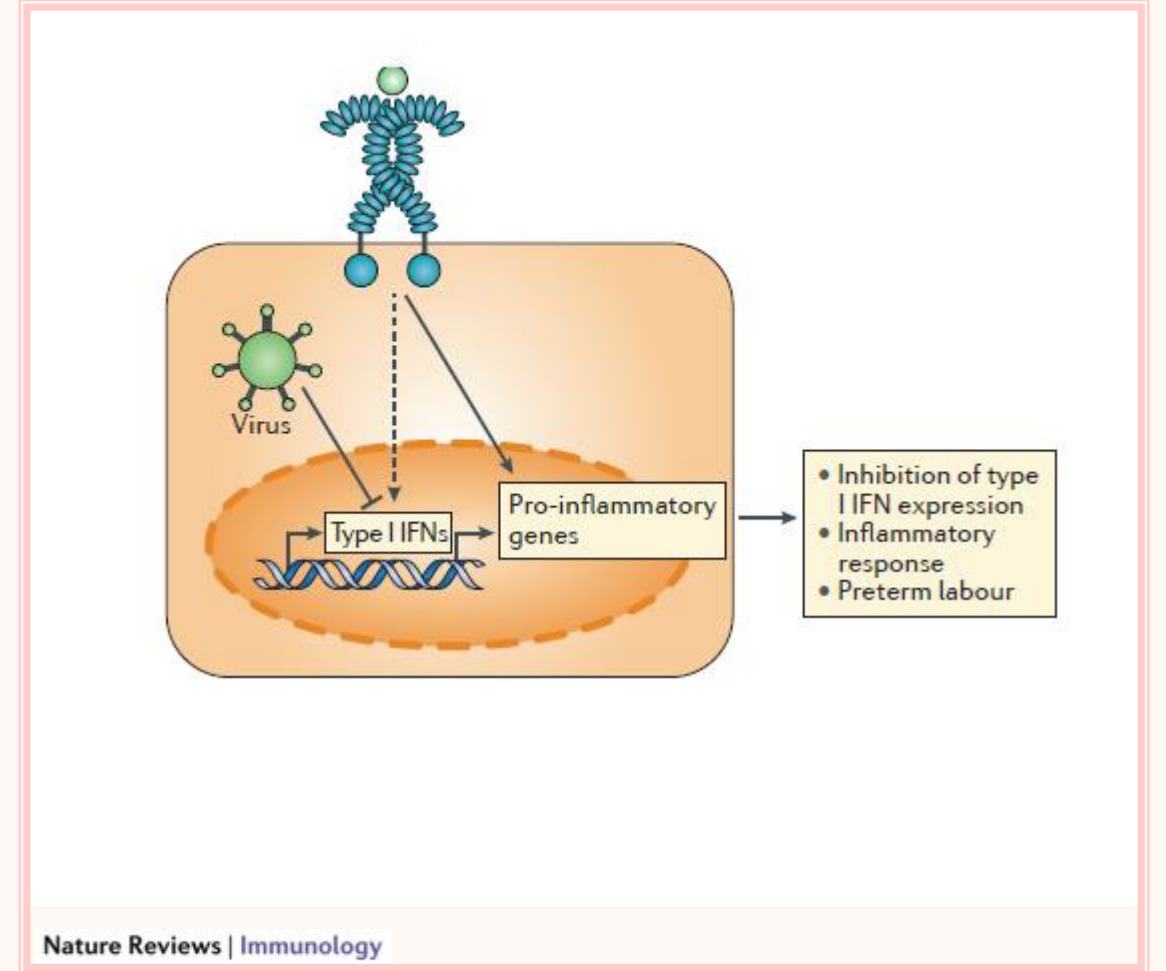
İkinci trimester

- Maternal **mikrobiyota** gebeliğin ikinci üç ayında tolerojenik, **anti-inflamatuvar ortam** gelişmesine **katkıda** bulunur.
- **Trofoblast** hücreleri **kommensal bakteri** ürünlerini **algılayan** ve bunlara bağlanabilen **TLR** ve **NLR**'leri ifade eder.
- **Trofoblast** hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen **TLR4** lipopolisakkarit (**LPS**) ile uyarıldığında NF- κ B aracılı inflamatuvar yanıt yerine **tip-I IFN** (IFN α , - β) üretimini tetikleyen yolak **aktif** olur.
- **Tip-I IFN**'ler aktif **T h.lerinde apopto- zu** tetikler; IL-10, PDL1, IDO gibi immü- nosupresif mol.lerin üretimini artırır.



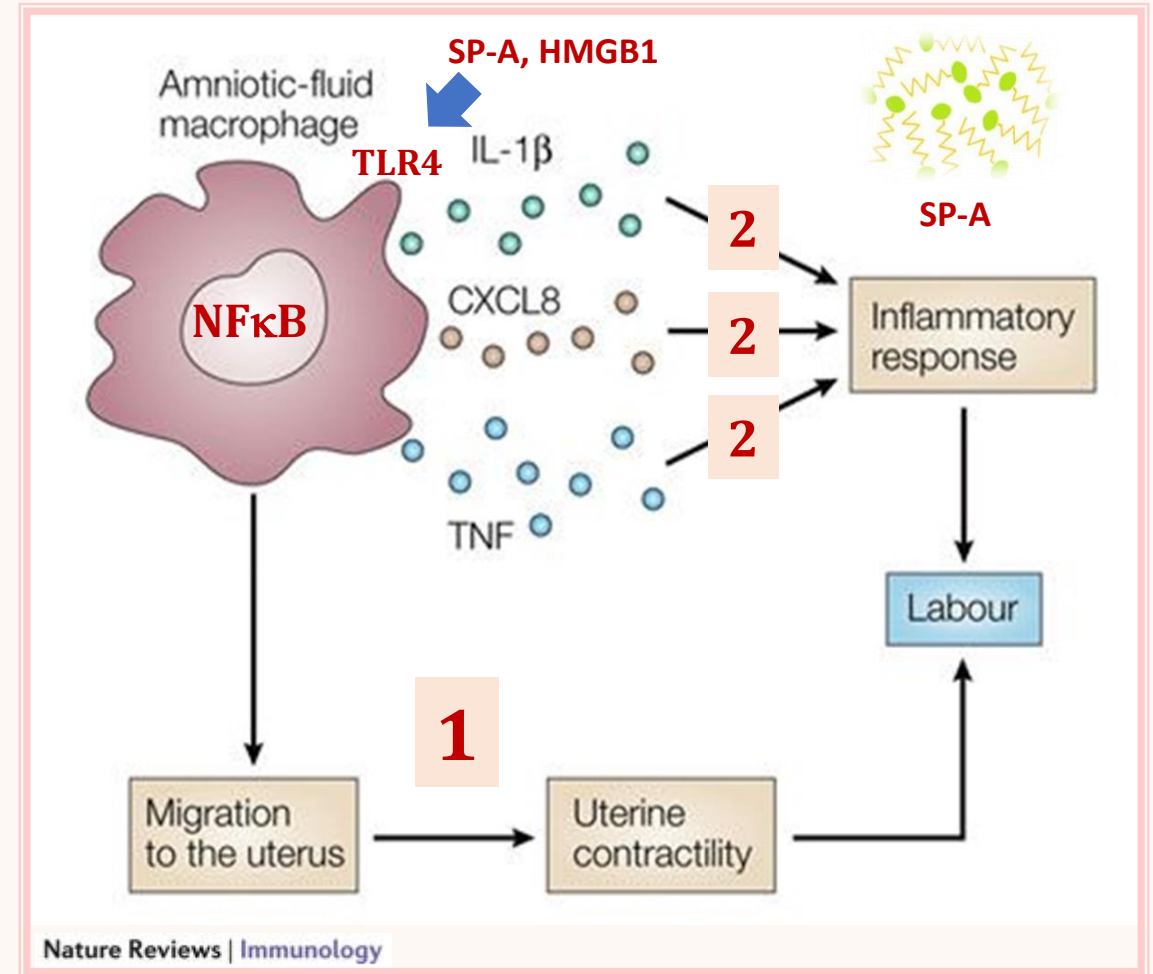
İkinci trimester

- **Tip-I IFN'lerin** antiviral ve anti-inflam. etkileri fetüsü rejeksiyondan **korur**.
- Bazı **viral enfeksiyonlar (influenza A)** kommensal **mikrobiyotanın** sağladığı **IFN β** üretimini ve bunun **immünomodülatör** etkilerini **ortadan** kaldırır.
- Bu durumda trofoblast hücrelerinin kommensal bakterilere verdiği yanıt, tolerans durumundan **erken doğumu** teşvik eden **sitokin** fırtınasına dönebilir.
- **Bakteriyel** enfeksiyonlar, tüm erken doğum vakalarının **%40'**ından, 30 ay öncesi erken doğumların **%80'**inden sorumludur!...



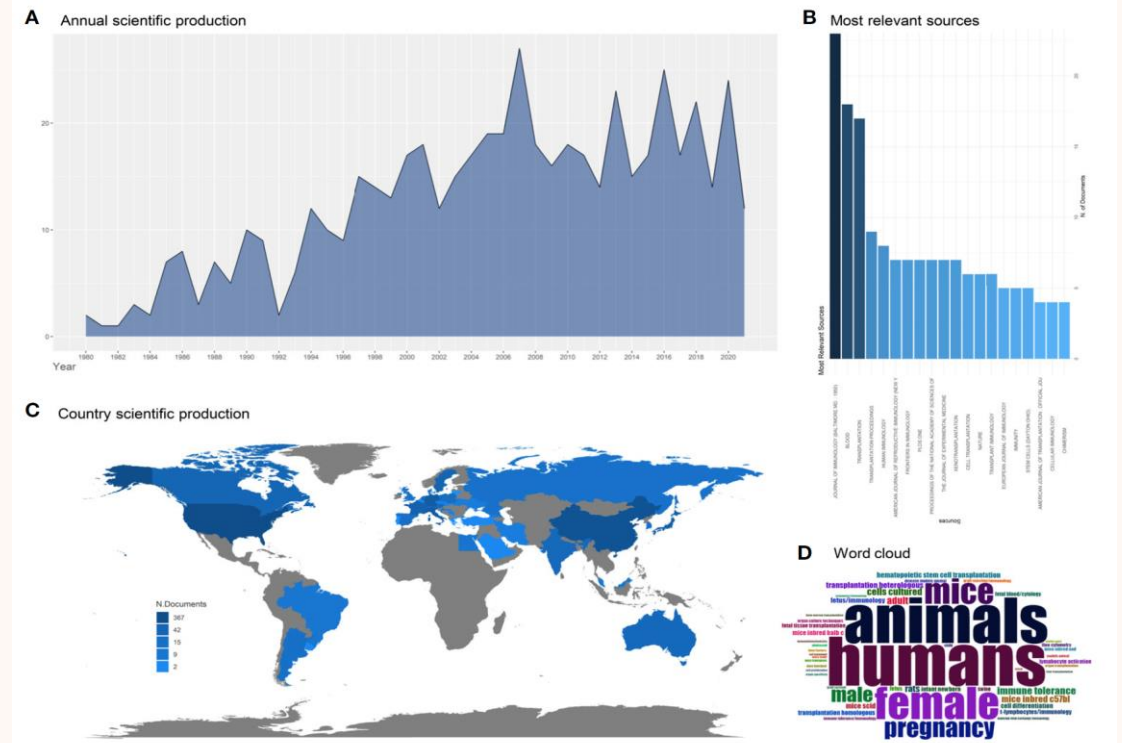
Üçüncü trimester

- ✎ **Fetus gelişimini** tamamlandıktan he-
men sonra doğum için **proinflatuvar**
bir **uyarı** gerekir.
- ✎ Bu da **fetal akciğerden** salgılanan **sur-
faktan-A proteini** ve **stres** sonucu üre-
tilen moleküllerin [**DAMP'lar (HMGB1)**]
TLR4 üzerinden **NFκB** yolağını aktive
etmesiyle gerçekleşir.
- ✎ Bağışıklık hücrelerin miyometriyuma
girişi uterusun kasılmasını, bebeğin
doğumunu ve plasantanın ayrılmasını
teşvik etmek için çok önemlidir.
- ✎ Her 3 evrede de immün sistemde dina-
mik değişimler gözlenir.



Sonuç

- ✦ **Maternal-fetal** arayüzdeki **immün tolerans**, plasentadaki hücresel kompozisyon ve **mikroçevre** arasındaki **karmaşık** etkileşim sayesinde sağlanır.
- ✦ Yapılan **çalışmaların** çoğu **hücresel** düzeyde gerçekleştirilmiştir, **hayvan** modellerinde yeterli **doğrulanmamış**
- ✦ **Plasenta** bağışıklığının **organ naklinde uygulanmasına** ilişkin **çalışmalar** ise **sınırlıdır**. Bu konuda bilgi oluşması için
- ✦ Bağışıklık yolaklarının ve moleküllerinin detaylı olarak araştırıldığı ve **hayvan** modellerinin kullanıldığı **in vivo** deneylere ihtiyaç vardır.



Plasental bağışıklık ve organ naklinde araştırma eğilimleri. **(A)** Yıllık bilimsel üretim 1980'den 2021'e kadar artan bir eğilim göstermektedir. **(B)** Yayınlanan bu çalışmaların en alakalı kaynakları. İlgili ilk üç kaynak **Journal of immunology**, **Blood** ve **Transplantation**'dır. **(C)** Ülke bilimsel üretimi. Renk, her ülkedeki ilgili çalışmaların sayısını gösterir. **(D)** Kelime bulutu, yayınlanan çalışmalardan elde edilen **anahtar kelimelere** dayanmaktadır.



- ✈ Dr. TUBA ERDOĞAN
- ✈ Biol. ŞALE ŞİRVAN
- ✈ Biol. DİLEK BAL ÜNALAN
- ✈ Biol. HANİFE HABERAL
- ✈ Biol. SEDEF IŞIK

DOKU TİPLEME VE TRANSPLANTASYON İMMÜNOLOJİSİ LABORATUVARI





DİKKATİNİZ İÇİN TEŞEKKÜRLER

Dr. Uğur MUŞABAK

