

**T.C. MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
MALTEPE TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANA BİLİM DALI**

**İNSAN TERM FETAL MEMBRANLARIN FARKLI ALANLARINDA
KASPAZ 3 İLE APOPTOZİSİN TESPİT VE DAĞILIMI, BU
DAĞILIMIN FETAL DOĞUM AĞIRLIĞI İLE KORELASYONU**

UZMANLIK TEZİ

DR. ARZU KARAMAN YEŞİLDAĞ

TEZ DANIŞMANI

YRD.DOÇ.DR. AYGEM ÇELİK

İSTANBUL

EKİM 2011

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim süresince sahip olduğu bilgi birikimi ve görüşlerini paylaşan, başta Ana Bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ümit Özekici olmak üzere Hocalarım Prof. Dr. Hayriye Serpil Bozkurt'a, Prof. Dr. Moşe Benhabib'e, Doç. Dr. Berna Haliloğlu'na, Yrd.Doç.Dr. Erdin İlter'e, Yrd. Doç. Dr. Tonguç Gündüz'e;

Bu tezin yazım aşamasında beni yalnız bırakmayıp, desteğini esirgemeyen tez danışmanı Hocam Yrd. Doç. Dr. Aygen Çelik'e;

Kaspaz 3 ile apoptozisin saptanmasında her türlü desteği sağlayan Maltepe Üniversitesi Patoloji Ana Bilim Dalı'ndan Doç. Dr. Ahmet Midi, Yrd. Doç. Dr. Arzu Neşe Yener'e ve Patoloji Teknisyeni Dilek Özkan'a;

Plasenta konusunda bilgi birikimini benimle paylaşan, tez süresince yanımda olan Dr.Elif Ünlügedik'e;

İstatistiksel verilerin değerlendirilmesinde tüm yardımlarını sunan Maltepe Üniversitesi Halk Sağlığı Ana Bilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Turhan Şalva'ya ve Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Ahmet Balıkçı'ya;

5 yıl boyunca aynı çalışma ortamını paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma, servis ve ameliyathane hemşire, ebe ve personelimize;

Eğitim hayatım boyunca her zaman bana destek olan başta annem Melek Karaman olmak üzere tüm sevgili aileme ve varlığı ile bana güç veren Eşim Umut Deniz ile Kızım Özgür Deniz'e;

TEŞEKKÜRÜ BİR BORÇ BİLİRİM...

KISALTMALAR

PPROM: Preterm prematür membran rüptürü

LBW : Düşük doğum ağırlığı

VLBW: Çok düşük doğum ağırlığı

İUGR: İntra Uterin gelişme geriliği

CMV: Cytomegalovirüs

HSV: Herpes Simpleks Virüs

HIV : Human immundeficiency Virüs

CASPASE: Cysteine Aspartate Specific ProteASEs

APAF-1 : Apapitoz aktive edici faktör-1

MMP : Matriks Metallo-Proteinaz

NSYV : Normal Spontan Vaginal Yolla Doğum

C/S : Sezaryen

E Bölgesi: Membran rüptür alanı

D Bölgesi: Membran rüptür alanının distalinde, plasentaya 2 cm yakınlıkta olan alan

TUNEL: Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı floresan-dUTP işaretleme

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

KISALTMALAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. GİRİŞ VE AMAÇ1

2. GENEL BİLGİLER3

2.1. FETAL BÜYÜME.....3

2.1.1. FETAL BÜYÜMEYE VE GELİŞMEYE ETKİ EDEN MATERNAL
FAKTÖRLER.....5

2.1.1.a. Maternal Yaş

2.1.1.b. Maternal Kilo

2.1.1.c. Maternal Beslenme

2.1.1.d. Maternal Kötü Alışkanlıklar

2.1.1.e. Maternal İlaç Kullanımı

2.1.1.f. Maternal Stres ve Anksiyete

2.1.1.g. Maternal Perinatal Enfeksiyonlar

2.1.1.h. Maternal Hastalıklar

2.1.1.i. Maternal Travma

2.1.1.i. Maternal Egzersiz	
2.1.2. FETAL BÜYÜMEYE VE GELİŞMEYE ETKİ EDEN ÇEVRESEL ETKENLER.....	7
2.1.2.a. Hava Kirliliği	
2.1.2.b. Su Kirliliği	
2.1.2.c. Gürültü Kirliliği	
2.1.2.d. Manyetik Kirlilik	
2.1.2.e. Kimyasal Kirlilik	
2.1.3. FETAL BÜYÜMEYE VE GELİŞMEYE ETKİ EDEN PLASENTAL FAKTÖRLER.....	9
2.1.3.a. Plasentanın Morfolojik Bozuklukları	
2.1.3.b. Plasentanın Enfeksiyonları	
2.1.3.c. Plasentanın Yapışma Bozuklukları	
2.1.4. FETAL BÜYÜMEYE VE GELİŞMEYE ETKİ EDEN UTERİN FAKTÖRLER.....	10
2.1.5. FETAL BÜYÜMEYE VE GELİŞMEYE ETKİ EDEN KROMOZOMAL FAKTÖRLER.....	10
2.2. APOPTOZİS VE KASPAZ SİSTEMİ.....	11

3. GEREÇ ve YÖNTEM	16
4. BULGULAR	18
5. TARTIŞMA	26
6. SONUÇ	31
7. ÖZET	32
8. SUMMARY	34
9. KAYNAKLAR	36

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Fetoplantal fizyoloji incelemeleri, teknolojik gelişmelerle erken ve geç perinatal dönemde fetusun büyüme ve gelişme süreçlerine etki eden faktörlere aydınlık getirmektedir. Fetusun büyüme ve gelişmesi, fetal doğum ağırlığı perinatal morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. Bu yüzden birçok bilimsel çalışmada fetal ağırlığa etki eden mekanizmalar araştırılmıştır. Anormal maternal, plasental veya fetal durumlar ile karşılaşan fetusun büyümesi etkilenebilir ve İUGG (intrauterin gelişme geriliği) gelişebilir. Biz fetal büyümeye etkili kompartmanlardan, fetal transfere karşı bir bariyer olarak tanımlanan fetal membranları ele aldık. Membranların bütünlüğü ve uygun zamanda fizyolojik rüptürü ile matürasyon ve fetal ağırlık artışı direkt ilişkilidir. Fetal membranların miadından önce olan rüptürü, fetusun matürasyonunu büyümesini ve gelişmesini etkileyecektir. Birleşen amniyon ve koryon (fetal membranlar) miadında doğum öncesinde veya doğum sırasında yırtılır. Erken membran rüptürü ve miadında olan membran rüptürü mekanizmaları birçok çalışmayla araştırılmaktadır. Çünkü PPRM (preterm prematür membran rüptürü) perinatal mortalite ve morbiditenin en önemli nedenidir (1).

Geç gestasyon sırasında zayıflayan membrana, bir dizi biyokimyasal ve fiziksel olayların katkıda bulunduğu düşünülmektedir (2). Bu faktörler özellikle supraservikal alanda aktif olabilir, çünkü önceki araştırmacılar serviksin üzerinde yer alan fetal membranların benzersiz histolojik özelliklere sahip olduğunu bulmuştur (6,3).

Apoptoz sürecinin fetal membran rüptürü mekanizmasında önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. İnsan amniyon ve koryonunda apoptozisin miada yakın olduğu düşünülmektedir (4). Apoptozis, organizma tarafından düzenlenen enerji bağımlı hücre ölümüdür. Programlı hücre ölümü olan bu süreç fetal gelişim ve erişkin dokulardaki pek çok

fizyolojik olayda önemli role sahiptir. Kaspazlar, apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan multigen ailesinden oluşan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kaspaz adı verilen intrasellüler proteazların; apoptozisin gerek direkt, gerekse indirekt morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerinden sorumlu olduğu ortaya konulmuştur. Apoptozis; hem morfolojik değerlendirme ile hem de aktif kaspaz-3 tayininin immunhistokimyasal yöntemle moleküler düzeyde belirlenmesi ile saptanabilmektedir (5). Serviksin üzerindeki fetal membranlarındaki azalmış gerilme kuvveti daha önce yapılan araştırmalarda tanımlanmıştır (6, 2). Bir çalışmada supraservikal fetal membranların zayıflığının, kollajen remodelling ve apoptoz ile uyumlu biyokimyasal, histolojik özellikler ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (7).

Bizim çalışmamızın amacı ,miad gebelikte oluşan apoptotik değişikliklerin, kaspaz 3 kaskadıyla tespiti, farklı alanlarda apoptozisin farklı şekilde eksprese olup olmadığının belirlenmesi ve kaspaz 3 ile saptanan apoptozis oranlarının yenidoğan kilosuna olan etkisini belirlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. FETAL BÜYÜME

Perinatal mortalitenin en sık nedenlerinden biri olan IUGG bir halk sağlığı sorunudur ve tanısı gerekli önlemlerin alınması açısından önemlidir. Yenidoğan ağırlığının morbidite ve mortalite ile direk ilişkisi bilindiğinden birçok araştırmacı, çeşitli faktörlerin doğum ağırlığıyla nasıl bir ilişkide olduğunu araştırmıştır. Dünyada artan bir sıklıkla görülen erken doğum eylemi, düşük doğum ağırlıklı bebeklerin doğumuna sebep olan faktörlerden ilk sırada yer alır.

Normal gebelik (gestasyon) süresi 40 haftadır ve 38 ile 42 hafta arasında değişebilir. Miadında doğan yenidoğanlar, bu süreyi tamamlayarak dünyaya gelmiş olan bebeklerdir. 37 gebelik haftasından erken doğan bebekler prematüre bebek olarak adlandırılır. Doğumuyla beraber sorunları da beraber getiren bu bebekleri erken doğuma iten sebeplerin bir bölümü birçok araştırmaya rağmen çözülememiştir. Riskli gebeliklerin belirlenmesi risk faktörlerinin belirlenmesi açısından önemlidir (8, 9, 10). Bu risk faktörleri; maternal (nulliparite, kısa boy, zayıflık, ırksal, yaş, sosyoekonomik düzey, eğitim, gebelikte kilo artışı, preeklampsi, kronik hastalık öyküsü, zararlı madde ve ilaç kullanımı, v.b.) , fetal (kromozom anomalileri ve dismorfik sendromlar, konjenital enfeksiyonlar, cinsiyet, çoğul gebelik, v.b.) , obstetrik (plasenta ile ilgili faktörler, fetal membran ile ilgili nedenler, kordon anomalileri, uterus anomalileri, v.b.) olarak sınıflandırılabilir.

Belirlenen risk faktörleri bilinmesine rağmen düşük doğum ağırlığı ile sonuçlanabilen erken doğum eylemini tümüyle önleyecek bir tedavi henüz bulunamamıştır.

İUGG insidansı, coğrafi bölgeye, yaşanan popülasyona ve kullanılan büyüme eğrisi tablolarına göre değişmektedir. Maternal yaş, ırk, sosyal statü, deniz seviyesinden yüksekte yaşama, fetal cinsiyet, parite gibi birçok non-patojen faktör insidansı etkilemektedir. Örneğin;

(11)

*<18 yaş veya >35 yaşta olan annenin bebekleri düşük doğum ağırlıklı olarak doğarlar.

*Erkek bebekler kız bebeklere göre daha düşük doğum ağırlığı ile doğarlar.

*Deniz seviyesinden yüksekte yaşayanlarda düşük oksijen basıncı nedeniyle doğum kilosu daha küçüktür.

*Asyalılarda doğum kilosu daha düşüktür.

*Sosyokültürel seviye düştükçe yetersiz beslenme ile açıklanamayan bir düşük doğum ağırlığı vardır.

*Doğum kilosu ilk doğan bebeklerde ve grandmultiparlarda daha düşük olma eğilimindedir.

Fetal gelişme geriliği kavramı, gebelikte fetus üzerine etkileri açısından ilgi çeken bir konudur. Bu etkilerin sonuçları, etkinin görüldüğü dönem, etkene maruz kalma süresi ve dozu ile değişebilmektedir (12). Fetal büyüme genetik, fetusa olan kan akımı ve bu yolla sağlanan besinler, çevresel, maternal ve plasental faktörler gibi birçok faktörün etkisi altındadır (13).

2.1.1. FETAL BÜYÜMEYE ETKİ EDEN MATERNAL FAKTÖRLER

Gebelikte fetal büyüme etki eden maternal yaş, beslenme, obezite ve stres gibi faktörlerin fetal büyüme bilinen negatif etkilerinin yanısıra, düşük doğum ağırlığı, intrauterin gelişme geriliği, spontan abortus ve fetal mortalite ile olan ilişkileri de bildirilmiştir. Ayrıca maternal faktörler yarı damak ve dudak, nöral tüp defekti, üriner sistem defektleri, kardiovasküler sistem, santral sinir sistemi, solunum sistemi gibi değişik doğum defektleriyle ilişkili bulunmuştur (14).

2.1.1.a. Maternal Yaş

Adölesan gebeliklerde (19 yaş ve altı) düşük doğum ağırlığı (LBW), çok düşük doğum ağırlığı (VLBW), intrauterin gelişme geriliği (IUGR), erken preterm eylem, anemi, riskleri artarken, ileri yaştaki (35 yaş ve üzeri) gebeliklerde ise LBW, 4000 gr üzeri bebek, ölü doğum hızı ve perinatal mortalitede artış vardır (15, 16).

2.1.1.b. Maternal Kilo

Annenin gebelik öncesi ağırlığının 50 kg'ın altında olmasının IUGG ile belirgin olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir. (17, 18, 19, 20, 21) Vücut kitle indeksi <25 olan gebelerin çocukları, kilolu gebelerin çocuklarından daha az kiloda doğar (22).

Gebelik öncesi ağırlığın yanında, gebelik sırasında kazanılan kilonun da doğum ağırlığını etkileyen en önemli faktörlerden biri olduğu ortaya çıkmıştır. Hatta gebelik sırasında kazanılan ağırlık artımının daha da önemli olduğunu bildiren yayınlar vardır (18, 23, 20, 21).

2.1.1.c. Maternal Beslenme

Açlık, fazla fiziksel aktivite ve psikososyal stresin preterm doğum ve LBW'ye neden olabileceğini bilinmektedir (24). Folik asit eksikliğinin nöral tüp defektine yol açacağı çalışmalarda belirtilmektedir (15). Fe eksikliği sadece Fe metabolizmasını etkilemekle birlikte, fetal büyüme ve gelişmeyi düzenleyen plasental sitokinleri de etkiler (25).

2.1.1.d. Maternal Kötü Alışkanlıklar

Sigara içen ve pasif içici olan gebelerin bebeklerinde erken doğum ve LBW ilişkisi bildirilmektedir (26, 27, 28).

Konsepsiyondan önce ve gebelikte alkol alan anne fetuslarının gelişimsel olarak etkileneceği ve ağırlıklarının az olacağı belirtilmektedir (29).

Kafein, kokain, opiat (morfin ve kodein) gibi maddeler gebelikte kullanıldıkları zaman fetusta İUGR, erken doğum, küçük baş çevresi, fetal ölüm ve çoğul gebelik gibi sorunlara yol açmaktadırlar (30).

2.1.1.e. Maternal İlaç Kullanımı

Gebelikte kullanılan bazı ilaçlar (kemoterapötikler, steroidler, antikonvülzanlar, Dietilsitilbestrol maruziyeti) fetal gelişim de bozukluklar yapabilir.

2.1.1.f. Maternal Stres ve Anksiyete

Maternal stres ve sosyoekonomik faktörler fetal gelişimi olumsuz etkileyerek erken doğuma neden olmakta ve fetal malformasyon oranını artırarak düşük doğum kilolu bebek doğumuna sebep olmaktadır (31, 32, 33, 34).

2.1.1.g. Maternal Perinatal Enfeksiyonlar

Rubella, Cytomegalovirüs (CMV), Herpes Simplex Virüs (HSV), Varicella Zoster, Parvovirüs B19, Hepatitler, Human immundeficiency Virüs (HIV), Toxoplazma, Sifiliz, Listeria, enfeksiyonları fetal büyüme ve gelişmeye olumsuz etkilidir.

2.1.1.h. Maternal Hastalıklar

Maternal hipertansif hastalıklar (kronik hipertansiyon, preeklampsi-eklampsi vb), maternal kronik hastalıklar (diyabet, kronik hipoksi, v.b.), maternal otoimmün hastalıklar (lupus, otoimmün tiroid hastalıkları, romatoid artirit) fetal gelişim geriliğine neden olurlar (35, 36, 37, 38, 39).

2.1.1.i. Maternal Travma

Gebelikte geçirilen travma erken doğum ile sonuçlanıp, fetal büyüme ve gelişmeyi indirek etkiler.

2.1.1.i. Maternal Egzersiz

Ağır egzersiz yapan gebelerde, bebek kilosunun düşük ve baş çevresinin küçük olduğu bildirilmektedir (40).

2.1.2. FETAL BÜYÜMEYE ETKİ EDEN ÇEVRESEL FAKTÖRLER

Çevresel etkenlerin gebelikte değişen fetomaternal fizyoloji sonucunda annenin sağlığı ile birlikte fetusun sağlık durumunu da etkileyebileceği belirtilmektedir. Çevresel kirlilik faktörlerinin özellikle düşük doğum ağırlığı, intrauterin büyüme geriliği, preterm doğum, spontan abortus ve fetal mortalite ile olan ilişkileri bildirilmiştir (41).

2.1.2.a Hava Kirliliği

Hava kirliliği etkenleri ile düşük doğum ağırlığı, preterm doğum, ölü doğum arasında ilişki bulunmuştur (42, 43). Sigara dumanına maruziyet düşük doğum ağırlığı ile ilişkilidir (44, 45).

2.1.2.b Su Kirliliği

İçme suyunda bulunan dezenfektan görevi olan klor ve bunların metabolitleri yüksek maruziyette zararlı olmaktadır (46, 47).

2.1.2.c. Gürültü Kirliliği

Hayvanlarda gürültüye maruz kalmanın doğumsal anomali ve düşük doğum ağırlığı ile ilişkisi olduğunu gösteren yayınlar vardır (30).

2.1.2.d. Manyetik Kirlilik

Mikrodalga fırınlar, uydular, radyo tv istasyonları, mesleki uğraşlar, diatermi gibi medikal maruziyetler elektromanyetik kirlilik nedenleri oluştururlar. Günlük yaşamdaki mikrodalga maruziyetinin insan üreme sistemine dair epidemiyolojik kanıt yoktur. Radyasyonun zararlı etkilerine bakacak olursak organogenezde maruziyette anomalilerle sonuçlanan doğumlar olabilir (48).

2.1.2.e. Kimyasal Kirlilik

Çözücülere kurşun, civa ve bileşiklerine, klorofenole maruziyet düşük doğum ağırlıklı doğuma, spontan abortus riskinin artışına sebep olduğu bildirilmiştir (49, 45, 50, 51).

2.1.3. FETAL BÜYÜMEYE VE GELİŞMEYE ETKİ EDEN PLASENTAL FAKTÖRLER

Plasenta anne ve fetal kan dolaşımını birbirinden ayrı tutan, anne tarafından alınan besinleri ve oksijeni özelleşmiş tasarımı ile adeta bir parazit olan fetusa aktaran, annenin immunsisteminden bu paraziti koruyan, üzerinde sayısız çalışmalar yapılsa da tam olarak mekanizması anlaşılabilmesi mümkün olmayan bariyer bir organdır. Fetus için bu kadar hayati olan bir organın anormalliği fetal büyüme ve gelişmeyi etkiler. Bu plasental faktörleri inceleyecek olursak;

2.1.3.a. Plasentanın morfolojik bozuklukları:

- Tek umblikal arter varlığı

IUGG tek umblikal arter varlığında tüm kotiledonlardan fetusa doğru yetersiz drenaj gelişmesine sebep olarak düşük doğum ağırlığına sebep olabilir.

- Bilobar veya sirkumvallat plasenta varlığı.

Sirkümvalat plasenta ve plasenta previa da IUGG daha hafif sınırlardadır.

- Plasental hemanjiomlar, plasental tromboz ve infarkt, plasental kist ve koranjioim.

Fetal kanın büyük kısmının bloke edilip yeterli gaz ve metabolit değişimi için gerekli alanın azalmasına sebep olurlar. Plasental infarkt, intrauterin gelişme geriliği, fetal hipoksi, intrauterin fetus ölümü, neonatal mortalite ve morbidite nedenlerindedir. 40.000 plasentanın incelendiği bir çalışmada her 1000 doğumun 2.4 'ünde ölü doğuma neden olduğu saptanmıştır (52).

- Plasenta previa

Aşağı uterin segment gibi perfüzyonun az olduğu bir alana implantasyona bağlı olarak gelişmektedir.

2.1.3.b. Plasentanın Enfeksiyonları:

Desuidit, plasentit, vaskulit ve koryoamnionit.

Akut koryoamnionitiste membranlar opak, sarı, kötü kokulu olarak izlenir. Genelde mikroorganizma transservikal (asendan yol) olarak membranlara ulaşır. Preterm doğum, fetal ve neonatal enfeksiyonlar, intrauterin hipoksi, intrauterin büyüme ve gelişme geriliği, düşük apgar skoru ve respiratuar distrese neden olduğu bilinmektedir.

2.1.3.c. Plasentanın Yapışma Bozuklukları:

Velamentöz bağlanma, anormal desidualizasyon gibi plasental faktörler sonucunda fetal büyüme olumsuz etkilenebilir (53, 54).

2.1.4. FETAL BÜYÜMEYE VE GELİŞMEYE ETKİ EDEN UTERİN FAKTÖRLER

Müllerian anomaliler ve uterin myomlar gibi uterin patolojilerde İUGG gelişmesi muhtemeldir. Bu durum plasental dolaşımın bozuk olmasına bağlanabilir.

2.1.5. FETAL BÜYÜMEYE VE GELİŞMEYE ETKİ EDEN KROMOZOMAL ANOMALİLER

İUGG olan bir bebek saptandığında eşlik eden bir kromozomal anomalisi olma olasılığı %10'un altındadır (55). Trizomiler fetuslarda plasental yetmezlik ve ağır fetal büyüme ve gelişme geriliğine yol açmaktadır (56). En yaygın görülen kromozomal anomali olan Trizomi 21' e eşlik eden büyüme ve gelişme geriliği daha hafif iken, özellikle trizomi 13 ve 18'li fetuslarda ağır büyüme ve gelişme geriliği saptanmaktadır. Turner sendromu ile doğan her üç

bebekten birinde ağır İUGG izlenmektedir. Normal populasyonda %3 olan malformasyon oranı İUGG de %8 dir.

2.2. APOPİTOZİS VE KASPAZ SİSTEMİ

Apopitozis, enerji bağımlı, programlı hücre ölümü olarak adlandırılan bir süreç olup, normal gelişim sürecinde oluşur ve eski fonksiyonel olmayan hücrelerin kaybedilmesi ve belirli organ ve dokularda yeni hücrelerin gelişmesi arasındaki dengenin sağlanması açısından önemlidir (57). Fetal gelişim ve erişkin dokularda pekçok fizyolojik olayda önemli role sahiptir (58). Apopitozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (59).

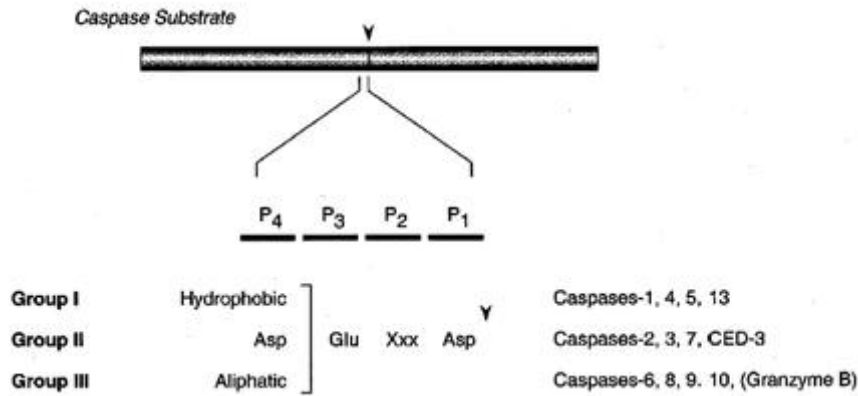
Günümüzde yürütülen araştırmalar sonucunda, apopitozis ve apopitozisten sorumlu moleküler mekanizmalar açıklığa kavuşmuştur. Hücrelerde en belirgin apopitotik özellikler membranlarda bleblerin oluşması, sitoplazmik ve nükleer kondensasyon, DNA parçalanması ve apopitotik cisimlerin oluşmasıdır (60). Apopitoz indüklenmesi için iki ana yol ortaya çıkarılmıştır; birincisi mitokondriyel bir yoldur ve aynı zamanda intrinsik yolak ta denir. DNA hasarını da içeren çeşitli hücresel streslere cevap olarak aktive olur. Bu yolağın ayırıcı özelliği mitokondriyel tutulum ve apopitozom oluşumu ve kaspaz aktivasyonunu içermesidir (57). İkinci yolak ekstrinsik yoldur ve bu yol içindeki mekanizmalar da kaspaz sistemini bir şekilde aktive eder. Böylece kaspazlar her iki sistemde de yer alarak apopitozisin çok hızlı gerçekleşmesine sebep olurlar.

Apopitoz farklı hücre tipine özgül sinyallerle tetiklenir ve bu sinyaller kaspaz kaskadı aktivasyonu ile sonuçlanır (61). Kaspaz adı verilen, intrasellüler proteazların; apopitozisin direk ve indirek morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerinden sorumlu olduğu ortaya

konulmuştur. Kaspazlar ilk olarak bir nematod olan *Caenorhabditis Elegans*'ın genetik analizi sırasında ortaya çıkmıştır (62).

Apopitotik hücre ölümünde rol oynayan multigen ailesinden oluşan sistein-proteaz grubu enzim "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs- CASPASE" olarak türetilmiştir. İnaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilmelerinin ardından hücresel hedeflerdeki tetrapeptit motifleri tanır ve bazı anahtar hücre içi proteinleri, aspartik asit rezidülerinden ayırır. Bu şekilde hücreyi kontrollü bir şekilde ölüme götürürler. Apoptozis sırasında meydana gelen sellüler ve morfolojik değişimler, kaspazların rol oynadığı süreçler sonucunda gelişir (62).

En az 14 kaspaz tanımlanmıştır (63). Bu proteazlar üç gruba ayrılmaktadır (64). (şekil-1).



Grup 1 : Sitokin matürasyonuna aracılık edenler (caspase-1, 4, 5, 13) - ICE ailesi,

Grup 2 : Apoptotik hücre ölümü sürecinde efektör görevi üstlenenler (kaspaz-2, 3, 7) - ced 3 ailesi,

Grup 3 : Apoptotik hücre ölümünde aktivatörler (kaspaz-6, 8, 9, 10) - ced 3 ailesi (65).

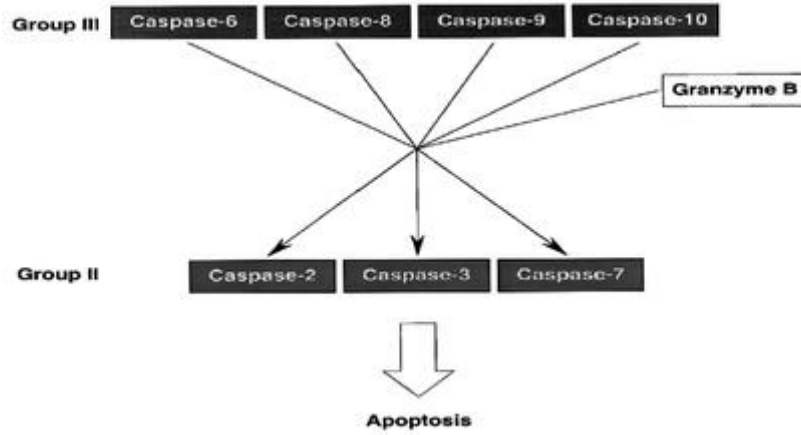
Tetrapeptit motiflerini kaspazlar, aminoasit spesifitelerine göre tanır ve p4 pozisyonundaki aminoasitlere göre üç spesifik gruba ayrılır.

Grup 1 kaspazlar (kaspaz-1, 4, 5, 13) P4 pozisyonunda hidrofobik aminoasitleri tanırlar ve sitokinlerin maturasyonuna aracılık ederler.

Grup 2 kaspazların ayırma noktası hücre ölümü sırasındaki pek çok proteinlerde gözlenir ve bununla ilişkili olarak da grup 2 kaspazlar (kaspaz-2, 3, 7) apoptozisin major efektörleri olarak bilinirler.

Grup 3 kaspazlar (kaspaz-6, 8, 9, 10) alifatik aminoasitleri tanırlar ve grup 2 kaspazların aktivasyonunda görev alır (65). (şekil 2)

Kaspazlara ek olarak bir serin proteaz olan granzim-B gibi başka proteazlar da kaspaz aktivasyonunda görev alır ve bazen de kaspazların yerine fonksiyon görerek apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunur. (şekil 2)



Şekil 2: Kaspazların moleküler dizilimi (62).

Başlangıçta matür olmayan pro-kaspazlar şeklinde bulunurlar ve aktive olmaları için ayrılmaları gerekir. Önce inaktif üç parçalı proenzimler olarak sentez edilirler. Aspartat (P1) - X (P2) bağının ayrılmasıyla proenzimden, küçük ve büyük subüniteleri içeren aktif enzim oluşur. Ayrılma işleminden sonra 2 büyük ve 2 küçük alt üniteden oluşan tetramer yapısına sahip kaspaz yapısı izlenir . Kaspazların tetramer yapısı 2 adet büyük (dışta) ve 2 adet küçük alt üniteden (içte) oluşmuştur.

Kaspaz aracılı apopitozisin aktivasyonunda üç ayrı yolun varlığı bilinmektedir;

- 1 . Endoplazmik retikulum aracılı apopitozis
2. Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile tetiklenen apopitozis
3. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apopitozis

Günümüzde apopitozisi morfolojik değerlendirmenin yanı sıra, apopitozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn, aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de apopitosiz saptanabilmektedir. İntrinsik yolak mitokondriyel tutulum ve apopitozom oluşumu ve kaspaz aktivasyonu içerir. Apopitozom bir multiprotein bileşimidir. 700-1400 kD

büyüklüğündedir ve apopitoz aktive edici faktör-1 (Apaf-1), sitokrom c, ve kaspaz-9 dan oluşur (66, 67). Ancak Apaf-1, sitokrom c ve dATP varlığında, holoenzim kompleksini oluşturmak üzere kaspaz-9 u oligomerize eder, birleştirir ve işler. Bu şekilde apopitozom, apopitozla ilişkili morfolojik özelliklere yol açacak şekilde kaspaz-3 sistemini aktive ederek kaspaz yolağı tetikler (57, 68, 69). Kaspaz-3 aktive olduğunda kendine feed back verebilir ve başlatıcı kaspaz-9 u ayırabilir; bu bir olumlu feed backtir. Böylece kaspaz-9 u daha da aktive eder. Bu durum kaspaz kaskadının geri dönülemez şekilde hücre intiharına ilerlemesini garanti altına alır.

Apoptozis tanısına özgü bazı aktivasyonların belirlenmesi için çok çeşitli yöntemler vardır (70). İmmunhistokimyasal yöntemlerden kaspaz 3 tayini ile apoptozisi belirlemek bu yöntemlerden sadece bir tanesidir. Birçok çalışmada çeşitli etkenlerin dokudaki apoptozis ile ilişkisi ve yine apoptozisin organizmada doğurabileceği etkiler ile ilişkisini belirleyebilmek için bu yöntemlerden bir veya birkaçından birlikte faydalanılmıştır.

Bizim çalışmamızın amacı miat gebelikte oluşan fizyolojik fetal membran rüptürüne yol açtığı öne sürülen apoptotik değişiklikleri, kaspaz 3 ile immunohistokimyasal olarak saptamak, supraservikal alana denk geldiği düşünülen alanda ve plasentaya yaklaşık 2 cm uzaklıktaki distal alanda fetal membranlarda kaspaz 3'ün birbirinden farklı şekilde eksprese olup olmadığını belirlemek ve saptanan apoptozis oranlarının, fetal büyüme ve gelişmeye olan etkisini incelemektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

2010 Ağustos - 2011 Ağustos tarihleri arasında Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı'nda gebeliğin başından beri takip olan ve doğum yapan 56 hastanın plasentaları patoloji laboratuvarında takibe alındı. Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi 05 Temmuz 2011 tarihli 07 no'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu toplantısında, 03 karar no ile tez çalışması onay almıştır. Plasentaların 15'i normal doğum ve 41'ü elektif sezaryan ile olan doğumdan elde edildi. Placenta, fetal membranlar ve göbek kordonu materyali çalışmaya dahil edildi. Makroskopik inceleme ile plasental ağırlık, boyutlar, göbek kordonu sapı, uzunluğu ve gros patoloji olup olmadığı kaydedildi. Plasentalar aynı gün içerisinde işleme alındı.

Gestasyonel yaş hesaplanırken hastanın son adet tarihi ve ilk dönem ultrasonunda fetal baş popo mesafesi kullanıldı. Klinik ve patolojik olarak koryoamniyonit ve PPROM olan olgular, kronik hastalığı (HT, DM, SLE, v.b.) ve gestasyonel hastalığı olan gebeler (GDM, Preeklampsi v.b.), sigara içenler, 12 saati aşkın membran rüptürü hikayesi olanlar ve antenatal fetal hastalık tanısı alanlar (immün hidrops, yapısal ve kromozomal anomaliler, v.b.), çoğul gebelikler çalışma dışı bırakıldı.

Amniyon membranı dışı katlanacak şekilde rulo yapılarak fetal membranların spontan (NSVY) ya da manuel (C/S) rüptür alanlarından ve ayrıca fetal membranların distal kısmından (plasental kenarın 2 cm distali) yapıldı (71, 72). Fetal membranlar % 10'luk formalinde fiske edildi.

Doku işleminden sonra parafine gömüldü. H&E (Hematoksilen Eozin) ile ön inceleme yapılarak uygun plasentalar seçildi.

İmmunohistokimyasal inceleme; mikrotom ile iki mikrometre kalınlıkta kesilerek poly-L-lysinli lamlara alınan örnekler (diva decloaker 10X-Biocare Medical), deparafinize ve rehidrate edildi. Sitrat tampon (10 mmol/L, PH:6,0) içerisinde ısıtılarak decloaking chamber'da inkübe edilerek antijen retrieval (açığa çıkartma) uygulandı. Daha sonra endojen peroksidaz % 3 metanol içerisindeki hidrojen peroksit (ScyTek peroxide Block 21618,USA) ile inaktive edildi. Nonspesifik bağlanma noktaları % 1 bovine serum albumin (protein blokaj) ile bloke edildi (ScyTek,Super block 21292,Logan,Utah,USA). Daha sonra kaspaz-3 primer antikoru (Genetex, GTX22302,USA) (1.500) ile inkübe edildi. İnsan tonsil materyali pozitif kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyondan sonra iki kez beşer dakika TBS'de (Tris Buffered Saline) yıkandıktan sonra streptavidin peroksidaz serumu ile 20 dakika yıkandı.

Tekrar iki kez beşer dakika TBS 'de bekletilen kesitler PH:7,6'da DAB kromogen (ScyTek, USA) ile beş dakika mikroskop altında kontrol edilerek inkübe edildi. Daha sonra kesitler distile suda yıkanarak Mayer's Hematoksilen ile zıt boyanma elde edildi. Son aşamada ise kesitler dehidrate edilerek entellan ile kapatıldı.

Fetal membranın, rüptüre olduğu bölgeye 'E' tanımlamasını; rüptür olan alanın distalinde plasentaya 2 cm yakın bölgeye de 'D' tanımlaması yapıldı. E ve D olarak adlandırılan bölgelerde kaspaz 3 yöntemi ile tespit edilen apoptozis miktarı incelendiğinde kaspaz 3 saptanamayan alan için sıfır, %1-10 arası; 1(hafif), %10-49 arası; 2(orta), >%50; 3(yoğun) olarak puanlandı (73).

Tek bir patolog tarafından kör olarak değerlendirildi. Amniyon membranına bakan damar duvarında yer alan düz kas hücrelerinin sitoplazmasındaki boyanma (+) ve anlamlı kabul edildi (74).

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS for windows 17.0 istatistik paket programı kullanılmıştır. Verilerin korelasyonuna Spearman analizi ile bakılmış ve karşılaştırmalarda ki-kare testi kullanılmıştır. Tanı değerleri hesaplanmış, $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

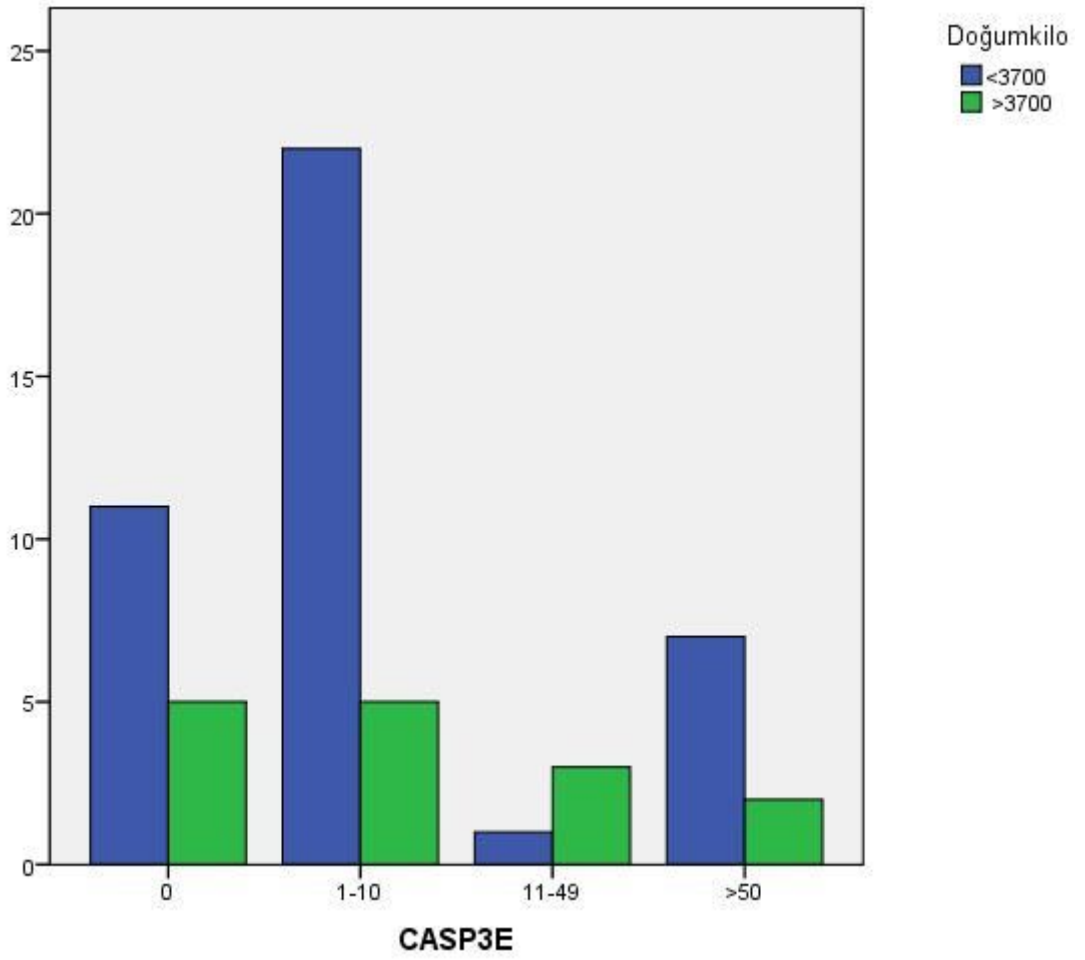
Kliniğimizde doğum yapan 56 gebe kadının plasentaları retrospektif olarak incelenmiştir. Araştırmamız kapsamındaki gebe kadınların kilosu, yaşı, gebelik sũresince aldığı kilo artışı ve doğan bebeklerin kilosu, boyu, cinsiyeti, gestasyonel yaşları gibi ۆzelliklerde tablo 1 de gۆsterildięi gibi istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0.005$; CI: %95).

PARAMETRE	ORT \pm SS*
Anne yaş (yıl)	30 \pm 4,32
Anne kilo	77,00 \pm 13,8315
Anne kilo artışı	16,00 \pm 6,1455
Yenidoğanın kilosu (gr)	3380,00 \pm 473,573
Gebelik gũn sayısı	274 \pm 6,978
Doğum haftası	39 \pm 1,44
Yenidoğanın boyu	50,00 \pm 2,123

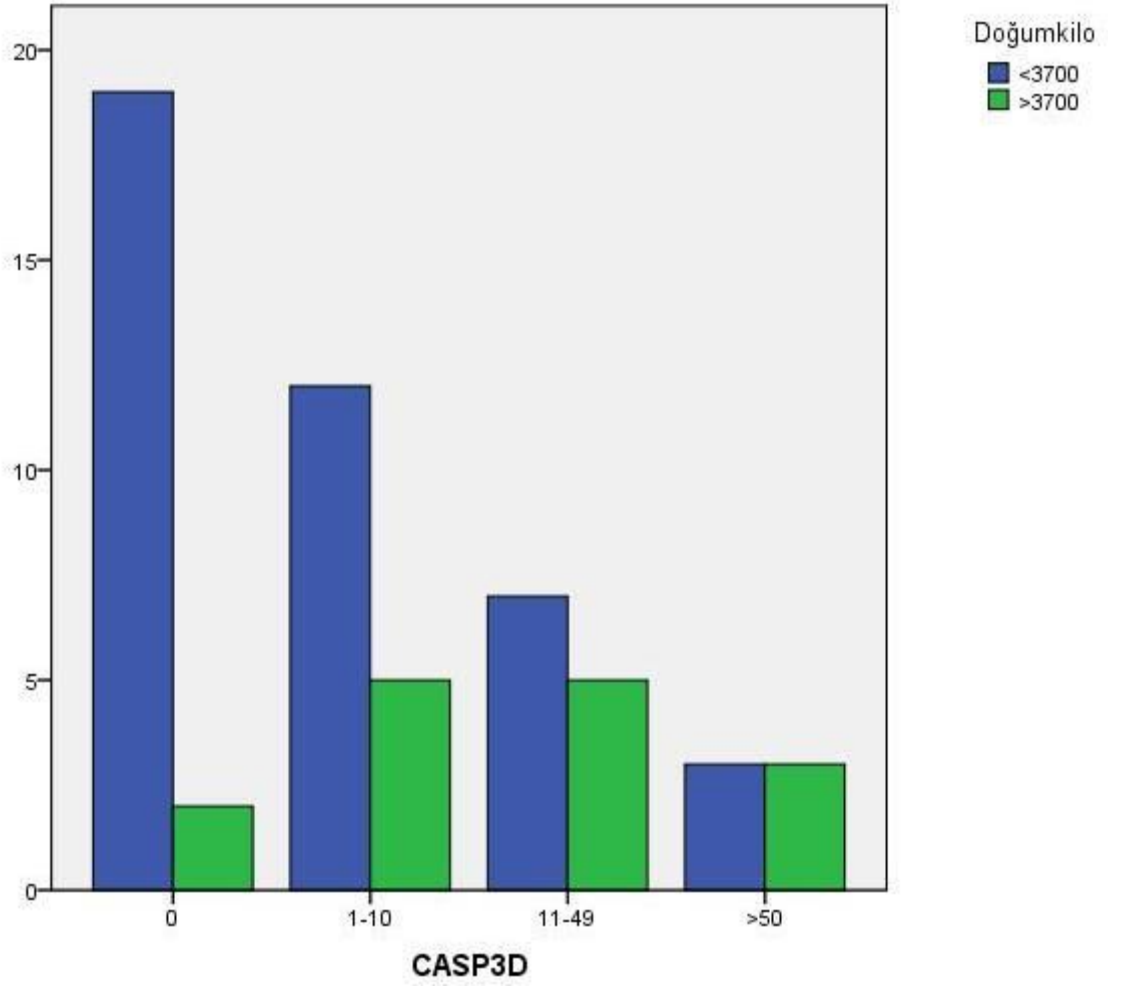
TABLO 1. ۆrneklere ait demografik parametreler.

ORT: Ortalama değer SS: Standart Sapma

Bebek doğum kilosunda 3700 gr sınır olarak kabul edildi. 41 bebek 3700 gramın altında doğum kilosuna sahipken, 15 bebeğin de 3700 gramın üzerinde doğum kilosuna sahip olduğu tespit edildi.



Şekil 3: Kaspaz 3 E'nin bebek doğum kilolarına göre dağılımını gösteren grafik.

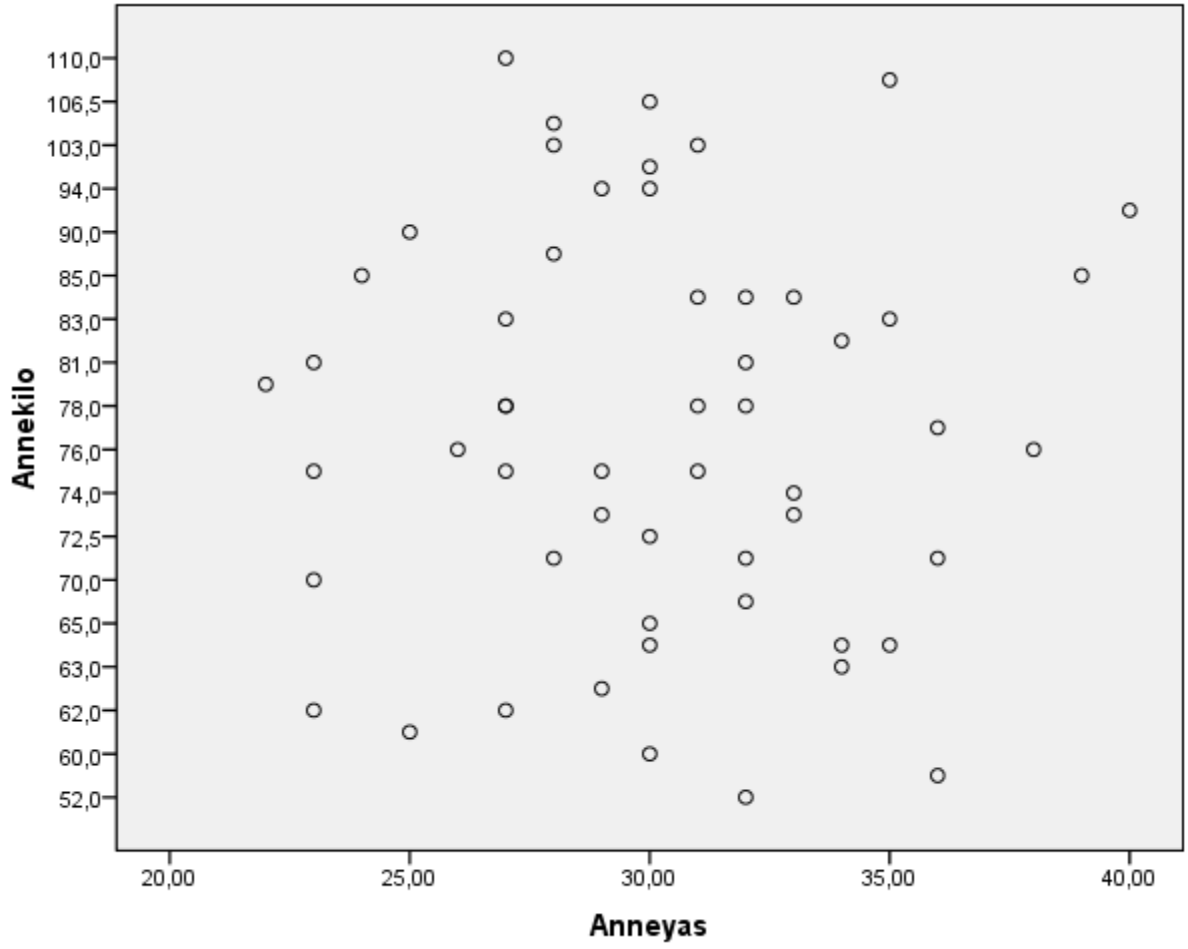


Şekil 4: Kaspaz 3 D'nin bebek doğum kilolarına göre dağılımını gösteren grafik.

E bölgesinde (membran rüptüre alanı) kaspaz 3 tespit edilemeyen grup ile kaspaz 3 tespit edilebilen gruplar arasında yenidoğan kiloları ve apoptozis arasında istatistiksel bir korelasyon bulunmadığı tespit edildi ($p:0,434$).

Ancak aynı araştırma D bölgesi için yapıldığında ise bebek doğum kilosu ile D bölgesinde (membran rüptüre alanının distalinde plasentaya 2 cm uzaklıkta, gerilime en az maruz kaldığı düşünülen alan) kaspaz 3 ile saptanan apoptozis arasında anlamlı bir korelasyon olduğu tespit edildi ($p < 0.05$; CI:%95).

Araştırmaya dahil edilen anne yaş grubunun ortalaması 30 idi ve E ile D alanlarının her ikisinde de kaspaz 3 ile saptanan apoptozis arasında bir korelasyon bulunmadığı tespit edildi. Ayrıca aynı şekilde annelerin doğum sırasındaki kilosu ve gebelik süresince aldığı kilo artış miktarının da, fetal membranların farklı 2 alanında (E ve D) kaspaz 3 ile saptanan apoptozis ile arasında bir korelasyon bulunmadığı tespit edildi.

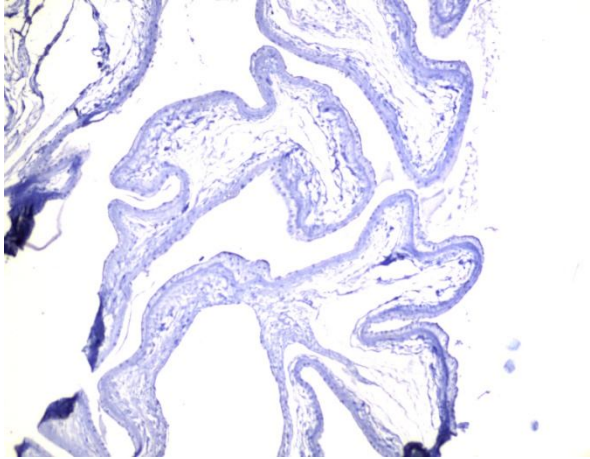


Şekil 5: Araştırmaya dahil edilen anne yaş (YIL) ve kilolarının (Gram) dağılımı

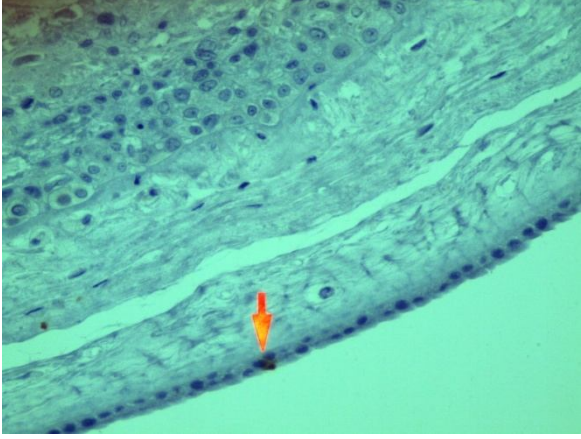
Araştırmamıza alınan annelerin, yaş ve kilolarının dağılımı değerlendirildiğinde homojen bir dağılıma sahip olduğu söylenebilir.

Yenidoğan cinsiyetleri incelendiğinde yarı yarıya bir hasta dağılım olduğu gözlemlendi. Cinsiyetin de E ve D bölgelerinde kaspaz 3 dağılımı ile arasında bir korelasyon izlenmediği tespit edilmiştir.

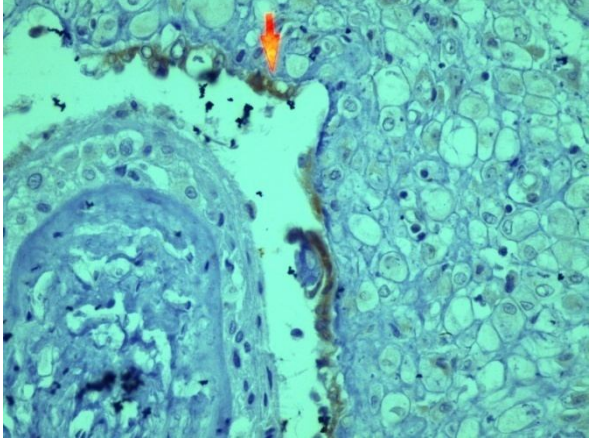
Çalışmaya alınan örneklerde E ve D alanlarında apoptozisin farklı oranlarda ekspresyonu olup olmadığı incelendiğinde membran rüptür alanı olan E bölgesinde kaspaz 3 yoğunluğu rüptür alanın distalinde plasentaya yakın olan D bölgesine oranla daha fazla izlenmiştir. Ayrıca membran rüptür bölgesinde damar yapılarında izlenen apoptozis oranları da, D bölgesine oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p:0,019). Ancak E ve D bölgelerinde saptanan kaspaz 3 miktarlarının birbirleri ile korelasyonu olmadığı da istatistiksel olarak belirlenmiştir (p:0,119).



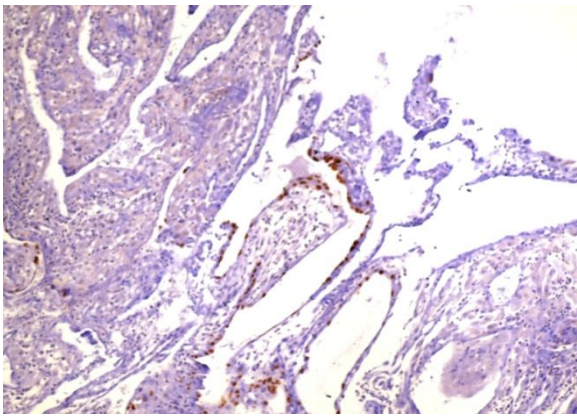
Şekil 7: Apoptotik hücre izlenmeyen preparat



Şekil 8: Apoptotik hücre, 1+ olarak tanımlanan preparat



Şekil 9: Apoptotik hücre, 2+ olarak tanımlanan preparat



Şekil 10: 3+ olarak tanımlanan preparat

5. TARTIŞMA

Fetal gelişim ve intrauterin yaşam bilimin henüz çözemediği yönleriyle binlerce soru içeren bir konudur. Fetoplasental fizyoloji incelemeleri erken ve geç perinatal dönemde fetusun büyüme ve gelişme süreçlerine etki eden faktörlere aydınlık getirmektedir. Fetusun büyüme ve gelişmesinin, fetal doğum ağırlığının morbidite ve mortalite ile ilişkisi aşikârdır. Bu yüzden birçok bilimsel çalışma gibi bizim çalışmamızda da fetal büyümeye ve fetal ağırlığa etki eden kompartmanlardan, fetal transfere karşı bir bariyer olarak tanımlanan fetal membranların farklı alanlarında apopitozisoranlarını çalıştık.

Apopitozis, organizma tarafından düzenlenen enerji bağımlı hücre ölümüdür. Programlı hücre ölümü olan bu süreç fetal gelişim ve erişkin dokulardaki pek çok fizyolojik olayda önemli role sahiptir. Kaspazlar apopitotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan enzimlerdir. İmmunhistokimyasal yöntemle aktif kaspaz-3 tayininin moleküler düzeyde belirlenmesiyle apopitozis saptanabilmektedir (5).

Serviksin üzerindeki insan fetal membranlarındaki azalmış gerilme kuvveti daha önce yapılan araştırmalarda tanımlanmıştır (2, 75). Bir çalışmada supraservikal fetal membranların zayıflığının, kollajen yeniden modellenmesi ve apopitoz ile uyumlu biyokimyasal, histolojik özellikler ile ilişkili olduğunu bildirilmiştir (7). Geç gestasyon sırasında zayıflayan membrana bir dizi biyokimyasal ve fiziksel olayların katkıda bulunduğu düşünülmektedir (2). Bu faktörler özellikle supraservikal alanda aktif olabilir, çünkü önceki araştırmacılar serviksin üzerinde yer alan fetal membranların benzersiz histolojik özelliklere sahip olduğunu bulmuştur (5, 3). Bir grup tarafından kollajen yeniden modellenmesi ve apopitozis ile uyumlu “fazla morfolojik değişiklik” olarak adlandırılan fokal fetal membran alanları tanımlanmıştır ve rüptür alanını kapsadığı öne sürülmüştür (7). Bu bulgular ilk olarak gerilme kuvvetinin de

etiyojolojiye katkıda bulunmuş olabileceği miadındaki vajinal doğumlarda bildirilmiştir. Bununla birlikte, aynı yazarlar fetal membranların miadında elektif sezaryen doğum veya vajinal doğum sonrasında toplanmasından bağımsız olduğunu göstermişlerdir (75). Bizim çalışmamızda hem sezaryan hemde normal doğum plasentalarının kullanılmasının nedeni budur. Bu grup aynı zamanda serviksin üzerinde yer alan bölgede artmış MMP (matriks metalloproteinaz) aktivasyonu ve koryon (sitotrofoblast) hücresi apoptozisi tanımlamıştır (71, 4). Membran örnekleme modelinde Moore çalışma grubu, fetal membran yüzeylerinin kuvveti ve zayıflığı açısından Steven Bell çalışma grubunun histolojik çalışmaları ile uyumlu kalıplar ortaya koymuştur (7).

Moore ve Bell grubunun çalışmaları, fetal membranın biyokimyasal ve histolojik özelliklerindeki farklılıklar ile birlikte, özellikle serviks üzerindeki fetal membranların, diğer geri kalan bölgelerdeki fetal membranlardan anlamlı şekilde daha zayıf olduğunu göstermiştir. Bu da fetal membranlarda bölgesel farklılıklar kavramını güçlü bir şekilde desteklemektedir. Bu veriler gestasyon süresince bu bölgenin zayıflaması ile de uyumludur. Preterm hastalarda fetal membranların fiziksel özelliklerine ilişkin veri sınırlıdır. Presman (76), prematür fetal membranların miadındaki fetal membranlardan daha güçlü olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada bölgesel farklılıklar bildirilmemiştir. Moore grubunun çalışmalarında prematür fetal membranların miadındaki membranlardan daha güçlü olduğu ve zayıf bölgenin küçük veya hiç olmadığını doğrulanmıştır.

Yapılan çalışmalarda çeşitli tutarsızlıklar görülmektedir. Örneğin, yırtılma yüzeyine bitişik membranların yırtık yüzeyinden daha distal olanlardan daha zayıf olup olmadığı konusunda uyumsuzluklar vardır; bu durum yırtığın normal olarak membranın zayıf bölgesinde başlayıp başlamadığında da uyumsuzluklar anlamına gelir.

Apopitoz sürecinin fetal membran rüptürü mekanizmasında önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. İnsan amniyon ve koryonunda apopitozisin gerçek anlamda miada yakın olduğu düşünülmektedir (4).

Bizim çalışmamızda fetal membranlarda kaspaz 3 ile gösterilen apopitozisin, membranın rüptüre olduğu gözlenen alanda mı yoksa gerilime en az maruz kaldığı düşünülen, rüptüre alandan daha distal alanda olan plasentaya yaklaşık 2 cm uzaklıktaki alanda mı daha fazla olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca her iki alanda saptanan apopitozisin bebek doğum kilosu ile korelasyonu incelenmiştir.

Çalışmaya alınan örneklerde E ve D alanlarında apopitozisin farklı oranlarda eksprese olup olmadığı incelendiğinde membran rüptür alanı olan E bölgesinde kaspaz 3 yoğunluğu El Khwad (7) ve Nicole G. (77) çalışmalarına benzer bir şekilde rüptür alanın distalinde plasentaya yakın olan D bölgesine oranla daha fazla izlenmiştir.

Kumagai çalışma grubu da TUNEL yöntemi ile intraamniotik epitelyum hücrelerin 40-41.haftalarda en yüksek seviyede olduğunu bulmuşlardır (73). Lei çalışma grubu bu bulguyu daha önce rat amnion epitelinde aktif doğum eyleminden önce artış şeklinde gözlemiş (78). Ancak bunun tersine Runic çalışma grubu ise apopitozisin 23-30. haftalar arasında en maksimum olduğunu belirtmiş. Bu iki çalışmanın farklılığı, çalışmalara farklı grupların dahil edilmesi ile açıklanabilir. Kumagai'nin çalışmasında komplike gebelikler dahil edilmemişken, Runic'in çalışmasında diyabet, koryoamnionit, PPRM'lu gebelerin de dahil edildiği görülüyor (79). Ayrıca Kumagai çalışma grubunun bir vakasında, fetal membranlarda DNA agaroz jel elektroforez yönteminin TUNEL yöntemi kadar apoptozisi net bir şekilde tespit edemediği gösterilmiş. Pek çok çalışma TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin yanısıra nekrotik hücrelerin de boyanması gibi bir dezavantaja işaret etse de, kaspaz 3 ile saptanan

apoptozisten daha fazla niceleyici tanı sağlanmaktadır. Biz ise çalışmamızda TUNEL yerine apoptozistespiti için kaspaz 3 yöntemini kullandık ve bu farklı bulgular nedeniyle 2 farklı alanda çalıştık.

Nicole çalışma grubu (n=12) doğum eylemi başlamamış, elektif sezaryen olan gebelerin plasentasından elde edilen fetal membran örneklerini toplamış ve bizim çalışmamızda olduğu gibi 2 farklı alanda apoptotik değişikliklerin farklı şekilde eksprese olup olmadığını incelemişler (77). Membranın rüptüre olduğu varsaydıkları supraservikal alanın belirlenmesi için doğum başlamadan önce Mavi Bonney boyasının transservikal uygulaması kullanılmış. Biz ise direk supraservikal alan varsayımını değil, membranın makroskopik olarak gözlenebilen rüptür alanından ve benzer olarak rüptüre alanın distalinde plasentaya 2 cm yakınlıkta fetal membranlardan örnekler aldık. Nicole grubu supraservikal alandaki apoptozismiktarının fazla olduğunu göstermiş. Bizim örneklerimizde de membranın rüptür olduğunu gördüğümüz alanda, distalde olan membrana kıyasla kaspaz 3 ile tespit edilen apoptozisin daha fazla olduğunu gördük. Ancak yapılan korelasyon incelemesinde E ve D alanlarında saptanan kaspaz 3 miktarları arasında korelasyon izlenmediği istatistiksel olarak saptandı. Çalışmamızda TUNEL yöntemi ile değil de, kaspaz 3 yöntemi ile apoptozismiktarının değerlendirilmiş olması güvenilirlik sorununu akla getirebilir.

E ve D alanlarında kaspaz 3 miktarı ile yenidoğan kilosu arasında korelasyon incelendiğinde D alanında (membran rüptür alanının distalinde plasentaya yakın olan alan) saptanan kaspaz 3 miktarı arasında ilginç bir şekilde pozitif korelasyon izlenmiştir. Plasentaya yakın olan fetal membran alanında apoptozisazaldıkça, yenidoğan ağırlığı artar varsayımını kurmuş idik. Oysa görüyoruz ki apoptozismiktarı arttıkça yenidoğan ağırlığı da artmaktadır. Bu bağıntı fetal beslenme kompartmanlarından plasentaya yakın olan fetal membranda

kolaylaştırılmış difüzyon ile glukoz transportu⁽⁸⁰⁾, apopitozisin kolaylaştırdığı bir geçirgenlik ile daha iyi mi sağlanıyor sorusunu akla getiriyor. Diyabetik gebelerde amniyon mayisinin glukoz düzeyine ve fetal membran apopitozismiktarına bakılarak, fetal ağırlık ile bağlantısı değerlendirilebilirse bu sorunun yanıtı bulunabilir mi? Kathleen çalışma grubu ratlarda glukoz gibi fetal membranlardan LDL ve HDL kolesterollerinin geçişinin de yenidoğanı beslediğini göstermiştir (81). Sadece fetal membranlardan değil, desidudan da bu kolesterollerin geçiş varlığı kanıtlanmıştır. Bu bağlamda plasentaya yakın alandaki D alanında desidua ve fetal membranların geçirgenliği apopitozis sayesinde arttıkça fetusun beslenmesi artabilir denebilir.

Apopitozisin varlığı ve artışı, bugüne kadar olan çalışmalarda rüptür mekanizmasında değerlendirilmiştir. Rüptür öncülü gösterge kabul edilme yolunda olan apopitozis, fetusun büyümesi ile rüptürün yaklaşmasını mı sağlıyor? Varsayılan hipotezlerde supraservikal alana fetal kilo basısının sebep olduğu düşünülen gerilme mekanizması ile membran rüptürünün gerçekleşmesi bir adaptasyon mekanizmasını da akla getirebilir. Apopitozis doğum distosisini engelleyebilecek bir mekanizmada yer alarak bebek doğum ağırlığının artışını belli bir noktada indirek olarak durdurmak için doğumu tetikleyecek olan membran rüptür mekanizmasını çalıştırıyor olabilir.

Supraservikal rüptür alanında uterusun gerilme mekanizmasına katkıda bulunan fetal basının apopitozisi arttırdığı düşünülse de (73, 77) bizim çalışmamızda fetal ağırlık ile membran rüptür alanındaki apopitozis ile arasında korelasyon saptanmamış olup, tersine membran rüptür alanının distalinde plasentaya yakın olan alandaki fetal membran apopitozisi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Yani apopitozis burada bir sonuç değil sebep olarak karşımıza çıkmaktadır. Apopitozisin fazlalığı burada geçirgenliği artırarak besin transportunu sağlıyor olabilir. En nihayetinde iri fetuslarda ve multifetal gestasyonlarda membran rüptür

mekanizmasında apopitozisin rol aldığı, ama başrol oynamadığı farklı bir mekanizma olsa gerek diye düşünebiliriz.

Sonuç olarak, apopitozis göstergesi kaspaz 3 ve fetal ağırlık arasında pozitif yönde ilişkinin varlığı fetal membranlardaki apopitozisin sadece rüptür mekanizmasında değil aynı zamanda fetal ağırlık ve büyümede de beklenin aksine olumlu etkisi olduğunu düşündürmektedir. Literatürün aksi yönünde olan bu bulguların kesin ispatı için membran rüptür mekanizmasının ve fetal ağırlığa etki eden mekanizmalarının keşfi; apopitozisin bu mekanizmalardaki yerinin anlaşılabilmesi için daha fazla vaka sayısı ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

Apopitozis göstergesi kaspaz 3 ve fetal ağırlık arasında pozitif yönde ilişkinin varlığı fetal membranlardaki apopitozisin sadece rüptür mekanizmasında değil aynı zamanda fetal ağırlık ve büyümede de beklenin aksine olumlu etkisi olduğunu düşündürmektedir. Literatürün aksi yönünde olan bu bulguların kesin ispatı için membran rüptür mekanizmasının ve fetal ağırlığa etki eden mekanizmalarının keşfi; apopitozisin bu mekanizmalardaki yerinin anlaşılabilmesi için daha fazla vaka sayısı ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

Amaç: Miat gebelikte oluşan apoptotik değişikliklerin, kaspaz 3 kaskadıyla tespiti, farklı alanlarda apoptozisin farklı şekilde eksprese olup olmadığının belirlenmesi ve kaspaz 3 ile saptanan apoptozis oranlarının yenidoğan kilosuna olan etkisinin belirlenmesi.

Materyel ve Metod: 2010 Ağustos - 2011 Ağustos tarihleri arasında Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda gebeliğin başından beri takip olan ve doğum yapan 56 hastanın plasentaları patoloji laboratuvarında takibe alındı. Plasenta, plasental membranlar ve göbek kordonu materyali çalışmaya dahil edildi. Makroskopik inceleme ile plasental ağırlık, boyutlar, göbek kordonu sapı, uzunluğu ve gros patoloji olup olmadığı kaydedildi. Plasentalar aynı gün içerisinde işleme alındı.

Fetal membranların spontan (NSVY) ya da manuel (C/S) rüptür alanlarından ve ayrıca fetal membranların distal alanından (plasental kenarın 2 cm distali) örnekler alındı. Fetal membranın, rüptüre olduğu bölgeye 'E' tanımlamasını; rüptür olan alanın distalinde plasentaya 2 cm yakın bölgeye de 'D' tanımlaması yapıldı. İmmunhistokimyasal yöntemle kaspaz 3 ile değerlendirilebilen apoptozis miktarları değerlendirildi.

Bulgular: Yenidoğan kilosu ile E bölgesinde (membran rüptüre alanı) kaspaz 3 ile saptanan apoptozis miktarı ile arasında bir korelasyon bulunmadığı tespit edildi. Ancak aynı araştırma D bölgesi için yapıldığında ise yenidoğan kilosu ile D bölgesinde kaspaz 3 ile saptanan apoptozis miktarı arasında anlamlı bir korelasyon olduğu tespit edildi.

E ve D alanlarında saptanan kaspaz 3 miktarlarının birbirleriyle korelasyonunun olmadığı istatistiksel olarak saptanmıştır.

Çalışmamıza alınan olgularda E ve D alanlarında apoptozisin farklı oranlarda eksprese olup olmadığı incelendiğinde ise membran rüptür alanı olan E bölgesinde kaspaz 3

yoğunluğu, rüptür alanın distalinde plasentaya yakın olan D bölgesine oranla daha fazla izlenmiştir.

Anne yaşının, doğum sırasındaki kilosun ve gebelik süresince aldığı kilo artış miktarının ayrıca bebek cinsiyet farkının E ve D alanlarının her ikisinde de kaspas 3 ile saptanan apopitozis arasında bir korelasyon bulunmadığı tespit edildi.

Sonuç: Apopitozis göstergesi kaspaz 3 ve fetal ağırlık arasında pozitif yönde ilişkinin varlığı fetal membranlardaki apopitozisin sadece rüptür mekanizmasında değil aynı zamanda fetal ağırlık ve büyümede de beklenin aksine olumlu etkisi olduğunu düşündürmektedir. Literatürün aksi yönünde olan bu bulguların kesin ispatı için membran rüptür mekanizmasının ve fetal ağırlığa etki eden mekanizmalarının keşfi; apopitozisin bu mekanizmalardaki yerinin anlaşılabilmesi için daha fazla vaka sayısı ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

8.SUMMARY

Aim: Apoptosis determination on different fetal membrane zones via caspase 3 expression and the relation between caspase 3 levels and birthweight of term pregnancies.

Material and method: The study is performed at the Maltepe University Obstetrics and Gynecology Department and pathology departments. Placentas were collected from 56 patients who gave birth between August 2010 and August 2011. The placenta, placental membranes and umbilical cord were included in the study material. Macroscopic examination and placental weight, dimensions, umbilical cord stem, length were recorded and gross pathologies were excluded. Placentas were processed in the same day. Fetal membranes were obtained from spontaneous vaginal delivery or c-sections and tissues were cut from the areas of rupture of fetal membranes and from 2 cm distal to the placental edge. The fetal membranes collected from the rupture zone was described as 'E' and the area 2 cm distal to the placenta was marked as 'D'. The amount of apoptosis was evaluated via immunohistochemical method looking at caspase 3.

Results: There were no correlation between the weight of newborn and the amount of apoptosis evaluated by caspase 3 in the ruptured area of the fetal membranes (E.) However, the newborn's weight and the amount of caspase-3 in the regions of D were evaluated and a significant correlation was found.

There were no statistically correlation between the amount of caspase 3 in E and D areas.

When the amount of apoptosis in E and D within the samples included in the study the expression of caspase 3 in the E field, the area of rupture of membranes, was greater than that observed in the region closer to the placenta, D.

There were no correlations between the maternal age, weight at birth ,increase in the amount of weight during pregnancy, the baby gender and caspase 3 levels detected in both areas.

Conclusion: The relationship between caspase-3, an indicator of apoptosis and fetal weight revealed that apoptosis is not only effective in the rupture of membranes but also might have a positive impact on the fetal weight and growth. In order to prove our findings despite the knowledge insisting the opposite in the literature the mechanism of membrane rupture and those effect fetal weight should be clarified; more studies with larger sample sizes are needed for understanding the role of apoptosis in these mechanisms.

9. KAYNAKLAR

- 1 Murphy DJ, Fowlie PW, McGuire W, ABC of preterm birth:obstetric issues in preterm birth, BMJ 2006;329:783-6.
- 2 Moore RM,Mansour JM,Redline RW,Mercer BM, Moore JJ,The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties.Placenta 2006;27:1037-51.
- 3 Artal R,Sokol RJ, Neuman M,Burstein AH,Stojkov J.The mechanical properties of prematurely rupture membranes :methods and preliminary results. Am J Obstet Gynecol 1976;125:655-9
- 4 Mc Laren J,Taylor DJ, Bell SC.increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor:implications for membrane remodelling and rupture. Am J Obstet ynecol 2000;182:409-16
- 5 Ulukaya E. Apoptozis ders notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 2003;15-26
- 6 Malak TM,Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes;a novelzone of extreme morphological alteration within the rupture site.BJOG 1994;101:375-86
- 7 El Khwad M,Stelzer B,Moore RM,et al.term human fetal membranes have a weak zone overlying the lower uterine pole and cervix before onset of labor. Biol reprod 2005;72:720-6
- 8 Neyzi Olcay, Pediatri 1. cilt, 3. baskı, Nobel, 2002, 326-340
- 9 H. William Toesch, Roberta A. Ballard, Christine A. Gleason, Avery's diseases of the newborn. 8 th edition, Elsevier sounders, 2005; 4: 139- 146
- 10 Sayers S., Powers J., Risk factors for aboriginal lowbirth weight intrauterin growth retardation and preterm birth in the darwin health region, Ausr N Z J Publik health 1997 Aug; 21(5): 524-30
- 11 Intrauterine Growth Restriction ACOG Practice Bulletin No :12, January, 2000
- 12 Atasü T, Benian A. içerisinde: Atasü T. Gebelikte fetusa ve yenidoğana zararlı etkenler. 2. baskı. Nobel tıp kitapçevleri Ankara-2000, 477-8
- 13 Varol FG, Sayın NC. Fetal büyüme. İçerisinden: Beksaç MS, Demir N, Koç A, Yüksel A. Obstetrik maternal fetal tıp ve perinatoloji. MN medikal nobel Ankara-2001, 1040-1054
- 14 Kadir Desdicioğlu, M. Ali Malas, S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 2006:13(2)/ 47-54
- 15 Demir SC, Evrüke C, Kadayıfçı O. Perinatal mortalite ve morbidite. İçerisinden: Beksaç MS, Demir N, Koç A, Yüksel A. Obstetrik maternal fetal tıp ve perinatoloji. MN medikal nobel Ankara-2001, 1194-1211
- 16 Verrier M, Spears W, Ying J, Kerr GR. Patterns of birth weight in relation to gestational age, maternal age, parity, and prenatal care in Texas' triethnic population, 1984 through 1986. Tex Med. 1993; 89(12):51-6.

-
- 17 Ferraz EM, Cray RH, Cünha TM. Determinants of preterm delivery and intrauterine growth retardation in North-East Brazil. *Int J Epidemiol* 1990;19:101-8
 - 18 Kramer MS. Determinants of low birth weight: methodological assessment and meta-analysis. *Bull WHO* 1987;65(5):663-737
 - 19 Mavalankar DV, Gray RH, Triverdi CR. Risk factors for preterm low birth weight in Ahmedabad, India. *Int J Epidemiol* 1992;21:263-72
 - 20 Fikree FF, Berendes HW. Risk factors for term intrauterine growth retardation: a community-based study in Karachi. *Bull WHO* 1994;72(4): 581-7
 - 21 Gross TL. Maternal and placental causes of intrauterine growth retardation, In: Gross TL, Sokol RJ (eds), *Intrauterine Growth Retardation: A practical approach*, Chicago: Year Book, 1989:57- 69
 - 22 Shapiro C, Sutija VG, Bush J. Effect of maternal weight gain on infant birth weight. *J Perinat Med*. 2000;28(6):428-31.
 - 23 Golde SH. Definition of fetal growth: normal and abnormal, in: Gross TL, Sokol RJ (eds), *Intrauterine Growth Retardation: A practical approach*, Chicago: Year Book, 1989:1-7
 - 24 Hobel C, Culhane J. Role of psychosocial and nutritional stress on poor pregnancy outcome. *J Nutr*. 2003;133(5 Suppl 2):1709S-1717S.
 - 25 Gambling L, Charania Z, Hannah L, Antipatis C, Lea RG, McArdle HJ. Effect of iron deficiency on placental cytokine expression and fetal growth in the pregnant rat. *Biol Reprod*. 2002;66(2):516-23.
 - 26 Sondergaard C, Henriksen TB, Obel C, Wisborg K. Smoking during pregnancy and infantile colic. *Pediatrics*. 2001; 108(2):342-6.
 - 27 Backe B. Maternal smoking and age. Effect on birthweight and risk for small-for-gestational age births. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1993; 72(3):172-6.
 - 28 Windham GC, Eaton A, Hopkins B. Evidence for an association between environmental tobacco smoke exposure and birthweight: a meta-analysis and new data. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 1999; 13(1):35-57.
 - 29 Livy DJ, Maier SE, West JR. Long-term alcohol exposure prior to conception results in lower fetal body weights. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2004; 71(3):135-41.
 - 30 Atasü T, Benian A. Bağımlılığı yapan maddelerin fetusa etkileri. İçerisinden: Atasü T. Gebelikte fetusa ve yenidoğana zararlı etkenler. 2. baskı. Nobel tıp kitapçevleri Ankara-2000, 461-476
 - 31 Blomberg S. Influence of maternal distress during pregnancy on postnatal development. *Acta Psychiatr Scand*. 1980; 62(5):405-17.
 - 32 Peacock JL, Bland JM, Anderson HR. Preterm delivery: effects of socioeconomic factors, psychological stress, smoking, alcohol, and caffeine. *BMJ*. 1995, 26;311(7004):531-5.
 - 33 Peters DA. Effects of maternal stress during different gestational periods on the serotonergic system in adult rat offspring. *Pharmacol Biochem Behav*. 1988; 31(4):839-43.
 - 34 Hobel C, Culhane J. Role of psychosocial and nutritional stress on poor pregnancy outcome. *J Nutr*. 2003; 133(5 Suppl 2):1709S-1717S

-
- 35 McCowan LM, Buist RG, North RA, Gamble G. Perinatal morbidity in chronic hypertension. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996; 103(2):123-9
- 36 Molina M, Casanueva V, Perez R, Ferrada C, Cisternas J, Cid L, et all. Impact of hypertensive disease of pregnancy on intrauterine growth retardation. *Rev Med Chil.* 1998; 126(4):375-82.
- 37 Özkınay E, Kazandı M. Preeklampsi. İçerisinden: Beksaç M.S, Demir N, Koç A, Yüksel A. *Obstetrik maternal fetal tıp ve perinatoloji. Medikal nobel Ankara-2001, 625-652.*
- 38 Kaya E. Gebelik hipertansiyonu preeklampsi-eklampsi.içerisinden: Beksaç M.S, Demir N, Koç A, Yüksel A.*Obstetrik maternal fetal tıp ve perinatoloji. Medikal nobel Ankara-2001, 661-675*
- 39 Fernandez Jonusas S, Ceriani Cernadas JM. The effects of arterial hypertension during pregnancy on birth weight, intrauterine growth retardation and neonatal evolution. A matched case-control study. *An Esp Pediatr.* 1999; 50(1):52-6.
- 40 Rao S, Kanade A, Margetts BM, Yajnik CS, Lubree H, Rege S. et all. Pune Maternal Nutrition Study. Maternal activity in relation to birth size in rural India. *The Pune Maternal Nutrition Study. Eur J Clin Nutr.* 2003; 57(4):531-42.
- 41 Esra Çetin, M. Ali Malas. S.D.Ü. tıp Fak. Derg. 2005;12(2)/ 65-72.
- 42 Ritz B,Yu F, Fruin S, Chapa G,Shaw GM, Harris JA. Ambient Air Pollution and Risk of Birth Defects in Southern California, *Am J Epidemiol* 2002;155(1):17-25.
- 43 Ritz B,Yu F. The Effect of Ambient Carbon Monoxide on Low Birth Weight Among Children Born in Southem California Between 1989 And 1993. *Epidemiology* 2000; 11(5):502-11
- 44 Windham GC,Eaton A,Hopkins B. Evidence for an Association Between Environmental Tobacco Smoke Exposure and Birthweight: A Meta-Analysis and New Dtata. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1999; 13(1): 35-57
- 45 Perera FP,Rauh V,Tsai WY,Kinney P, Camann D,Barr D,et al.Effect of Transplacental Exposure to Environmental pollutant on Birth Outcomes in a Multiethnic Population. *Environ Health Perspect* 2003;111(2): 201-5
- 46 Dodds L,King W,Woolcott C,Pole J. Trihalomethanes in Public Water Supplies and Adverse Birth Outcomes. *Epidemiology* 1999; 10(3):233-7
- 47 Wright JM, Schwart J,Dockery DW. Effect of Trihalomethane Exposur on Feta<1 Development. *Occup Environ Med* 2003; 60(3):173-80
- 48 Fattibene P,Mazzei F,Nuccetelli C,Risica S. Prenatal exposure to ionizing radiation: sources effects and regulatory. *Acta Paediatr* 1999;88:693-702
- 49 Wennborg H,Bodin L, Vainio H,Axelsson G. Pregnancy Outcome of Personnel in Swedish Biomedical Research Laboratories. *J Occup Environ Med* 2000;42(4):438-6
- 50 Seidler A,Raum E, Arabin B, Hellenbrand W,Walter U,Schwartz FW. Maternal Occupational Exposure to Chemical Substances and the Risk of infants Small-For-Gestational-Age. *Am J Ind Med* 1999; 36(1):213-22

-
- 51 Taskinen HK, Kyyronen P, Sallmen M, Virtanen SV, Liukkonen TA, Hiida O, et al. Reduced Fertility Among Female Wood Workers Exposed to Formaldehyde. *Am J Ind Med* 1999;36(1):206-12
- 52 Balazs R, Jordan T, Lewis PO, et al: Undernutrition and brain development. In Falkner F, Tanner JM(eds): *Human Growth*, ed2, vol.3, 1986; pp 415-473
- 53 Laurini R, Laurin J, Marsal K, Placental histology and fetal blood flow in intrauterine growth retardation : *Acta Obstet Gynecol Scand* 1994 ;73:529-534
- 54 Pollack RN, Divon My. Intrauterine growth retardation :definition, classification and etiology. *Clin Obstet Gynecol* 1992; 35:99-107
- 55 Snijders RJM, Sherrod C, Gosden CM, Nicolaides KH :Fetal growth retardation: Associated malformations and chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 168 : 547,1993
- 56 Rochelson B, Kaplan C, Guzman E, Arato M, Hansen K, Trunca C : A quantitative analysis of placental vasculature in the third trimester fetus with autosomal trisomy. *Obstet Gynecol* 75 :59, 1990
- 57 M De Falco, R.Penta ,V.laforgia, L. Cobellis, a. De Luca.Apoptosis and Human Placenta:Expression of Proteins Belonging to Different Apoptotic Pathways During Pregnancy.*J.Exp.Clin.Cancer Res.*,24.01.2005
- 58 Dr. Beril Yüksel, Dr. Sevtap Handemir Kılıç, Dr. Nicel Taşdemir, Dr. Sertaç Batioğlu. Apoptosis and Caspase System. Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi – Ankara , 02 October 2009
- 59 Kerr J.F., Wyllie A.H, Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26 (4): 239-245.
- 60 Huppertz B., Frank H-G., Kingdom J.C.P., Reister f., Kaufmann, P.: Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem. Cell Biol.* 110:495-508, 1998
- 61 Wyllie A.H. :Apoptosis. *British Medical Bulletin* 53. The Dorset Press, Dorchester, 1997
- 62 Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6:1028-1042.
- 63 Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87 (2): 171
- 64 Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997 Aug; 22(8):299-306.
- 65 Xue D, Shaham S and Horvitz HR. The *Caenorhabditis elegans* cell death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease. *Genes. Dev.* 1996; 10: 1073 - 1083
- 66 Cain K., Bratton S.B. Cohen G.M. :The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie.* 84: 203-214, 2002

-
- 67 Zou H., Yang R., Hao j., Wang J., Sun C., Fesik S.W., Wu J.C., Tomasselli K.J., Armstrong R.C.: Regulation of the Apaf-1/Caspase-9 Apoptosome by Caspase-3 and XIAP. *J. Biol. Chem.* 278:8091-8098, 2003
- 68 Saleh A., Srinivasula S.M., Balkir L., Robbins P.D., Alnemri E.S.: Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat. Cell Biol.* 2:476-483, 2000.
- 69 Jiang X., Wang X.J., Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1 *J. Biol. Chem.* 275:31199-31203, 2000
- 70 Ulukaya E. Apoptozis ders notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 2003;15-26.
- 71 Mc Laren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased incidence of apoptosis in non-labour-affected cytotrophoblast cells in term fetal membranes overlying the cervix. *Hum. Reprod.* 1999 Nov;14(11):2895-900
- 72 Reti NG, Lappas M, Riley C, Wlodek ME, Permezel M, Walker S, Rice GE. Why do membranes rupture at term? Evidence of increased cellular apoptosis in the supracervical fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2007 May;196(5):484.e1-10
- 73 K. Kumagai, Y. Otsuki, Y. Ito, M-A. Shibata, H. Abe, M. Ueki. Apoptosis in the normal human amnion at term, independent of Bcl-2 regulation and onset of labour. *Molecular Human Reproduction* Vol.7, No.7 pp 681-689, 2001
- 74 Erin L. KING, Raymon W. Redline, Steven D. Smith, Frederick T. Kraus, MD, Yoel Sadosky and D. Michael Chael Nelson. Myocytes of Chorionic Vessels From Placentas With Meconium-Associated Vascular Necrosis Exhibit Apoptotic Markers. *Human Pathology.* Volume 35, No. 4 (April 2004).
- 75 El Khwad M, Pandey V, Stetzer B, Mercer B, Kumar D, Moore RM. Fetal membranes from term vaginal deliveries have a zone of weakness exhibiting characteristics of apoptosis and remodelling. *J Soc Gynecol Investig* 2006;14:191-5.
- 76 Pressman EK, Cavanaugh JL, Woods J. Physical properties of the chorion throughout gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2003;187:672e5
- 77 Nicole G. Reti, BSc (Hons); Martha Lappas, PhD; Clyde Riley; Mary E. Wlodek, PhD; Michael Permezel, MD, Franzcog; Susan Walker, MD, Franzcog; Gregory E. Rice, PhD. Why do membranes rupture at term? Evidence of increased cellular apoptosis in the supracervical fetal membranes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* May 2007
- 78 Lei H., Furth E.E, Kalluri R. Et al (1996) A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J. Clin. Invest.*, 98, 1971-1978.
- 79 Runic R., Lockwood C.J., LaChapelle L. Et al (1998) Apoptosis and Fas expression in human fetal membranes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 660-666.
- 80 Barta E., Drugan A. Glucose transport from mother to fetus: a theoretical study. *J. Theor Biol.* 2010 Apr 7;263(3):295-302. Epub 2009 Dec 16.

81 Kathleen L. Wyne and Laura A. Woollett. Transport of maternal LDL and HDL to the fetal membranes and placenta of the Golden Syrian hamster is mediated by receptor-dependent and receptor-independent processes.