

Gebe Farelerde Desidua Bazalis Dokusundaki PAS-Pozitif Uterus Doğal Katil Hücrelerinin Dağılımı

Emrah SUR¹  Yasemin ÖZNURLU¹ Tuğba ÖZAYDIN¹
İlhami ÇELİK¹ İbrahim AYDIN² Nariste KADIRALİEVA³

¹ Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, TR-42003 Kampüs, Konya - TÜRKİYE

² Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, TR-42003 Kampüs, Konya - TÜRKİYE

³ Kırgızistan Türkiye Manas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bişkek - KIRGIZISTAN

KVFD-2014-12718 Received: 28.11.2014 Accepted: 16.01.2015 Published Online: 07.02.2015

Özet

Bu çalışma, gebeliğin farklı dönemlerindeki fare desidua bazalis dokusunda periyodik-asit Schiff (PAS)-pozitif granüllere sahip uterus doğal katil (uNK) hücrelerinin dağılımının belirlenmesi amacıyla yapıldı. Bu amaçla, 12-14 haftalık fareler, gebe olmayan-kontrol grubu ile gebeliğin birinci, ikinci ve üçüncü haftalarının ortasına karşılık gelecek şekilde erken, orta ve geç gebelik dönemi (sırasıyla gebeliğin 3, 10. ve 17. günleri) olmak üzere 4 gruba ayrıldılar (n= 6). Plasentasyonun ilerlemesiyle birlikte metriyal bölge (MLAp; mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy), desidua bazalis, bağlantı bölgesi ve labirint bölgesi olmak üzere dört farklı bölge ayırt edildi. Desidua bazalis ve bağlantı bölgesi arasında trofoblast dev hücreleri dikkati çekti. Endometriyum dokusunda kontrol grubunda 5 adet/10.000 μm^2 olarak tespit edilen PAS-pozitif uNK hücre sayısının, gebeliğin erken döneminde desidua bazalis bölgesinde arttığı dikkati çekti (26,5 adet/10.000 μm^2). En yüksek uNK hücre sayısı (56 adet/10.000 μm^2) gebeliğin ikinci haftasında tespit edildi. uNK hücrelerine maternal kan damarlarının içinde de rastlanırken, mesometriyal bölgedeki maternal kan damarlarının genişlediği ve tunika mediya katmanlarının belirgin bir biçimde incelendiği dikkati çekti. Gebeliğin PAS-pozitif uNK hücrelerinin sayı ve dağılımlarını etkilediği sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: Fare, Gebelik, PAS, uNK

The Distribution of PAS-Positive Uterine Natural Killer (uNK) Cells in the Decidua Basalis of Pregnant Mice

Abstract

This study was carried out to determine the distribution of uterine natural killer (uNK) cells having periodic-acid Schiff (PAS) positive granules in the decidua basalis in pregnant mice. For this purpose, mice at 12-14 weeks of age were divided into four groups as non-pregnant control, and at the middle of the first, second, and the third week of the pregnancy, corresponding to early, middle, and late (3rd, 10th, and 17th days of pregnancy) gestational stages respectively (n= 6 for each group). After placentation, it was identified four different regions as metrial region (MLAp; mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy), decidua basalis, junctional zone and labyrinth zone in mice. It was observed trophoblast giant cells between decidua basalis and junctional zone. The number of PAS-positive uNK cells was found as 5 in 10.000 μm^2 in endometrium of control animals while it was determined as 26.5 number/10.000 μm^2 in decidua basalis at early gestational period. The highest PAS-positive uNK cell numbers (56 number/10.000 μm^2) were detected at the mid-gestational period in decidua basalis. uNK cells were also observed in the lumen of the maternal blood vessels. In mesometrial region, the dilatation of maternal blood vessels and thinning of the media layer was distinct. It was concluded that the number and the distribution of the uNK cells having periodic-acid Schiff (PAS) positive granules was affected by pregnancy.

Keywords: Mice, PAS, Pregnancy, uNK

GİRİŞ

İnsan ve fare gibi invaziv hemo-koryal ya da hemo-endotelyal plasentasyona sahip türlerde gebeliğin uterus dokusunda meydana getirdiği en önemli histolojik değişim

desidualizasyondur. Bu süreçte endometriyumdaki fibroblast benzeri hücreler çoğalıp farklılaşarak desidual hücrelere dönüşürken; değişen endometriyum dokusu da desidua olarak adlandırılır^[1]. Plasentanın maternal bölümü, desidualizasyondan sonra farklı dokular halinde kendini



İletişim (Correspondence)



+90 505 7669551



emrahsur@selcuk.edu.tr

belli eder. Bunlardan birisi mezometrial üçgen tarafında uterus düz kas katmanları arasındaki geçici bir yapı olan "metrial gland" ya da "MLAp (Mesometrial Lymphoid Aggregate of pregnancy)" olarak bilinirken; bir diğeri yeni gelişmekte olan damarları içeren desidua bazalis dokusudur. Desidua bazalis bölgesine komşu olan bir diğer bölge ise spongiotrofoblastların çoğunluğu oluşturduğu bağlantı bölgesidir. Lümene komşu olan ve kan aralıklarında maternal ve fetal alyuvarların yakın ilişkisi ile dikkati çeken son bölge ise labirint bölge olarak adlandırılır [2]. Bu süreçte endometriyum dokusundaki pek çok hücre tipinin sayı ve dağılımında değişimler meydana gelir. Bununla birlikte asıl değişim uterus doğal katil (uterine natural killer-uNK) hücrelerinin sayısında karşımıza çıkmaktadır. uNK hücrelerinin 2 haftalık farelerde küçük ve granülsüz oldukları [3], fertilizasyon ve implantasyonu takiben gebeliğin yaklaşık 4. gününde, önce desidua bazalis, ardından komşu trofoblast tabakası ve daha sonra da metrial gland olarak adlandırılan bölgede toplandıkları bildirilmektedir [4]. Gebeliğin 12-14. günlerinde sayıları en yüksek seviyeye ulaşan uNK hücrelerinin, gebeliğin sonlarına doğru belirgin bir biçimde azaldıkları ifade edilmektedir [5].

Doğal katil (natural killer-NK) hücrelerinin, tümör hücreleri, virüsle enfekte hücreler ve allojen antijenlere karşı organizmayı savundukları bilinmektedir. Bu hücrelerin, esas olarak kemik iliğinde pluripotent hemapoietik hücrelerin lenfoid öncül hücrelerine dönüşümü ile ortaya çıktıkları ve sekonder lenfoid organlarda pre-NK hücreler halini alarak farklı dokulara göç ettikleri bildirilmektedir. Uterus dokusuna gelen küçük ve granülsüz pre-NK hücreleri de uterusu olgunlaşarak büyük ve granüllü hücre formuna dönüşürler (Large Granulated Cells). Bu andan itibaren uNK hücreleri olarak adlandırılan söz konusu bu hücreler bazı araştırmacılar [6] tarafından "Granüllü Metriyal Bez Hücreleri" olarak da tanımlanır. Pre-NK hücrelerinin uterusu göçü ve uNK'lara dönüşümünün, IL-15 tarafından stimüle edildiği ileri sürülmektedir [1].

Erken gebelik döneminde uterus dokusunda en bol bulunan hücre tipi olan uNK hücrelerinin, gerek fenotipik gerekse fonksiyonel açıdan sistemik dolaşımdaki NK'lardan farklı oldukları ve NK1.1, DX5 gibi belirteçleri taşımadıkları bildirilmektedir. Bu hücrelerin implantasyon ve plasantasyon sürecinde trofoblastların uterus arterlerine ulaşmalarını koordine ettiği düşünülmektedir. İnsanlarda olduğu gibi farelerde de uNK hücrelerinin periferik dolaşımdaki NK hücrelerinden farklı reseptörler taşımalarının, söz konusu kritik fonksiyonlarını yerine getirebilmede önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. İnsanlardaki KIR (Killer Inhibitory Receptor) gibi farelerde de Ly49 gen ailesinden gelen reseptörlerin, trofoblastlardaki MHC-I molekülüne bağlanarak bu hücreleri yönlendirdikleri düşünülmektedir [7]. Cerdeira ve ark.'nın [8] insanlarda yapmış oldukları bir çalışmada uNK hücrelerinin CD56⁺ iken CD16⁻ oldukları; bunun yanı sıra CD9 ve CD49a yüzey belirteçlerinin de yine uNK'lar için spesifik olduğu ve periferik kan NK (pNK)

hücrelerinde bulunmadığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar [8], uNK hücrelerinin pNK hücrelerinden fonksiyonel olarak farklı olduklarını ve uNK hücrelerinin sahip oldukları yüzey belirteçleri ile ilişkili olarak sitotoksik yönlerinin olmadığını, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi proangiojenik moleküller salgıladıklarını ve trofoblast invazyonunu düzenlediklerini ileri sürmüşlerdir.

Trofoblastların desidua dokusuna yayılmasını ve yerleşmesini kolaylaştıran uNK hücrelerinin özellikle spiral arterlerin yakınında ve hatta içlerinde yer almaları dikkat çekicidir. uNK hücrelerinin salgılamış olduğu gama interferonun (IFN- γ), uterus dokusundaki spiral arterlerdeki değişimden de sorumlu olduğu ileri sürülürken; mesometriyal bölgedeki spiral arterlerin duvarında, gelişmekte olan fetusun ihtiyaç duyduğu kanın sağlanmasına yönelik meydana gelen incelleme ve dilatasyonların da, uNK hücresi kaynaklı IFN- γ etkisiyle oluştuğu bildirilmektedir [1].

Bu çalışma, gebeliğin farklı dönemlerindeki farelerde, desidua bazalis bölgesinde PAS-pozitif granülleri ile ayırt edilebilen uterus doğal katil (uNK) hücrelerinin dağılımında gebelikle birlikte meydana gelen değişimlerin belirlenmesi ve bundan sonra gerek gebelik immunolojisi ve gerekse gebelik patolojisi konularında yapılacak olan çalışmalara katkı sağlamak amacıyla yapıldı.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Çalışma, T.C. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 31.08.2009 tarih ve 2009/50 sayılı kararı ile alınan Etik Kurul Onayı ile gerçekleştirildi. Çalışmanın materyalini erişkin (12-14 haftalık) dişi fareler oluşturdu. Dişi fareler ve erkek fareler, 1 adet erkek 4 adet dişi fare birlikte olacak şekilde gruplara ayrılarak aynı kafese alındılar. Bir gece boyunca çiftleşmeye bırakılan dişi fareler günlük olarak vajinal tıkaç oluşumu yönünden kontrol edildiler. Vajinal tıkaç oluşan dişi fareler gebeliklerinin 0. gününde kabul edilip ayrı kafeslere aktararak takibe alındılar [9]. Her grupta 6'şar adet olacak şekilde gebe olmayan-kontrol grubu ile gebeliğin birinci, ikinci ve üçüncü haftalarının ortalarına karşılık gelecek şekilde erken, orta ve geç gebelik dönemi (sırasıyla gebeliğin 3., 10. ve 17. günleri) olmak üzere 4 gruba ayrılan fareler, eter ile bayıltıldılar. Ardından servikal dislokasyonla sakrifiye edilen hayvanlardan uterus dokusu örnekleri alındı.

Histolojik İşlemler

Uterus dokusundan alınan parçalar %10'luk tamponlu formal-salin (pH: 7.4) solüsyonunda tespit edildi. Tespit edilen dokular rutin histolojik metotlarla takip edilerek parafinde bloklandı. Bloklardan 6 μ m kalınlığında 36'şar μ m aralıklarla seri kesitler alındı. Bu kesitlerden ilki Crossman'ın üçlü boyama yöntemi [10] ile boyanırken; diğer 3 kesite PAS-pozitif granülleri nedeniyle uNK olarak değerlendirilen

hücrelerin belirlenebilmesi için PAS reaksiyonu uygulandı^[11].

Tüm preparatlar DFC-320 model kamera ataçmanı olan Leica DM-2500 model ışık mikroskobu ile incelendikten sonra gerekli bölgelerin dijital görüntüleri kaydedildi. Üçlü boyama yapılan preparatlarda normal uterus histolojisi değerlendirilirken; PAS reaksiyonunun gerçekleştirildiği kesitlerde ise uNK hücrelerinin sayı ve dağılımı belirlendi.

Hücre Sayımları

PAS-pozitif granül içeren uNK hücrelerinin sayımı amacıyla, aynı hücrenin iki kez sayımından kaçınmak için 36 µm aralıklarla alınan ve PAS reaksiyonu uygulanan 3 seri kesitin 10 farklı bölgesinden toplam 10.000 µm²lik alanda, uNK hücre sayımı gerçekleştirildi.

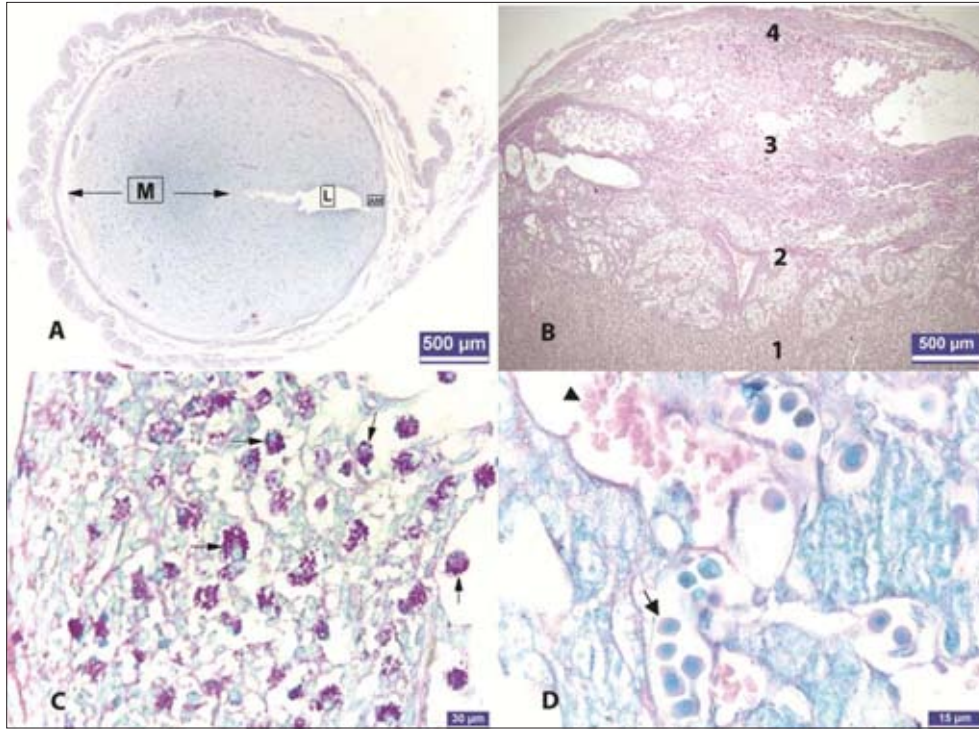
İstatistiksel Analizler

Elde edilen sayısal veriler SPSS 10^[12] programı yardımıyla One-WayAnova testi ve ardından çoklu karşılaştırma testi olan DUNCAN testiyle analiz edilerek grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri belirlendi.

BULGULAR

Histolojik Bulgular

Üçlü boyama ve PAS reaksiyonunun gerçekleştirildiği kesitler üzerinde yapılan incelemeler sonucunda, gebe olmayan farelerin uterus dokusunun normal histolojik yapı düzeninde olduğu görüldü. Gebeliğin 3. günündeki (erken dönem) farelerden elde edilen uterus dokusunda ise implantasyonun şekillendiği mesometriyal tarafta desidualizasyonun başladığı dikkati çekti (*Şekil 1. A*). Gebeliğin ikinci ve üçüncü haftaları içinde desidualizasyonun ilerlemesi ve endometriyumda meydana gelen yapısal değişimlerle birlikte metriyal bölge, desidia bazalis, bağlantı bölgesi ve labirint bölgesi olmak üzere dört farklı bölge ayırt edildi (*Şekil 1. B*). Özellikle metriyal bölge ve desidia bazalis dokusu içerisinde PAS pozitif granülleri ile kolaylıkla ayırt edilebilen uterus doğal katil (uNK) hücrelerinin sayıca arttığı dikkati çekti (*Şekil 1. C*). Desidia bazalis bölgesindeki en yüksek uNK hücre sayısına gebeliğin orta dönemindeki farelerde rastlandı (*Tablo 1, Şekil 3*). Gebeliğin geç döneminde labirint bölgedeki



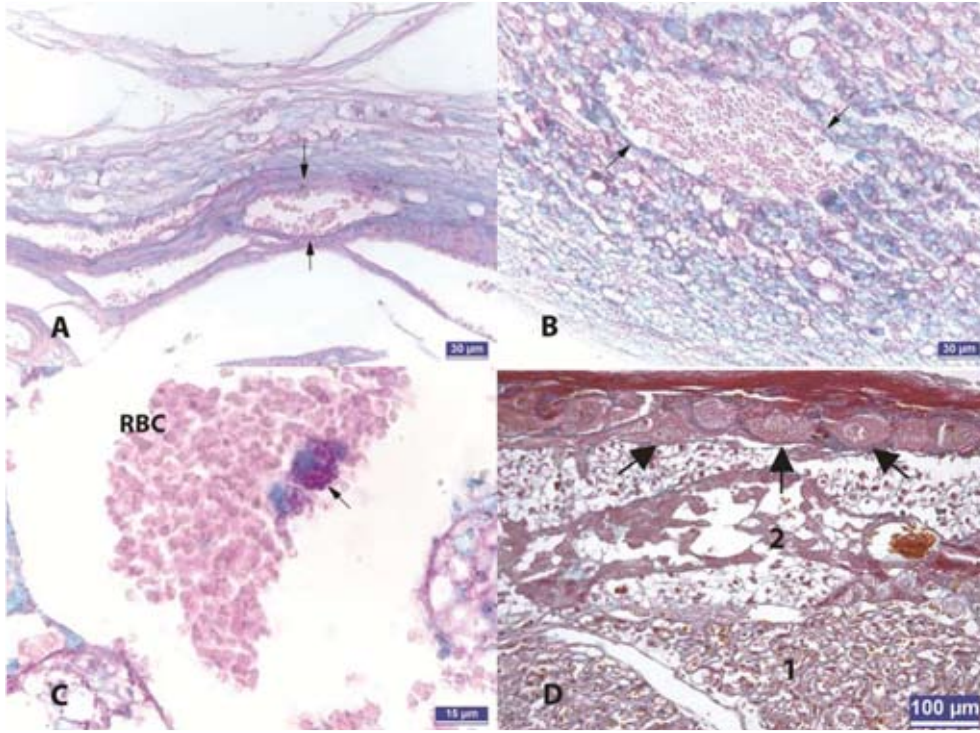
Şekil 1. A- Gebeliğin erken dönemindeki bir fareye ait uterus dokusu kesiti. Üçlü boyama. M: Mesometriyal bölge, L: Uterus lümeni, AM: Anti-mesometriyal bölge, Büyütme çizgisi: 500 µm; B- Gebeliğinin orta dönemindeki bir fareye ait uterus dokusu kesiti. PAS reaksiyonu. 1: Labirint bölgesi, 2: Bağlantı bölgesi, 3: Desidia bazalis, 4: Metriyal bölge. Büyütme çizgisi: 500 µm; C- Gebeliğinin geç dönemindeki bir fareye ait uterus dokusu kesiti. PAS reaksiyonu. Oklar: PAS-pozitif granül içeren uNK hücreleri. Büyütme çizgisi: 30 µm; D- Gebeliğin geç dönemindeki bir farenin uterus dokusu kesiti. PAS reaksiyonu. Ok: Fötal alyuvarlar, Ok başı: Maternal alyuvarlar. Büyütme çizgisi: 15 µm

Fig 1. A- A section from uterus of animal at early gestational period. Triple stain. M: Mesometrial region, L: Lumen, AM: Anti-mesometrial region, Bar: 500 µm; B- A section from uterus of animal at midgestational period. PAS reaction. 1: Labyrinth zone, 2: Junctional zone, 3: Decidua basalis, 4: Metrial region. Bar: 500 µm; C- A section from uterus of animal at late gestational period. PAS reaction. Arrows: uNK cells having PAS positive granules, Bar: 30 µm; D- A section from uterus of animal at late gestational period. PAS reaction. Arrow: Fetal red blood cells, Arrow head: Maternal red blood cells. Bar: 15 µm

Tablo 1. Gebeliğin farklı dönemlerinde endometriyum dokusundaki birim alanda PAS-pozitif granül içeren uNK hücre sayıları (adet/10.000 mm²)
Table 1. The number of uNK cells having PAS-positive granules in endometrium of different gestational stages (number/10.000 mm²)

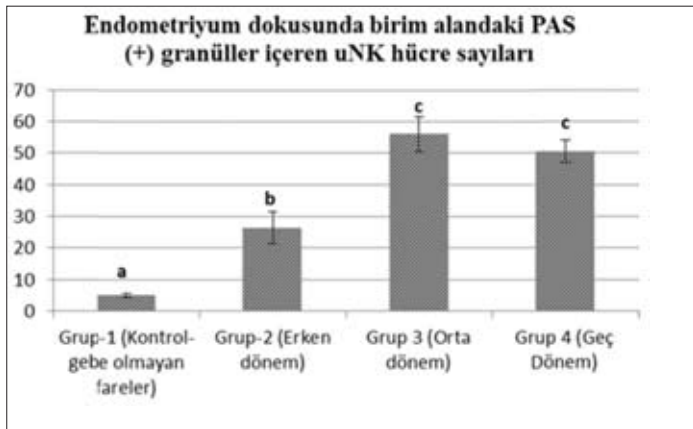
| Gruplar (n=6) | Kontrol (Gebe Olmayan Fareler) | Grup 2 (Erken Dönem) | Grup 3 (Orta Dönem) | Grup 4 (Geç Dönem) |
|---------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| uNK ± SE | 5.00±0.577 ^a | 26.50±5.155 ^b | 56.00±5.549 ^c | 50.66±3.602 ^c |

a-c: Aynı satırda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemlidir, P<0.001



Şekil 2. A- Gebeliğinin orta dönemindeki bir fareye ait uterus dokusu kesiti. PAS reaksiyonu. Oklar: Tunika mediya katmanı, Büyütme çizgisi: 30 µm; B- Gebeliğinin orta dönemindeki bir fareye ait uterus dokusu kesiti. PAS reaksiyonu. Oklar: İncelmış tunika mediya katmanı, Büyütme çizgisi: 30 µm; C- Gebeliğin geç dönemindeki bir fareye ait uterus dokusundaki kan damarı kesiti. PAS reaksiyonu. RBC: Maternal alyuvarlar, Ok: PAS-pozitif granül içeren uNK hücresi. Büyütme çizgisi: 15 µm; D- Gebeliğinin orta dönemindeki bir fareye ait uterus dokusu kesiti. Üçlü boyama. 1: Labirint bölgesi, 2: Bağlantı bölgesi, Oklar: trofoblast dev hücreleri. Büyütme çizgisi: 100 µm

Fig 2. A- A section from uterus of animal at midgestational period. PAS reaction. Arrows: Tunica media layer, Bar: 30 µm; B- A section from uterus of animal at midgestational period. PAS reaction. Arrows: Thinner tunica media layer, Bar: 30 µm; C- A section from blood vessel in uterus of animal at late gestational period. PAS reaction. RBC: Maternal red blood cells, Arrow: uNK cell having PAS positive granules, Bar: 15 µm; D- A section from uterus of animal at midgestational period. Triple stain. 1: Labyrinth zone, 2: Junctional zone, Arrows: Trophoblast giant cells. Bar: 100 µm



Şekil 3. Gebeliğin farklı dönemlerinde endometriyum dokusunda birim alanda PAS-pozitif granül içeren uNK hücre sayıları (adet/10.000 mm²)

Fig 3. The number of uNK cells having PAS-positive granules in endometrium of different gestational stages (number/10.000 mm²)

kan aralıklarında yer alan fetal ve maternal alyuvarların yakın ilişkisi dikkati çekerken (Şekil 1. D); gebeliğin orta döneminden itibaren anti-mesometriyal bölgedeki kan damarlarına göre mesometriyal bölümde yer alan damarların genişlediği ve tunika mediya katmanlarının oldukça incelmış olduğu tespit edildi (Şekil 2. A,B). Desidua bazalis bölgesindeki maternal kan damarlarının içerisinde de uNK hücrelerinin varlığı göze çarptı (Şekil 2. C). Desidua bazalis ve bağlantı bölgesi arasında yer alan trofoblast dev hücrelerinin gebeliğin orta döneminde arttığı dikkati çekerken (Şekil 2. D); gebe olmayan farelerin endometriyum dokusunda ise son derece az sayıda uNK hücrelerine rastlandı.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Uterus doğal katil hücreleri (uterine natural killer-uNK) desidualizasyon sürecinde endometriyum ve damarların yeniden yapılanmasında rol alan en belirgin hücre grubudur. Özellikle insanlardaki hemo-koryal ve kemiricilerdeki hemo-endotelial plasenta gibi invaziv plasenta tiplerinde gebeliğin orta döneminde desidua bazalis bölgesinde sayılarının oldukça arttığı bildirilmektedir [2,9]. Perifer kan doğal katil hücrelerinden farklı reseptörler taşıyan ve implantasyonun başlangıcında sekonder lenfoid organlardan uterusu göç eden bu hücrelerin öncüllerinin, özellikle farelerde gebeliğin 6. gününde desidua bazalis bölgesinde spiral arterlerin çevresinde yerleşmeye başladıkları ileri sürülmektedir [13].

Sıçanlarda implantasyonun ilk üç gününde desidual alanda belirgin bir biçimde artan $CD_{56}^{+}CD_{16}^{-}$ uNK hücrelerinin aktivitesi tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olsa da diğer NK'lar gibi tümöral hücrelere saldırdıkları, ancak tümör hücrelerini andırır biçimde yayılan trofoblastlara karşı daha toleranslı davrandıkları tespit edilmiştir. Zaman zaman artan IL-2 seviyesine paralel olarak aktivitelerini artıran bu hücrelerin, bir yandan trofoblastların uterus mukozası içerisinde ilerlemesini yönlendirirken, bir yandan da onların aşırı çoğalmalarını kontrol ettikleri düşünülmektedir [14].

uNK hücrelerinin implantasyon süreciyle birlikte farklılaşarak etkinleştikleri ileri sürülmektedir. Koç ve Kanter'in [15] gebe sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada alfa naftil aseat esteraz (ANAE) pozitivitesi gösteren ve uterus doğal katil hücreleri (uNK) oldukları iddia edilen hücrelerin implantasyonun ikinci gününden itibaren arttığı ve 6. günde en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmektedir. Kokubu ve ark.'nın [16] yaptıkları bir başka çalışmada ise gebeliğin üçüncü gününde ovariyektomi yapıldıktan sonra düşük dozda progesteron hormonu verilerek implantasyonu geciktirilen farelerde PAS pozitif granüllere sahip uNK hücrelerinin kontrol grubu farelerdeki hücrelere kıyasla daha küçük oldukları ve farklılaşmalarının geciktiği tespit edilmiştir.

uNK hücrelerinin hiç çiftleştirilmemiş, gebe ve post-partum dönemlerde uterus endometriyumundaki sayıla-

rında da farklılıklar söz konusudur. Delgado ve ark.'nın [17] farelerde yaptıkları bir çalışmada hiç çiftleştirilmemiş ve post-partum dönemdeki fare endometriyumlarında uNK hücrelerine rastlanmazken, gebe farelerde dönemsel farklılıklar olsa da desidua dokusunda PAS pozitif granüllere sahip çok sayıda uNK hücrelerinin varlığından söz edilmektedir. Araştırmacılar [17] özellikle post-partum dönemde uNK hücre sayılarındaki ani düşüşlerin nedeninin, gebeliğin sonlanması ile birlikte uNK hücrelerinde hızlanan apoptozis süreci ve plasental ayrılma olduğunu ileri sürmektedirler.

uNK hücrelerinin implantasyon ve plasentasyon sürecinde trofoblastların desidua dokusuna yayılmasını ve yerleşmesini kontrol ederken, uterus arterlerine ulaşmalarını da koordine ettiği bildirilmektedir. IFN- γ ve Vasküler Endotelial Gelişme Faktörü (VEGF) gibi bir takım sitokinler salgılayan bu hücrelerin özellikle spiral arterlerin yakınında ve hatta içlerinde yer alması oldukça dikkat çekicidir. Zira söz konusu sitokinlerin, gelişmekte olan yavrunun ihtiyaç duyduğu oksijen ve besin maddelerinin geçişini maksimum seviyede temin edecek olan damarsal değişimlere olanak sağladığı bildirilmektedir [1,18]. Yapılan deneysel çalışmalar, farelerde bu hücrelerin olmaması ya da yetersizliği durumunda uterus arteriollerinde arteriosklerozis, hipertansiyon ve bu patolojik değişimlere bağlı olarak fetal ölümlerin şekillendiğini ortaya koymuştur [19].

İnsanlarda ve rodentlerde uNK hücrelerinin gelişiminde IL-15'in rolünün önemli olduğu ileri sürülmektedir. Özellikle desidual spiral arterleri çevreleyen perivasküler hücreler ile gebeliğin erken dönemlerinde söz konusu arterlerin endotel hücrelerinde eksprese edilen IL-15 molekülünün implantasyon bölgesindeki yetersizliğinin uNK hücrelerinin bölgesel göçünde ve maturasyonunda aksamalara neden olduğu bildirilmektedir. Ashkar ve ark.'nın [18] farelerde yaptıkları bir çalışmada, IL-15 sentezi yapamayan IL15 $^{-/-}$ farelerin implantasyon bölgesinde uNK hücrelerinin bulunmadığı ve buna bağlı olarak da bu farelerde spiral arter modifikasyonunda yetersizlik, desidua gelişiminde gerilik gibi gebeliğin devamını ve sağlıklı bir doğum sürecini olumsuz etkileyecek problemlerin gözlemlendiği bildirilmiştir.

Wang ve ark.'nın [5] farelerde PAS reaksiyonunun yanı sıra vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve vasküler hücre adezyon molekülünü (VCAM-1) immünohistokimyasal yöntemlerle gösterdikleri bir çalışmada, uNK hücrelerinin implantasyonun 12-14. günlerinde en yüksek sayıya ulaştıkları, total vasküler alanın da 13. günde en yüksek değerde olduğu bildirilmektedir. Araştırmacılar [5], içerdikleri PAS pozitif granüllerle kolayca ayırt edilebilen uNK hücrelerinin çoğunlukla damarların yakınında bulduklarını ve söz konusu bu hücrelerin yüksek oranda VEGF eksprese ettiklerini de ileri sürmüşlerdir. Bu bulgularla uyumlu olarak gebe olmayan hayvanların endometriyal damarlarının endotel hücrelerinde tespit edilemeyen ve dolaşımdaki hücrelerin damar dışına çıkabilmeleri için

gerekli olan VCAM-1 immünoreaktivitesinin gebe hayvanlardaki pozitivitesi ise söz konusu çalışmanın ^[5] önemli bir diğer bulgusu olarak sunulmaktadır.

Başarılı bir gebelik için spiral arter modifikasyonunun son derece önemli olduğu ileri sürülmektedir. Spiral arterlerdeki söz konusu yeniden yapılanma sürecinde meydana gelebilecek aksaklıkların ise erken doğum, pre-eklampsi ve fetal gelişim geriliği gibi bir çok gebelik komplikasyonuna yol açabileceği tespit edilmiştir. Robson ve ark.'nın ^[20] insan plasentalarından elde ettikleri uNK hücreleri, damar düz kas hücreleri ve ekstra villöz trofoblast hücrelerini kültüre ederek yaptıkları çalışmada, salgıladıkları bir takım anjiyopoyetik faktörler aracılığıyla uNK hücrelerinin özellikle gebeliğin erken dönemindeki spiral arter düz kas hücreleri üzerinde etkili oldukları ortaya konulmuştur. Araştırmacılar ^[20], bu modifikasyonun aksaması durumunda yukarıda bahsedilen gebelik komplikasyonlarının kaçınılmaz olduğunu ileri sürerek uNK hücrelerinin klinik önemine vurgu yapmışlardır. Wilkens ve ark. ^[21] da uNK hücrelerinin spiral arterler üzerindeki etkilerinin sadece gebelik sürecinde plasantasyonun şekillenmesi ve desidualizasyon aşamasında değil, aynı zamanda gebe olmayan siklik endometriyum dokusunda homeostasisin sağlanmasında da rol aldığını ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar ^[21], gebe olmayan endometriyum dokusunda yaptıkları bir çalışmada, şiddetli endometriyal kanamaların kontrolünde kullanılan ve bir progesteron reseptör modülatörü olan asoprisnil'in, insan endometriyum dokusundaki stromal hücrelerde yer alan progesteron reseptör seviyesini azalttığını; buna bağlı olarak IL-15 seviyesinin ve dolayısıyla uNK hücre sayılarının azaldığını belirlemişlerdir. Çalışmanın sonunda, uNK hücrelerinin varlığında meydana gelen spiral arter duvarlarındaki incelmelerin asoprisnil kullanılan gruplarda şekillenmediğini tespit eden araştırmacılar ^[21], söz konusu ilacın etki mekanizmasını da progesteron/IL-15/uNK etkileşimi ile başlayan ve spiral arter modifikasyonu ile tamamlanan yolaktaki aksamalarla açıklamışlardır.

Sitotoksik özelliğe sahip perifer kan NK hücrelerinin çoğu CD16, immün sistemi düzenleyici sitokinler sentezleyen uNK hücrelerinin çoğu ise CD56 pozitifdir ^[8,13]. uNK hücrelerinin söz konusu moleküllerin immünohistokimyasal ya da flow-sitometrik yöntemlerle demonstrasyonları mümkün olmakla birlikte periyodik asit schiff (PAS) reaksiyonu da zaman zaman tercih edilen basit ve pratik bir metot olarak karşımıza çıkmaktadır ^[9,13,18,22]. Yadi ve ark. ^[2] da farelerde periferik NK hücrelerinde bulunmayan ancak uNK hücrelerinde bulunan N-asetil D-galaktozamin içeren glikokonjugatların gösterilmesinde kullanılan *Dolichus biflores* agglutinininin (DBA) demonstrasyonu ile PAS reaksiyonunu seri kesitlerde uygulamışlar ve PAS reaksiyonunun da uNK hücrelerinin tanınmasında alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmada da uNK hücrelerinin 20-30 µm çapında hücreler oldukları ve PAS ile pozitif reaksiyon veren iri

granülleri ile ışık mikroskopik düzeyde pratik olarak tanımladıkları tespit edildi (*Şekil 1. C; Şekil 2. C*). Gebe olmayan farelerin endometriyum dokusunda son derece az sayıda oldukları tespit edilen uNK hücrelerinin, gebelikle birlikte özellikle desidua bazalis bölgesinde sayılarının ileri derecede arttığı, gebeliğin orta döneminde ise en yüksek seviyelerine ulaştıkları gözlemlendi (*Tablo 1; Şekil 3*). Gebeliğin son dönemlerinde labirint bölgedeki kan aralıklarında fetal ve maternal alyuvarların yakın ilişkisi dikkati çekerken yine bu dönemde sayıca azalan uNK hücrelerine desidua bazalis bölgesinde yer alan spiral arterlerin yakınında ve hatta lümenlerinde de rastlandı (*Şekil 2. C*). Özellikle mesometriyal bölgede yer alan maternal kan damarlarının, anti-mesometriyal bölgedeki kan damarlarına nazaran genişlediği ve tunika mediya katmanlarının belirgin bir biçimde incelmeye uğradığı gözlemlendi (*Şekil 2. A,B*). Desidua bazalis ve bağlantı bölgesi arasında özellikle gebeliğin orta döneminde yan yana sıralanmış oldukça iri trofoblast dev hücreleri dikkati çekti (*Şekil 2. D*). Bu bulgular, daha önce yapılan ve uNK hücrelerinin desidualizasyon sürecinde sayıları artan ve damarların yeniden yapılanmasında rol alan hücreler olduklarını ileri süren çalışmaları ^[1,23,24] destekler niteliktedir.

Sonuç olarak başarılı bir gebelik için gerekli olan uNK hücrelerinin, gerek etik gerekse ekonomik açıdan insanlardan ve diğer memeli hayvanlardan elde edilmesi son derece sınırlı olan sağlıklı gebe uterus dokusundaki yerleşimlerinin ve fonksiyonlarının anlaşılması, insanlarda ve hayvanlarda gebelik patolojisi ile birlikte diğer gebelik komplikasyonlarının etiolojisinin ortaya konması ve tedavi prosedürlerinin geliştirilmesinde önemli yararlar sağlayacaktır. Ayrıca bu hücrelerin, uterusun lokal savunmasında görev alan diğer hücrelerle olan etkileşimlerinin de değerlendirildiği daha kapsamlı çalışmaların planlanmasının, sebebi bilinmeyen infertilite olgularının bir çoğunun sorumlusu olarak kabul edilen maternal tolerans yetmezliği ya da başka bir ifadeyle gebeliğin maternal kabulünde yaşanan problemlerin aydınlatılmasına da katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Herington JL, Bany BM: Effect of the conceptus on uterine natural killer cell numbers and functioning the mouse uterus during decidualization. *Biol Reprod*, 76, 579-588, 2007. DOI: 10.1095/biolreprod.106.056630
2. Yadi H, Burke S, Madeja Z, Hemberger M, Moffett A, Colucci F: Unique receptor repertoire in mouse uterine NK cells. *J Immunol*, 181, 6140-6147, 2008. DOI: 10.4049/jimmunol.181.9.6140
3. Kiso Y, McBey BA, Maso L, Croy BA: Histological assesment of mouse uterus from birth to puberty for the appearance of LGL-1+ natural killer cells. *Biol Reprod*, 47, 227-232, 1992.
4. Croy BA, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C: Uterine natural killer cells: A specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol Rev*, 214, 161-185, 2006. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00447.x
5. Wang C, Tanaka T, Nakamura H, Umesaki N, Hirai K, Ishiko O, Ogita S, Kaneda K: Granulated metrial gland cells in the murine uterus: Localization, kinetics, and the functional role in angiogenesis during

- pregnancy. *Microsc Res Tech*, 60, 420-429, 2003. DOI: 10.1002/jemt.10280
- 6. Kusakabe K, Okada T, Sasaki F, Kiso Y:** Cell death of uterine natural killer cells in murine placenta during placentation and preterm periods. *J Vet Med Sci*, 61, 1093-1010, 1999. DOI: 10.1292/jvms.61.1093
- 7. Colucci F, Boulenouar S, Kieckbusch J, Moffet A:** How does variability of immune system genes affect placentation? *Placenta*, 32, 539-545, 2011. DOI: 10.1016/j.placenta.2011.05.001
- 8. Cerdeira AS, Rajakumar A, Royle CM, Lo A, Husain Z, Thadhani RI, Sukhatme VP, Karumanchi SA, Kopcow HD:** Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J Immunol*, 190, 3939-3948, 2013. DOI: 10.4049/jimmunol.1202582
- 9. Xie X, He H, Colonna M, Seya T, Takai T, Croy BA:** Pathways participating in activation of mouse uterine natural killer cells during pregnancy. *Biol Reprod*, 73, 510-518, 2005. DOI: 10.1095/biolreprod.104.033951
- 10. Culling, CFA, Allison RT, Barr WT:** Cellular Pathology Technique, Butterworths and Co Ltd, London, 1985.
- 11. Cook HC:** Carbonhydrates. In, Bancroft JD, Stewens A (Eds): The Theory and Practice of Histological Techniques. 3rd ed., 143-153, The Bath Press, Avon, 1990.
- 12. SPSS.** SPSS 10.0 for Windows. SPSS Inc., Chicago, IL. 1999.
- 13. Sheikhi A, Ganji HB, Sheikhi R:** Positional relationship between natural killer cells and distribution of sympathetic nerves in decidualized mouse uterus. *Iran J Immunol*, 4 (2): 79-84, 2007.
- 14. Bulla R, Bossi F, Radillo O, De Seta F, Tedesco F:** Placental trophoblast and endothelial cells as target of maternal immune response. *Autoimmunity*, 36, 11-18, 2003. DOI: 10.1080/0891693031000067331
- 15. Koç A, Kanter M:** Sıçanlarda implantasyonda endometriyum dokusunun hücrel ve sıvısal savunma sistemi hücreleri üzerinde histokimyasal ve histometrik araştırmalar. I.Hücrel savunma sistemi hücreleri. *YY Üniv Sağlık Bil Derg*, 6 (1-2): 122-130, 2000.
- 16. Kokubu K, Hondo E, Namba Y, Kusakabe K, Sagara E, Kisi Y:** Ultrastructural study of uterine natural killer cells found in pregnant, interleukin-2 receptor β -chain overexpressed transgenic mice. *J Reprod Develop*, 51, 695-698, 2005. DOI: 10.1262/jrd.17041
- 17. Delgado SR, McBey BA, Yamashiro S, Fujita J, Kiso Y, Croy BA:** Accounting for peripartum loss of granulated metrial gland cells, a natural killer cell population, from the pregnant mouse uterus. *J Leukoc Biol*, 59, 262-269, 1996.
- 18. Ashkar A, Black GP, Wei Q, He H, Liang L, Head JR and Croy BA:** Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. *J Immunol*, 171, 2937-2944, 2003. DOI: 10.4049/jimmunol.171.6.2937
- 19. Guimond MJ, Luross JA, Wang B, Terhorst C, Danial S, Croy BA:** Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol Reprod*, 56, 169-179, 1997. DOI: 10.1095/biolreprod56.1.169
- 20. Robson A, Harris LK, Innes BA, Lash GE, Aljunaidy MM, Aplin JD, Baker PN, Robson SC, Bulmer JN:** Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *FASEB J*, 26, 4876-4885, 2012. DOI: 10.1096/fj.12-210310
- 21. Wilkens J, Male V, Ghazal P, Forster T, Gibson DA, Williams ARW, Brito-Mutunayagam SL, Craigon M, Lourenco P, Cameron IT, Chwalisz K, Moffett A and Critchley HOD:** Bleeding in women and are suppressed by uterine NK cells regulate endometrial the progesterone receptor modulator asoprisnil. *J Immunol*, 191 (5): 2226-2235, 2013.
- 22. Furukawa S, Hayashi S, Usuda K, Abe M, Ogawa I:** The impairment of metrial gland development in tamoxifen exposed rats. *Exp Toxicol Pathol*, 64, 121-126, 2012. DOI: 10.1016/j.etp.2010.07.004
- 23. Zhang J, Chen Z, Smith GN, Croy BA:** Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth. *Cell Mol Immunol*, 8, 1-11, 2010. DOI: 10.1038/cmi.2010.38
- 24. Furukawa S, Hayashi S, Usuda K, Abe M, Hagio S, Ogawa I:** Effect of cisplatin on rat placenta development. *Exp Toxicol Pathol*, 65, 211-217, 2013. DOI: 10.1016/j.etp.2011.08.008