

## REKÜRREN SPONTAN ABORTUSLARDA LENFOSİT SUBGRUPLARI VE SİTOKİNLERİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI<sup>1</sup>

Abdullah BOZTOSUN<sup>1</sup>, Selahattin KUMRU<sup>1</sup>, Ahmet GÖDEKMERDAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 26.01.2004

### Investigation of the Role of Lymphocyte Subgroups and Cytokines in Recurrent Spontaneously Abortion Cases

#### Summary

We planned the study in order to evaluate the relationship of the T lymphocytes and the cytokines with healthy pregnancies and recurrent spontaneous abortion (RSA).

The groups are designed as group 1; nonpregnant women (n=18), group 2; women in their first trimester pregnancy and completed the pregnancies until term without any complication (n=18), group 3; patients with sporadic spontaneous abortion (n=18), group 4; patients with RSA (n=17), group 5; women with a history of RSA and completed these pregnancies till term (n=17). Peripheral blood samples were collected at early follicular phase in group 1, at first trimester in both group 2 and group 5 and at the time of abortion in both group 3 and group 4. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used for the measurement of serum concentrations of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10. Flow Cytometry was used for detection of the percentages of T lymphocytes subpopulations (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) just after the peripheral blood samples obtained. One way variance analysis was used for the comparison between the percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes. Post hoc Tukey's HSD test was used if necessary. Kruskal-Wallis analysis was used for cytokine concentrations and Mann-Whitney U test was used if necessary. SPSS 10.0 for Windows programme was used for all of the statistical analysis.

There were no statistically significant differences in the concentrations of the serum IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-4 between all groups (p>0.05). IL-10 concentrations were statistically higher in all pregnant (Group 2, 3, 4, 5) than nonpregnant (Group 1) (p<0.05). There were no statistically significant differences in the percentages of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> between the groups (p>0.05).

As a conclusion of this study; it is thought that there is a relationship between healthy pregnancies and increased serum Th2 response, and there is inadequate Th2 response in RSA.

**Key Words:** Recurrent spontaneous abortion, cytokine, lymphocytes subgroups

#### Özet

Sağlıklı gebelikler ve rekürren spontan abortus (RSA) ile T lenfositler ve bunların salgıladıkları sitokinlerin ilişkilerinin araştırılması.

Çalışma; Grup 1; gebe olmayan (n=18), grup 2; birinci trimesterde gebe olan ve gebelikleri miadına kadar sağlıklı devam eden (n=18), grup 3; sporadik spontan abortus yapan (n=18), grup 4; RSA yapan (n=17), grup 5; RSA öykülü ve sağlıklı gebeliği bulunan bu gebelikleri de miadına kadar sağlıklı devam eden (n=17) kadınlardan olmak üzere toplam 5 grup oluşturularak gerçekleştirildi. Grup 1' de erken foliküler dönemde, grup 2 ve 5' te birinci trimesterde, grup 3 ve 4'te abortus anında periferik kan örnekleri toplandı. Serum interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin-4 (IL-4) ve interlökin-10 (IL-10) konsantrasyonları Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile ölçüldü. CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T lenfosit subgruplarının yüzdeleri akım sitometrisi ile periferik kan örnekleri alındıktan hemen sonra belirlendi. CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> lenfosit yüzdelерinin karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi ve gerektiğinde post hoc Tukey's HSD testi kullanılarak yapıldı. Sitokin konsantrasyonları Kruskal-Wallis analizi ve gerektiğinde Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. Tüm istatistiksel değerlendirmeler SPSS 10.0 for Windows programından yararlanılarak gerçekleştirildi.

<sup>1</sup> Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) tarafından 824 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Serum IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve IL-4 konsantrasyonları gruplar arasında farklı değildi ( $p>0.05$ ). Tüm gebeliklerde (Grup 2, 3, 4, 5) IL-10 konsantrasyonları gebe olmayanlardan (Grup 1) istatistiksel olarak yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Gruplar arası CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> yüzdeleri farklı değildi ( $p>0.05$ ).

Mevcut çalışmanın sonuçları; başarılı gebelikler ile artmış serum Th2 yanıtı arasında ilişkinin varlığını, RSA'larda ise Th2 yanıtının yetersizliğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Rekürren spontan abortus, sitokin, lenfosit subgrupları

## Giriş

Dünya Sağlık Teşkilatı, 1977 yılında abortusu; anne uterusundan, 500 gr veya daha düşük ağırlıklı fetusun dışarıya atılması veya oradan alınması olarak tanımlamıştır (1). Spontan abortuslar, etyolojilerindeki farklılık nedeniyle, sporadik spontan abortuslar ve rekürren spontan abortus (RSA)'lar şeklinde iki başlık altında incelenmektedir. RSA: son adet tarihinden itibaren 20 haftadan önce klinik olarak fark edilmiş üç veya daha fazla gebelik kaybına denir (2). Son yıllarda iki abortusu olan olgular da bu sınıflamaya alınmaktadır (3). Buna göre RSA sebepleri; genetik, endokrinolojik, anatomik, immünolojik, mikrobiyolojik ve kişisel sebepler olarak sınıflandırılmaktadır (4-7).

T lenfositler, dolaşımdaki lenfositlerin % 60-80 kadarını oluştururlar ve periferik kandaki T hücrelerinin üçte ikisi CD4<sup>+</sup>, üçte biri CD8<sup>+</sup> yüzey reseptörleri taşırlar (8). CD8<sup>+</sup> yüzey reseptörü taşıyan subpopülasyon, sitotoksik fonksiyon yapan efektör T hücrelerinden oluşur (9). CD4<sup>+</sup> T lenfositleri, T helper (Th) hücreleri olarak da isimlendirilirler ve Th1 ve Th2 olmak üzere iki önemli alt grubu mevcuttur. İmmün balans için CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> oranı önemlidir. Çünkü, bu hücreler birbirlerinin fonksiyonlarını kontrol ederek immün cevabın optimal düzeyde sürdürülmesini sağlarlar (9).

Sitokinler, doğal ve spesifik immün yanıt oluşumunda, immün sistem hücrelerinin karşılıklı ilişkilerini düzenleyen protein veya glikoprotein yapısında maddelerdir. Hücreler arası sinyal proteinleri olan sitokinler, immün ve inflamatuvar yanıt oluşumu, hematopoez ve yara iyileşmesi gibi farklı birçok olayın düzenlenmesinde rol alırlar (10). Th1 hücreleri interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), tümör nekroz faktör-alfa ve beta (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) ve interlökin-2 (IL-2) sitokinlerini sekrete ederken, Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 sitokinlerini sekrete ederler (11).

Th1 tipi sitokinlerin direkt embriyotoksik aktivite göstererek veya plasental trofoblast hasara neden olarak gebeliğe zararlı etkileri olabileceği bildirilmektedir (12). TNF- $\alpha$  ve INF- $\gamma$ 'nın trofoblast hücrelerine sitotoksik olduğu (13), normal gebe

farelere TNF- $\alpha$  veya INF- $\gamma$  uygulanmasının abortusa neden olduğu gösterilmiştir (14).

İnsanlarda, antijen veya mitojenlerle indüklenmiş periferik kan mononükleer hücre (PKMH) kültürleri ile yapılan çalışmalarda, abortusların Th1 grubundan IL-2 ve INF- $\gamma$  konsantrasyonlarında artış ve Th2 grubundan olan IL-10 konsantrasyonunda azalış ile birlikte olduğu rapor edilmiştir (15). Hill ve ark., PKMH'nin trofoblast antijenleri ile aktivasyonu sonucunda Th1 sitokinlerinin üretiminin, açıklanamayan RSA'larda arttığını bildirmişlerdir (16). Raghupathy ve ark., PKMH kültürlerini mitojenle indükledikleri çalışmada; RSA'lı kadınlarda INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  ve IL-2 gibi Th1 sitokinlerin konsantrasyonlarının arttığını, buna karşılık, sağlıklı gebeliklerde ise IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-10 gibi Th2 cevabını gösteren sitokinlerin arttığını göstermişlerdir (17). Piccinni ve ark., açıklanamayan RSA'lı kadınların plasentalarındaki T hücrelerinin, sağlıklı gebeliği olan kadınlarınkinden daha düşük IL-4 ve IL-10 sekrete ettiklerini bildirmişlerdir (18).

Gerek PKMH gerekse desidual hücre kültürlerinde, Th1 ve Th2 cevabı ile RSA ilişkisi çokça araştırıldığı halde, RSA'lı kadınlarda serumdaki sitokin konsantrasyonları ve bunların sağlıklı gebelikler ile karşılaştırılması konusunda daha az çalışma mevcuttur. Bir taraftan RSA'lı kadınların serumlarında artmış Th1 ve azalmış Th2 sitokin konsantrasyonları rapor edilirken (19), diğer taraftan serumda Th2 sitokin konsantrasyonlarını göstermekte başarılı olunamadığı bildirilmektedir (20). Sonuçta RSA'larda serum sitokin konsantrasyonları ile ilgili tam bir fikir birliği oluşmamıştır. Ayrıca, periferik kan T hücre subgrupları ile RSA ilişkisini araştıran çok az sayıda çalışma mevcut olup, bu çalışmaların sonuçları da birbiri ile çelişkilidir (21-23). Böylece, RSA ile periferik T hücre popülasyonu ilişkisi bu gün için tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir.

Tüm bunların ışığında mevcut çalışma, sağlıklı gebelikler, sporadik spontan abortuslar ve RSA'lı kadınlarda serum sitokin profillerinin araştırılması, T hücre sayı ve fonksiyonlarında değişiklik olup olmadığının ortaya konabilmesi amacıyla planlandı.

## Materyal ve Metot

Çalışma, Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği ve Sağlık Bakanlığı Elazığ Sarahatun Doğumevi'ne başvuran gönüllü olgular arasından aşağıda belirtilen gruplar oluşturularak gerçekleştirildi. Çalışma için lokal etik kurul onayı alındı.

### Çalışma grupları

**Grup 1 (Gebe olmayan):** Akut veya kronik herhangi bir hastalığı bulunmayan ve düzenli menstrüasyonları olan reproduktif çağıdaki gebe olmayan kadınlardan oluşturuldu (n=18).

**Grup 2 (Sağlıklı gebe):** Akut veya kronik herhangi bir hastalığı olmayan ve reproduktif öyküsünde erken doğum, ektopik gebelik, erken membran rüptürü ve anomalili fetus bulunmayan birinci trimester gebeliği olan nullipar veya multipar gebelerden oluşturuldu. Bu gruptaki kadınlardan, gebelikleri termde komplikasyonsuz olarak sonlananlar çalışmaya dahil edildi (n=18).

**Grup 3 (Sporadik abortus)** Akut veya kronik herhangi bir hastalığı bulunmayan ve reproduktif öyküsünde erken doğum, ektopik gebelik, erken membran rüptürü, anomalili fetus ve abortusu bulunmayan sporadik spontan abortus yapan hastalardan oluşturuldu. Bu hastalar abortus sonrası toksoplazma, rubella, sitomegalovirus, herpes virüs, sifiliz enfeksiyonları, hormon profili, tam kan sayımı, rutin biyokimyasal tahliller, pelvik ultrasonografi, histerosalpingografi, vaginal sürüntü ve idrar kültürü, antikardiolipin antikor, antinükleer antikor, antitiroid antikorlar, aPTT ve hepatit markerleri açısından değerlendirildi. Ayrıca anne, fetus ve babanın kromozomal analizleri yapılarak, RSA nedeni olabilecek patolojisi olan hastalar çalışma dışı bırakıldı (n=18).

**Grup 4 (RSA):** Akut veya kronik herhangi bir hastalığı bulunmayan ve reproduktif öyküsünde iki veya daha fazla birbirini takip eden abortusu bulunan hastalardan oluşturuldu. Bu hastalarda grup 3'te olduğu gibi RSA etyolojisi açısından değerlendirildi ve bilinen RSA nedenlerine sahip olanlar çalışmadan çıkartıldı (n=17).

**Grup 5 (RSA öykülü sağlıklı gebe):** Akut veya kronik herhangi bir hastalığı bulunmayan ve reproduktif öyküsünde iki veya daha fazla birbirini takip eden abortusu bulunan birinci trimesterdeki gebelerden oluşturuldu. Bu gruptaki gebelerden gebeliklerinin termde komplikasyonsuz olarak sonlananlar çalışmaya dahil edildi (n=17).

## Flow-sitometri (Akım sitometrisi)

Araştırmaya alınan olgulardan grup 1'de erken foliküler fazda (siklusun 3-5. günleri arasında), grup 2 ve 5'de 1. trimesterde, grup 3 ve 4'te abortus anında yaklaşık 2 ml. heparinli kan örneği alınarak akım sitometrisi ile CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> analizleri örnek alındıktan sonraki 2 saat içerisinde yapıldı. Periferik kan CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> analizi için FITC (fluorescein isothiocyanate) veya PE (phycoerytrin) ile konjuge halde tek renkli monoklonal antikorlar kullanıldı. T helper hücreleri için anti CD4<sup>+</sup> ve sitotoksik T hücreler için anti CD8<sup>+</sup> monoklonal antikorları (Coulter/Immunotech, USA) kullanıldı. Her bir örnek için uygun izotipik kontroller kullanıldı. İncelemeler Coulter Epics XL.MCL flow cytometry cihazı ile gerçekleştirildi. Lenfositler "forward scatter" ve "side scatter" özellikleri ile tanımlanarak "gate" içine alınarak analiz gerçekleştirildi. Her bir kapı içerisinde 10.000 hücre saydırıldı. Her bir monoklonal antikorla reaksiyon veren lenfositler, floresan özelliklerine göre ayrılıp sayıları yüzde olarak rapor edildi.

## Sitokin analizi

Akım sitometrisi için kan örneği alınırken eş zamanlı olarak sitokin tayinleri için de yaklaşık 4 ml. kan alındı ve örnekler 3000 rpm.de 5 dakika santrifüj (Lobofuge 200-Heraeus sepatech Instruments, Germany) edildi. Ayrıştırılan serumlar, sitokin analizleri yapılabildiği kadar -80°C ısıda derin dondurucuda (New Brunswick Scientific, -80°C Ultra Low Freezer, U-57085, USA) bekletildi. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 ve IL-10 ölçümleri BIOSOURCE International (USA) kitleri kullanılarak ELISA yöntemiyle gerçekleştirildi. Kullanılan kitlerin sensitivite değerleri TNF- $\alpha$  için <1.7 pg/ml, IFN- $\gamma$  için <4 pg/ml, IL-4 ve IL-10 için <1 pg/ml olarak kaydedildi. Tüm ölçümler Fırat Tıp Merkezi İmmünoji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

## İstatiksel analiz

Elde edilen veriler ortalama değer  $\pm$  standart sapma olarak kaydedildi. Grupların karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren veriler için tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA), normal dağılım göstermeyen veriler için Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis varyans analizinde p<0.05 olduğu durumlarda *post hoc* Mann-Whitney U testi kullanıldı. P<0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm istatistiksel işlemler SPSS 10.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi.

## Bulgular

Çalışmaya katılan grupların yaş ortalamaları ve gebe kadınların gebelik haftaları istatistiksel olarak birbirinden farklı değildi ( $p>0,05$ ) (Tablo 1).

Tablo 1. Grupların yaş ve gebelik haftaları

GRUPLAR	Yaş Ortalama $\pm$ SS	Gebelik haftası Ortalama $\pm$ SS
I n=18	26.5 $\pm$ 4.3	-
II n=18	27.3 $\pm$ 5.2	11.1 $\pm$ 2.7
III n=18	26.4 $\pm$ 5.1	10.7 $\pm$ 1.6
IV n=17	29.1 $\pm$ 3.5	11.4 $\pm$ 3.0
V n=17	30.4 $\pm$ 4.6	12,1 $\pm$ 2,8

SS:Standart sapma

Tablo 2. Grupların gravida özellikleri

Gravida sayısı	Grup I n=18		Grup II n=18		Grup III n=18		Grup IV n=17		Grup V n=17	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	9	50	0	0	0	0	0	0	0	0
1	6	33.4	6	33.4	6	33.4	0	0	0	0
2	2	11.1	9	50	5	27.8	3	17.5	0	0
3	1	5.5	2	11.1	7	38.8	5	29.5	0	0
4	0	0	1	5.5	0	0	6	35.3	6	35.3
5	0	0	0	0	0	0	2	11.8	7	41.3
6	0	0	0	0	0	0	1	5.9	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	3	17.5
8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5.9

Tablo 3. Grupların abortus sayıları

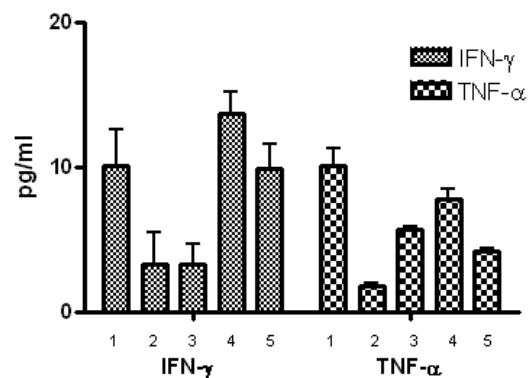
Abortus sayısı	Grup I n=18		Grup II n=18		Grup III n=18		Grup IV n=17		Grup V n=17	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	18	100	18	100	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	18	100	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	3	17.5	0	0
3	0	0	0	0	0	0	11	64.8	6	35.3
4	0	0	0	0	0	0	2	11.8	7	41.3
5	0	0	0	0	0	0	1	5.9	3	17.5
6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5.9

Abortus açısından gruplar karşılaştırıldığında; grup 1 ile 2, grup 4 ile 5 arasında anlamlı fark yoktu ( $p>0,05$ ). Diğer gruplar arası karşılaştırmalar anlamlı olup grup 4 ve 5'te abortus sayıları grup 1, 2, ve 3'den fazla idi ( $p<0,05$ ). Grupların abortus özellikleri Tablo 3'de gösterildi.

### Serum sitokin konsantrasyonları

**IFN- $\gamma$ :** Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmamakla birlikte; ortalama serum IFN- $\gamma$  konsantrasyonunun, sağlıklı gebeliklerde ve sporadik spontan abortus yapanlarda gebe olmayanların ortalama değerinin yarısından daha düşük konsantrasyonda olduğu, RSA'larda ise yaklaşık %20 oranında arttığı gözlemlendi (Şekil 1).

Grup 1, gebe olmayan kadınlardan oluştuğu için gebelik haftası yönünden diğer gruplarla karşılaştırılmadı. Gruplar gravidaları açısından karşılaştırıldıklarında sadece grup 2 ve 3 arasında fark yoktu ( $p>0,05$ ). RSA yapan kadınlar ile, RSA öykülü sağlıklı gebe kadınların, diğer bütün gruplardan daha yüksek gravidaya sahip oldukları gözlemlendi ( $p<0,05$ ) (Tablo 2). Grupların pariteleri birbirinden farklı değildi ( $p>0,05$ ).



Şekil 1. Grupların serum IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  konsantrasyonları.

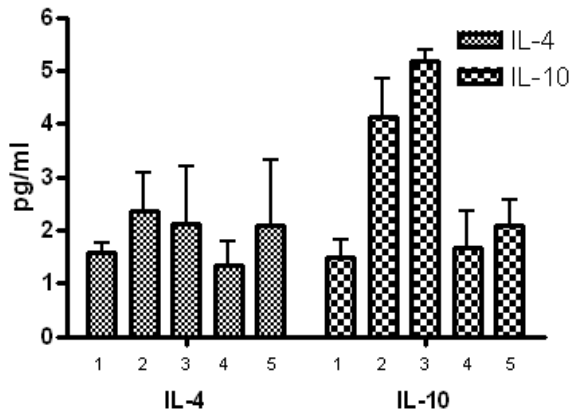
IFN- $\gamma$ : İnterferon gama

TNF- $\alpha$ : tümör nekroze edici faktör alfa

Hata çubukları standart hatayı göstermektedir.

**TNF- $\alpha$ :** İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, gebe olmayan sağlıklı kadınlarla karşılaştırıldığında, tüm gebeliklerde serum TNF- $\alpha$  konsantrasyonlarının azaldığı, bu azalışın en çok sağlıklı gebelerde en az ise RSA'larda olduğu gözlemlendi (Şekil 1).

**IL-4:** Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmamakla birlikte, tüm gebeliklerde gebe olmayanlardan daha yüksek serum IL-4 konsantrasyonunun varlığı gözlemlendi. IL-4 konsantrasyonlarındaki en yüksek ortalama değer sağlıklı gebelerde bulunurken, en düşük ortalama değer RSA'lı kadınlarda ölçüldü (Şekil 2).



Şekil 2. Grupların serum IL-4 ve IL-10 konsantrasyonları  
IL-4 : İnterlökin 4 IL-10: İnterlökin 4

a:  $p < 0.05$  Grup 1 ile 2,3,4 ve 5 karşılaştırıldığında (Mann-Whitney U).

**IL-10:** Gebe olmayan sağlıklı kadınlarla karşılaştırıldığında, tüm gebeliklerde serum IL-10 konsantrasyonunun arttığı tespit edildi ( $p < 0.05$ ). RSA ve RSA öykülü kadınların istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte sağlıklı gebeler ve sporadik abortusların ortalama yarısı kadar serum IL-10 düzeyine sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 2).

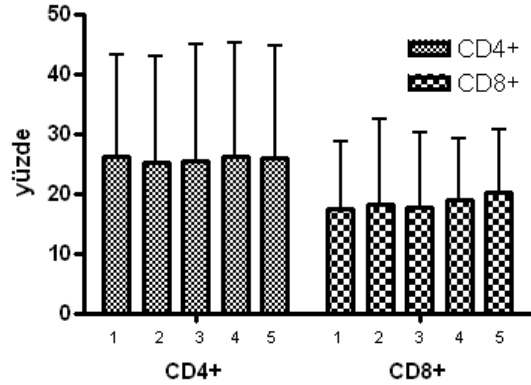
#### Periferik kan lenfosit yüzdeleri

Grupların periferik kan CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T lenfosit yüzdeleri birbirinden farklı değildi ( $p > 0.05$ ) (Şekil 3).

#### Tartışma

Sitokinlerin çoğu temel olarak çok küçük miktarları ile etkili olan, kısa yarı ömürlü, parakrin ve otkrin aktivitelere sahip, glikoprotein yapıda moleküllerdir. Bununla birlikte, bir kısım sitokinler endokrin yolla vücudun uzak bölgelerine periferik dolaşım ile ulaşarak, bu bölgelerde de etkili olurlar. Böylece serumda bazı durumlarda saptanabilir konsantrasyonlara ulaşabilirler. Örneğin: Meninokokal menenjit (24), lepramatöz lepra,

leyişmaniyoz (25), gonore (26) ve candidioz (27) gibi enfeksiyöz durumlarda, SLE (28) ve polimiyalji romatika (29) gibi otoimmün hastalıklarda, çeşitli çoğul organ yetmezliği durumlarında (30), akut pankreatitte (31), endometrioste (32), prostat kanserinde (33) ve myokard enfarktüsünde (34) hastalık seyri ile yüksek serum sitokin konsantrasyonları arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.



Şekil 3. Grupların periferik kan CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> lenfosit yüzdeleri

CD4<sup>+</sup>: Yardımcı T hücresi CD8<sup>+</sup>: Sitotoksik T hücresi  
Grupların periferik kan CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> yüzdeleri birbirinden farklı değildi ( $p > 0.05$ , One Way Anova)

Başarılı gebeliği olan kadınlar ile RSA'lı kadınların periferik kan lenfositlerinin hücre kültürlerinde plasental antijen stimülasyonu ile elde edilen sitokin konsantrasyonları karşılaştırıldığında; RSA grubunda düşük Th2 ve yüksek Th1 sitokin konsantrasyonları saptanırken, başarılı gebeliği olan kadınlarda Th2 sitokin konsantrasyonlarının yüksek olduğu gösterilmiştir (16,35). Benzer sonuçlar mitojen ve antijenle indüklenmiş periferik kan lenfositlerinin sitokin cevabının gösterildiği çalışmalardan da elde edilmiştir (15, 36).

Mevcut çalışmada, periferik serum örneklerinde Th1 cevabını ölçmek amacıyla IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ , Th2 cevabını ölçmek amacıyla da IL-4 ve IL-10 konsantrasyonları ölçüldü. IFN- $\gamma$ , RSA yapan kadınların serum örneklerinde diğer gruplardan anlamlı olmamakla birlikte yüksek olma eğiliminde idi. Bu bulgular, bir Th1 cevabı olan IFN- $\gamma$  artışının RSA ile ilişkili olabileceği fikrini destekler niteliktedir (19). Aynı zamanda, sağlıklı gebeliklerde, gebe olmayanlardan daha düşük serum IFN- $\gamma$  konsantrasyonlarının bulunması sağlıklı gebeliklerin baskılanmış Th1 cevabı ile birlikte olduğu görüşünü desteklemektedir (11).

Maksheed ve ark., RSA'larda ölçülen serum TNF- $\alpha$  konsantrasyonunun, sağlıklı gebeliklerden daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (20). Benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da rapor edilmiş ve abortus ile periferik kan TNF- $\alpha$  konsantrasyonları arasında ilişki olabileceğini bildirilmiştir (37,38). Bizim çalışmamızda da TNF- $\alpha$  konsantrasyonu istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte RSA yapanlarda normal gebelere göre yaklaşık üç kat yüksek bulundu. Schust ve Hill (39), erken gebelikte serumdan IFN- $\gamma$ 'nın ölçülemeyeceğini buna karşın TNF- $\alpha$  konsantrasyonlarının ölçülebileceğini, ancak, bunun da gebeliğin ne şekilde seyredeceği ve sonlanacağı hakkında bir fikir veremeyeceğini iddia etmişlerdir. Yine de, bizim çalışmamızda da saptandığı gibi erken gebeliklerde ve RSA'larda serum IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  ölçümünün yapılabildiğini (19, 20) ve gebelik seyri ile ilişkili olduğunu bildiren raporlar (40, 41), gebelikte periferik serum Th1 sitokinlerinin artmış konsantrasyonları ile RSA'nın ilişkili olabileceği fikrini desteklemektedir.

Sağlıklı gebelikte PKMH'lerinde, IL-4 üretiminden sorumlu m-RNA ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir (42). Sağlıklı gebelerde ve RSA'larda serum IL-4 konsantrasyonlarının ölçülemeyeceği yönünde raporlar olmasına rağmen (20), Deneys ve De Bruyere, hem RSA'larda hem de sağlıklı gebelerde bu sitokinin ölçümünü yapabildiklerini ve RSA'larda daha düşük serum IL-4 konsantrasyonu tespit ettiklerini bildirmişlerdir (43). Qui ve ark., serum IL-4 konsantrasyonunun normal gebelerde, gebe olmayanlar ve açıklanamayan RSA'lara göre anlamlı derecede daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (44). Bizim sonuçlarımız yukarıdaki raporları destekler niteliktedir ve serum IL-4 konsantrasyonunun sağlıklı gebeliklerde arttığını, RSA'larda ise bu artışın gerçekleşmediğini düşündürmektedir.

Bir Th2 sitokini olan IL-10'un abortus eğiliminde olan farelere enjeksiyonu ile fetal kaybın önlenildiği gösterilmiştir (45). Mitojen ve trofoblastik antijenler ile indüklenen PKMH'lerinin başarılı gebelikleri olan kadınlarda, RSA'lı kadınlardan daha fazla konsantrasyonda IL-10 salgıladığı görülmüş (15,16,35,36) ve IL-10'un normal gebeliğin sürdürülmesinde gerekli bir Th2 sitokini olduğu düşünülmüştür (46). Mevcut çalışmada serum IL-10 konsantrasyonları, tüm gebeliklerde gebe olmayanlardan daha yüksek değerlerde saptandı. RSA ve RSA öykülü grupta ölçülen serum IL-10 konsantrasyonları, istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemekle birlikte,

normal gebe grubunda ölçülen düzeyin yaklaşık yarısı kadar konsantrasyonda bulundu. Bazı ötetler periferik kanda IL-10 düzeylerini sadece doğum ve abortus anında ölçebildiklerini belirttikleri halde (20), bazıları da sağlıklı gebeliklerde artmış konsantrasyonlarının bulunduğunu rapor etmişlerdir (19). Qui ve ark., serum IL-10 konsantrasyonlarının açıklanamayan RSA'lı kadınlarda gebe olmayanlardan daha düşük olduğunu göstermişlerdir (44). Bizim sonuçlarımız da başarılı gebeliklerin artmış IL-10 konsantrasyonları ile birlikteliğini desteklemektedir.

Th1 cevabı baskınlığının nasıl RSA'ya neden olduğu ya da baskın Th2 cevabının sağlıklı gebeliğin devamına nasıl katkı sağladığı konusunda bir model açıklamak henüz tam olarak mümkün olmamıştır. Yine de, Th1 cevabı için IL-12 ve nitrik oksidin, makrofajlarda TNF- $\alpha$  üretimi için mutlak gerekli olduğu, Th2 cevabı için de IL-12 cevabının baskılanmasının gerektiği düşünülmektedir (19). Hayvan çalışmaları IL-12 ile birlikte ortaya çıkan nitrik oksidin ya da abortustan önce desidual makrofajların in situ aktivasyonunda müdahil molekül olarak katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (47). Fetomaternal yüzde Th2 baskınlığının bir nedeninin gebelikte artan progesteron olduğu düşünülmektedir. Hem IL-4 hem de IL-10'un, Th1 hücreleri ve makrofajların gelişmelerini ve fonksiyonlarını inhibe edebildikleri, böylece de fetal allogreftin reddini önleyebildikleri de bir başka açıklama modelidir (48). Bizim çalışmamızda ele edilen serum IL-10 artışının nedeninin maternofetal yüzdeki durumun periferik dolaşımdaki yansımaları olduğunu düşünmekteyiz.

Yukarıda anlatıldığı gibi, her ne kadar bazı hastalık halleri ile serum sitokin konsantrasyonları arasında ilişki gösterilebilse de (24-34) bu her zaman mümkün olmamaktadır (20,39). Serum sitokinlerinin araştırıldığı çalışmalarda; sitokinlerin farklı yarılanma ömürlerine sahip olduğu, bazılarının daha hızlı yıkıldığı ve sitokin ölçümünde kullanılan kitlerin henüz tam olarak standardize edilemediği göz önünde bulundurulmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz.

RSA'larda lenfositlerin rolünü değerlendirebilmek için T lenfositlerin iki alt grubu olan CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> hücrelerinin yüzdeleri akım sitometrisi ile periferik kanda analiz edildi. Grupların CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> yüzdeleri benzer bulundu ve gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi. Psarra ve ark., açıklanamayan RSA'lı ve gebe olmayan kadınların periferik kanlarında CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> hücre yüzdelerinin iki grup arasında farklı olmadığını

belirtmişlerdir (22). Sağlıklı ve RSA'lı gebelerin periferik immün profillerinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada her iki grup arasında CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> yüzdelerinin farklı olmadığı bildirilmiştir (23). Bu çalışmaların sonuçları bizim sonuçlarımız ile uyumlu görünmektedir. CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> hücre yüzdeleri ile RSA ilişkisini maternofetal yüzeyde araştırmak amacıyla Vassiliadou ve ark., endometrium dokusu üzerinde, CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> hücrelerinin abortuslu ve normal gebeliği bulunan grup arasında farklı olmadığını rapor etmişlerdir (49). Böylece, asıl belirleyici olanın CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> hücre oranlarından çok, bu hücrelerin ortak sitokinleri salgılayabilme özelliklerinin (9), ilk kez uyarıldıkları mikro çevrenin antijen yapısının ve salgıladıkları sitokin konsantrasyonlarının (50) olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak mevcut çalışmada RSA'lı kadınlarda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla

birlikte serum Th1 cevabı artışı eğiliminin gözlenmesi, RSA ile Th1 baskınlığı arasında ilişki olabileceği yönündeki görüşleri destekler niteliktedir. Sağlıklı gebelikler ise periferik kanda artmış Th2 cevabı ile ilişkili görünmektedir. RSA'larda baskın Th1 cevabının düzeltilmesi amacıyla çalışmalar planlanmasının ve bu çalışmalar ile elde edilecek bilgilerin, RSA'lı kadınların sağlıklı gebelik beklentilerine katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

### Teşekkür

Çalışmaya verdikleri destekten dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP 824 numaralı proje) yönetimine teşekkür ederiz

### Kaynaklar

1. Atasu T, Şahmay S. Abortus. In: Atasu T, Şahmay S. (editörler). Jinekoloji. 1. Baskı, İstanbul: Ünsel Dil Hizmetleri ve Yayıncılık AŞ, 1996; 518-531
2. Berek JS, Adashi EY, Hillard PA. Novak. Jinekoloji. Erk A. (Çeviri ed). 12. Baskı, İstanbul: Nobel: 1998; 963-80
3. Stirrat GM. Recurrent miscarriage. Lancet 1990; 336: 673-75.
4. Harger JH, Archer DF, Marchese SG, Muracca-Clemens M, Garver KL. Etiology of recurrent pregnancy losses and outcome of subsequent pregnancies. Obstet Gynecol 1983; 62: 574-81.
5. Kutteh WH. Recurrent pregnancy loss. Ling FW Duff P (editors) Obstetrics and Gynecology Principles for practice. 1. Baskı, New York: McGraw-Hill: 2001; 1041-1053.
6. Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia-associated pregnancy wastage. Fertil Steril 1999; 72: 765-74.
7. Kutteh WH, Park VM, Deitcher SR. Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first-trimester recurrent pregnancy loss. Fertil Steril 1999; 71: 1048-53.
8. von Boehmer H. Thymic selection: a matter of life and death. Immunol Today 1992; 11: 454-58.
9. Romagnani S. T-cell alt groups (Th1 versus Th2). Annals Of Allergy Asthma and Immunology 2000; 85: 9-18.
10. Abbas AK, Lichtman AK, Rober JS. (Editors) Cytokines. Cellular And Molecular Immunology 3th edition, Philadelphia: WB Saunders Company: 1997; 249-278.
11. Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. Immunology 2001; 13: 219-227.
12. Hill JA. Cytokines considered critical in pregnancy. Am J Reprod Immunol 1992; 4: 123-26.
13. Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG, Guilbert LJ. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. Placenta 1994; 15: 819-35.
14. Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M, Wegmann TG. Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. J Reprod Fertil 1990; 89: 447-58.
15. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. Clin Exp Immunol 1996; 1: 127-33.
16. Hill JA, Polgar K, Anderson DJ. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. JAMA 1995; 2: 1933-36.
17. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, et al. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. Hum Reprod 2000; 3: 713-18.
18. Piccinni MP, Beloni L, Livi C, et al. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. Nat Med. 1998; 9: 1020-24.
19. Jenkins C, Roberts J, Wilson R, et al. Evidence of a T(H) 1 type response associated with recurrent miscarriage. Fertil Steril. 2000; 73: 1206-8.

20. Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Farhat R, Hassan N, Bandar A. Circulating cytokines and CD30 in normal human pregnancy and recurrent spontaneous abortions. *Hum Reprod* 2000; 9: 2011-7.
21. Malinowski A, Szpakowski M, Zeman K, Wilczynski J, Powierza S, Majewska E, Wozniak P. Immunologic characteristics women with recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. I. Cellular immune response. *Ginekol pol.* 1997; 5A: 232-9.
22. Psarra K, Kapsimali V, Tarassi K, et al. TCR gamma/delta + T lymphocytes in unexplained recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 2001; 1: 6-11.
23. Beer AE, Kwak JY, Ruiz JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol* 1996; 4: 376-82.
24. Waage A, Halstensen A, Espevik T. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet.* 1987; 8529: 355-7.
25. Pisa P, Gennene M, Soder O, et al. Serum tumor necrosis factor levels and disease dissemination in leprosy and leishmaniasis. *J Infect Dis* 1990; 5: 988-91.
26. Hedges SR, Sibley DA, Mayo MS, et al. Cytokine and antibody responses in women infected with *Neisseria gonorrhoeae*: effects of concomitant infections. *J Infect Dis* 1998; 3: 742-51.
27. Roilides E, Sein T, Schaufele R, Chanock SJ, Walsh TJ. Increased serum concentrations of interleukin-10 in patients with hepatosplenic candidiasis. *J Infect Dis* 1998; 2: 589-92.
28. Cesario TC, Andrews BS, Martin DA, et al. Interferon in synovial fluid and serum of patients with rheumatic disease. *J Rheumatol* 1983; 4: 647-50.
29. Uddhammar A, Sundqvist KG, Ellis B, Rantapaa-Dahlqvist S. Cytokines and adhesion molecules in patients with polymyalgia rheumatica. *Br J Rheumatol* 1998; 7: 766-69.
30. Hamano K, Gohra H, Noda H, et al. Increased serum interleukin-8: correlation with poor prognosis in patients with postoperative multiple organ failure. *World J Surg* 1998; 10: 1077-81.
31. Heresbach D, Letourneur JP, Bahon I, et al. Value of early blood Th-1 cytokine determination in predicting severity of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1998; 5: 554-60.
32. Pellicer A, Albert C, Mercader A, et al. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril* 1998; 3: 425-31.
33. Akimoto S, Okumura A, Fuse H. Relationship between serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and bone turnover receptors in prostate cancer patients. *Endocr J* 1998; 2: 183-89.
34. Miyao Y, Yasue H, Ogawa H, et al. Elevated plasma interleukin-6 levels in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1993; 6: 1299-304.
35. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, et al. Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol* 1999; 2: 122-30.
36. Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, et al. Mitogen-induced cytokine responses of maternal peripheral blood lymphocytes indicate a differential Th-type bias in normal pregnancy and pregnancy failure. *Am J Reprod Immunol* 1999; 5: 273-81.
37. Mueller-Eckhardt G, Mallmann P, Neppert J, et al. Immunogenetic and serological investigations in nonpregnant and in pregnant women with a history of recurrent spontaneous abortions. German RSA/IVIG Study Group. *J Reprod Immunol.* 1994 ;2: 95-109.
38. Mallmann P, Mallmann R, Krebs D. Determination of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and interleukin 2 (IL2) in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Arch Gynecol Obstet* 1991; 2: 73-8.
39. Schust DJ, Hill JA. Correlation of serum cytokine and adhesion molecule determinations with pregnancy outcome. *J Soc Gynecol Investig.* 1996; 5: 259-61.
40. Shaarawy M, Nagui AR. Enhanced expression of cytokines may play a fundamental role in the mechanisms of immunologically mediated recurrent spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 3: 205-11.
41. Szekeres-Bartho J, Faust Z, Varga P, Szereday L, Kelemen K. The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. *Am J Reprod Immunol* 1996; 4: 348-51.
42. Tranchot-Diallo J, Gras G, Parnet-Mathieu F, et al. Modulations of cytokine expression in pregnant women. *Am J Reprod Immunol* 1997; 3 :215-26
43. Deneys V, De Bruyere M. Immunological tolerance of the fetal allograft: efficacy of immunotherapy and IL-4 and TNF alpha serum levels in recurrent abortion. *Transplant Proc* 1997; 5: 2467-9.
44. Qiu L, Lin Q, Hong Y. Study on changes of serum T helper cell type 1 and 2 cytokines after active immunotherapy in women with unexplained habitual abortion. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2001; 7: 408-10.
45. Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, et al. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is



- corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J Immunol* 1995; 9: 4261-8.
46. Chaouat G, Menu E, de Smedt D, et al. The emerging role of IL-10 in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1996; 4:3 25-9.
  47. Haddad EK, Duclos AJ, Baines MG. Early embryo loss is associated with local production of nitric oxide by decidual mononuclear cells. *J Exp Med* 1995; 4: 1143-51.
  48. Piccinni M.P., Scaletti C, Maggi E, Romagnani S. Role of hormone- controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *Journal of Neuroimmunology* 2000; 109: 30-33.
  49. Vassiliadou N, Bulmer JN. Characterization of endometrial T lymphocyte subpopulations in spontaneous early pregnancy loss. *Hum Reprod* 1998; 1: 44-7.
  50. Maggi E, Parronchi P, Manetti R, et al. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 1992; 7: 2142-7.