

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PLASENTADA EKSTRASELLÜLER MATRİKS
KOMPOZİSYONU TARAFINDAN HIF'İN AKTİVASYONU

Gözde ÜNEK

DOKTORA TEZİ

2019-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PLASENTADA EKSTRASELLÜLER MATRİKS
KOMPOZİSYONU TARAFINDAN HIF'İN AKTİVASYONU

Gözde ÜNEK

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2013.03.0122.005 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 17/06/2019

İmza

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN

Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. İnanç MENDİLCİOĞLU

Akdeniz Üniversitesi



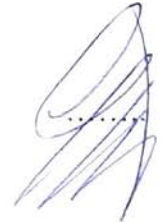
Üye : Prof. Dr. Sevil ÇAYLI

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

Gazi Üniversitesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Gözde ÜNEK


İmza



Tez Danışmanı

Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN

İmza



TEŐEKKÜR

Akademik eğitimim süresince ve tez projemin gerçekleştirilmesinde göstermiş olduğu tüm maddi, manevi ve bilimsel destekler için danışman hocam sayın Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN'a,

Tez projemde sağladığı bilimsel destek için değerli hocam Doç. Dr. Emin MALTEPE'ye,

Tezimin PCR analizleri sırasında kıymetli yardımlarını benden esirgemeyen Doç. Dr. Dijle Kipmen KORGUN ve Dr. Aslı ÖZMEN'e,

İhtiyaç duyduğum her an bana yardımcı oldukları için Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma ve birlikte çalıştığım ekip arkadaşlarıma,

Dokuların temininde bana her türlü kolaylığı sağladıkları için Prof. Dr. İnanç MENDİLCİOğLU ve Uzman Dr. Bekir Sıtkı İSENLİK'e,

Yardımları için Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli çalışanlarına,

Eğitim yaşamım boyunca gösterdikleri sonsuz destek, anlayış, sabır ve sevgi ile hep arkamda olan sevgili aileme sonsuz teőkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Kadınlarda morbidite ve mortaliteye neden olan bir gebelik hastalığı olan preeklampsinin (PE'nin) uterus ekstrasellüler matriks (ESM) yeniden modellenmesi ve HIF fonksiyonundaki bozukluklar ve yetersiz trofoblast invazyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Fare trofoblastik kök hücrelerin (TKH'lerin) kültüre edildiği ESM'nin, MAPK sinyal yolağıyla HIF'i tetikleyebildiğine dair bulgular bulunmaktadır. Çalışmamızda, fare kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen ESM indüklü MAPK-HIF ilişkisinin normal ve PE insan plasentalarında incelenmesini amaçladık.

Yöntem: Normal ve PE term plasentalarda fibronektin, $\beta 3$ integrin, fosfo-MAPK3/1, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α proteinleriyle ikili immünoflorasan boyamalar yapılarak bu proteinlerin birlikte ekspresyonları analiz edildi ve hücreyel dağılımları belirlendi. Plasentalarda fibronektin, $\beta 3$ integrin, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α ve beta aktinin protein ve mRNA düzeyindeki ekspresyonları sırasıyla Western blot ve qRT-PCR analizleriyle değerlendirildi. Western blot yöntemiyle MAPK3/1 ve fosfo-MAPK3/1 proteinlerinin ve qRT-PCR ile de MAPK1 ve MAPK3 mRNA'larının ekspresyonları da incelendi.

Bulgular: PE plasentalarda fibronektin ve $\beta 3$ integrinin mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonları normale göre değişmezken HIF ekspresyonları hem mRNA hem de protein düzeyinde normale göre arttı. PE plasentalarda MAPK1 ekspresyonu mRNA düzeyinde normalden fazla bulunurken protein düzeyinde değişmedi. MAPK3'in ise mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonları gruplar arasında aynı bulundu. Normal ve PE plasentalarda fibronektin ile HIF proteinlerini, $\beta 3$ integrin ile HIF proteinlerini ve fosfo-MAPK3/1 ile HIF proteinlerini beraber eksprese eden hücreler tespit edildi.

Sonuç: Çalışmamızda ESM indüklü MAPK-HIF yolağının normal ve PE insan plasentalarında geçerli olabileceğine dair kanıtlar ilk kez ortaya konmuştur. İnsan plasentasında ESM indüklü MAPK-HIF yolağının varlığının kesinleşmesi ve bu yolağın plasental hücrelerin farklılaşmasındaki rolünün anlaşılması için kapsamlı çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: plasenta, preeklampsi, ekstrasellüler matriks, MAPK, HIF

ABSTRACT

Objective: Preeclampsia (PE), a pregnancy disease that causes morbidity and mortality in women, is associated with impaired uterine extracellular matrix (ECM) remodeling and HIF function and inadequate trophoblast invasion. In mouse trophoblastic stem cells (TSCs), ECM can induce HIF via MAPK signaling pathway. In our study, we aimed to investigate the ECM-induced MAPK-HIF relationship in normal and preeclamptic human placentas.

Method: In normal and PE term placentas, with double immunofluorescence staining of fibronectin, $\beta 3$ integrin, phospho-MAPK3/1, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α proteins, coexpressions were analyzed and cellular distributions were determined. Expressions of fibronectin, $\beta 3$ integrin, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α and beta actin at protein and mRNA levels of placentas were evaluated by Western blot and qRT-PCR analysis respectively. The expressions of MAPK3/1 and phospho-MAPK3/1 proteins were examined by Western blot and MAPK1 and MAPK3 mRNAs were evaluated by qRT-PCR.

Results: Expressions of fibronectin and $\beta 3$ integrin at mRNA and protein levels in PE placentas did not change with respect to normal, whereas HIF (HIF-1 α , HIF-1 β and HIF-2 α) expressions increased with respect to both mRNA and protein levels. MAPK1 expression in PE placentas was higher than normal at mRNA level but not changed at protein level. Expression of MAPK3 at mRNA and protein levels were the same between the groups. In normal and PE placentas, co-expression of fibronectin and HIF proteins, $\beta 3$ integrin and HIF proteins and phospho-MAPK3/1 and HIF proteins were detected.

Conclusion: In our study, for the first time, some evidence that ECM-induced MAPK-HIF pathway can be valid in normal and PE human placentas has been demonstrated. Extensive studies are needed to confirm the presence of ECM-induced MAPK-HIF pathway in human placenta and to understand the role of this pathway in the differentiation of placental cells.

Key words: placenta, preeclampsia, extracellular matrix, MAPK, HIF

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Plasenta	3
2.2. Term Plasentasının Yapısı	3
2.2.1. Plasentanın Fetal Kısmı	3
2.2.2. Plasentanın Maternal Kısmı	4
2.3. Villusların Yapısı	5
2.4. Olgunlaşan Plasentada Meydana Gelen Değişiklikler	7
2.5. Villus Ağacının Yapısı	9
2.5.1. Mezenşimal Villus (MV)	9
2.5.2. İmmatür İntermediyet Villus (İİV)	10
2.5.3. Kök Villus (KV)	10
2.5.4. Matür İntermediyet Villus (MİV)	11
2.5.5. Terminal Villus (TV)	11
2.6. HIF	12
2.7. ESM	16
2.7.1. Fibronektin	18
2.8. Adezyon Molekülleri	18
2.8.1. İntegrinler	19
2.9. MAPK Yolakları	21
2.9.1. ERK Yolağı	22
2.10. PE	25
	iii

2.10.1. PE Plasantada Gözlenen Makroskobik Değişiklikler	30
2.11. Hipotez	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1. Doku Temini ve Hazırlanması	32
3.1.1. İmmünoflorasan Boyama Tekniği İçin Doku Hazırlanması	32
3.1.2. Western Blot Tekniği İçin Lizat Hazırlama	32
3.2. İmmünoflorasan Boyama Protokolü	33
3.3. SDS-PAGE Western Blot Protokolü	36
3.3.1. Protein Miktarının Belirlenmesi	36
3.3.2. SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve İmmün Blot	36
3.4. qRT -PCR (Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Protokolü	39
3.4.1. Hedef mRNA 'ların Kantitatif Düzeylerinin Belirlenmesi	39
3.4.2. DNaz Uygulaması	40
3.4.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi	41
3.4.4. qRT-PCR Uygulaması	42
3.5. İstatiksel Analiz	43
4. BULGULAR	45
4.1. Deney Gruplarının Verilerinin Karşılaştırılması	45
4.2. İmmünoflorasan Boyama Bulguları	46
4.2.1. Fibronektin ve HIF Proteinlerinin (HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α) Çiftli İmmünoflorasan Boyanmaları	46
4.2.2. β 3 integrin ve HIF Proteinlerinin (HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α) İkili İmmünoflorasan Boyanmaları	58
4.2.3. Fosfo-MAPK3/1 ve HIF Proteinlerinin (HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α) İkili İmmünoflorasan Boyanmaları	67
4.3. Western Blot Analizi Bulguları	76
4.4. qRT-PCR Analizi Bulguları	80
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	91

KAYNAKLAR

92

ÖZGEÇMİŞ

120



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	İkili boyanan primer antikorlar	35
Tablo 3.2.	İmmünofloresan analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar ve dilüsyonları	35
Tablo 3.3.	Western Blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar ve dilüsyonlar	39
Tablo 3.4.	qRT-PCR için kullanılan oligonükleotid sekansları	43
Tablo 4.1.	PE ve kontrol gruplarına ait hasta verileri	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	İnsan term plasentasının dış görünümünün çizimi	4
Şekil 2.2.	İlk trimester ve term villuslarının içeriği ve farklılıkları	6
Şekil 2.3.	Term plasentasındaki fibrinoid tabakaları	8
Şekil 2.4.	Villus ağacı ve villus tiplerinin enine kesitleri	9
Şekil 2.5.	Normoksi ve hipoksi durumlarında HIF proteinlerinin reaksiyonlarının şematik gösterimi	14
Şekil 2.6.	Blastosistten oluşan iki ayrı hücre popülasyonu ve kaynaklık ettikleri kök hücre ve yapıların şematik çizimi	14
Şekil 2.7.	TKH'lerin SpT'ler ve TDH'lere farklılaşmalarının şematik çizimi	15
Şekil 2.8.	İntegrin ailesinin şematik çizimi	20
Şekil 2.9.	TKH'lerin HIF'e bağımlı olarak farklılaşma modeli	24
Şekil 2.10.	ESM aracılığıyla aktive olan TKH'lerin, MAPK sinyal iletim yolağı ile etkileşiminin HIF'i aktive etmesinin şematik çizimi	25
Şekil 4.1.	Kontrol plasentaların desidua bazalis bölümünde fibronektin ve HIF çiftli immünoflorasan boyanmaları	47
Şekil 4.2.	PE plasentaların desidua bazalis bölümünde fibronektin ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları	48
Şekil 4.3.	Kontrol ve PE plasentaların desidua bazalis bölümünde fibronektin immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik	49

- Şekil 4.4.** Kontrol ve PE plasentaların desidua bazalis bölümünde HIF 50 proteinlerinin immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik
- Şekil 4.5.** Kontrol plasentaların koryonik plak bölümünde fibronektin ve HIF 51 proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları
- Şekil 4.6.** PE plasentaların koryonik plak bölümünde fibronektin ve HIF 52 proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları
- Şekil 4.7.** Kontrol ve PE plasentaların koryonlarındaki fibronektin 53 immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik
- Şekil 4.8.** Kontrol ve PE plasentaların koryonlarında HIF proteinlerinin 53 immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik
- Şekil 4.9.** Kontrol plasentaların villuslarında fibronektin ve HIF proteinlerinin 55 çiftli immünoflorasan boyanmaları
- Şekil 4.10.** PE plasentaların villuslarında fibronektin ve HIF proteinlerinin çiftli 56 immünoflorasan boyanmaları
- Şekil 4.11.** Kontrol ve PE plasentaların villuslarında fibronektin 57 immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik
- Şekil 4.12.** Kontrol ve PE plasentaların villuslarında HIF proteinlerinin 57 immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik
- Şekil 4.13.** Kontrol plasentaların desidua bazalis bölümlerinde $\beta 3$ integrin ve 59 HIF çiftli immünoflorasan boyanmaları
- Şekil 4.14.** PE plasentaların desidua bazalis bölümlerinde $\beta 3$ integrin ve HIF 60 çiftli immünoflorasan boyanmaları

- Şekil 4.15.** Kontrol ve PE plasentaların desidua bazalis bölümlerinde $\beta 3$ integrin 61
immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik
- Şekil 4.16.** Kontrol plasentaların koryonik plak bölümündeki $\beta 3$ integrin ve HIF 62
proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları
- Şekil 4.17.** PE plasentaların koryonik plak bölümündeki $\beta 3$ integrin ve HIF 63
proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları
- Şekil 4.18.** Kontrol ve PE plasentaların koryonik plak kısmında $\beta 3$ integrin 64
immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik
- Şekil 4.19.** Kontrol plasentaların villuslarında $\beta 3$ integrin ve HIF proteinlerinin 65
çiftli immünoflorasan boyanmaları
- Şekil 4.20.** PE plasentaların villuslarında $\beta 3$ integrin ve HIF proteinlerinin çiftli 66
immünoflorasan boyanmaları
- Şekil 4.21.** Kontrol ve PE plasentaların villuslarında $\beta 3$ integrin 67
immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik
- Şekil 4.22.** Kontrol plasentaların desidualarında Fosfo-MAPK3/1 ve HIF 68
proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları
- Şekil 4.23.** PE plasentaların desidualarında Fosfo-MAPK3/1 ve HIF 69
proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları
- Şekil 4.24.** Kontrol ve PE plasentaların desidualarında fosfo-MAPK3/1 70
immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik
- Şekil 4.25.** Kontrol plasentaların koryonlarında Fosfo-MAPK3/1 ve HIF 71
proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları
- Şekil 4.26.** PE plasentaların koryonlarında Fosfo-MAPK3/1 ve HIF 72
proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları

Şekil 4.27.	Kontrol ve PE plasentaların koryonlarında fosfo-MAPK3/1 immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik	73
Şekil 4.28.	Kontrol plasentaların villuslarında Fosfo-MAPK3/1 ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları	74
Şekil 4.29.	PE plasentaların villuslarında Fosfo-MAPK3/1 ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları	75
Şekil 4.30.	Kontrol ve PE plasentaların villuslarında fosfo-MAPK3/1 immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik	76
Şekil 4.31.	Kontrol ve PE plasentalarda fibronektin proteini Western Blot analizi sonucu	77
Şekil 4.32.	Kontrol ve PE plasentalarda $\beta 3$ integrin proteini Western Blot analizi sonucu	78
Şekil 4.33.	Kontrol ve PE plasentalarda fosfo-MAPK3/1 ve MAPK3/1 proteinlerinin Western Blot analizi sonuçları	79
Şekil 4.34.	Kontrol ve PE plasentalarda HIF proteinlerinin Western Blot analizi sonuçları	80
Şekil 4.35.	Kontrol ve PE plasentaların fibronektin qRT-PCR analizi sonuçları	81
Şekil 4.36.	Kontrol ve PE plasentaların $\beta 3$ integrin qRT-PCR analizi sonuçları	81
Şekil 4.37.	Kontrol ve PE plasentaların MAPK1 qRT-PCR analizi sonuçları	82
Şekil 4.38.	Kontrol ve PE plasentaların MAPK3 qRT-PCR analizi sonuçları	82
Şekil 4.39.	Kontrol ve PE plasentaların HIF (HIF-1 α , HIF-1 β ve HIF-2 α) qRT-PCR analizi sonuçları	83

SİMGELER ve KISALTMALAR

ARNT: Aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator

bHLH: Bazik heliks-loop-heliks

CK7: Sitokeratin 7

DUSP9: Çift özgüllük fosfataz 9

ERK: Ekstrasellüler sinyallerle aktive olan kinaz

ESM: Ekstrasellüler matriks

EVT: Ekstravillöz trofoblast

FAK: Fokal adhezyon kinaz

GCM1: Glial cells missing 1

hCACTH: Human koryonik adreno-kortikotropin

hCG: Human koryonik gonadotropin

hCS: Human koryonik somatomammotropin

hCT: Human koryonik tirotropin

HIF: Hipoksiyle indüklenen faktör

hPL: Human plasental laktojen

HRE: Hipoksiye yanıt elemanı

IUGR : İntrauterin büyüme geriliği

İHK : İç hücre kütlesi

İİV: İmmatür intermediyet villus

JNK: c-Jun NH2-terminal kinaz

KV: Kök villus

Limk1: Lim domain kinase 1

MAPK: Mitojenin aktivelediği protein kinaz

MİV: Matür intermediyet villus

MKH: Mezenşimal kök hücre

MMP: Matriks metalloproteaz

MV: Mezenşimal villus

NK hücre: Doğal öldürücü hücre

PBS: Fosfat tamponlu tuz

PE: Preeklampsi

PHD: Prolil hidroksilaz domeyn

pVHL: Protein Von Hippel-Lindau

RTK: Reseptör tirozin kinaz

SpT: Spongiyotrofoblast

TBS: Tris tamponlu tuz

TDH: Trofoblastik dev hücre

TE: Trofoektoderm

TKH: Trofoblastik kök hücre

TV: Terminal villus

VCAM: Vasküler hücre adezyon molekülü

1. GİRİŞ

Plasentasyon, trofoblast hücrelerinin, uterusu ve anne damarlarını istila ettiği benzersiz bir süreçtir. Bu etkileşimlerin nasıl gerçekleştiği, gebelik sonucunu hayati ölçüde belirler (Cartwright ve ark., 2010).

Başlangıçta sadece bir iskele olarak düşünülen ESM, hücre kaderinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. ESM-hücre etkileşimleri, sinyal yolları aracılığıyla hücre yanıtını değiştirebilir. Bu etkileşimler karşılıklı olacak şekilde gerçekleşerek, hücrelerden aldıkları uyarılara yanıt olarak ESM'i yeniden modelleme yeteneğine sahiptirler (Watt ve Driskell, 2010). ESM bağımlı kök hücre-niş etkileşimleri, farklılaşmayı teşvik ya da inhibe etmek için başka yollarla birleşebilir (Eshghi ve ark., 2007). ESM'nin adezyon molekülleri olan integrinler yoluyla hücre kaderi belirlenmesini gerçekleştirebildiği gösterilmiştir (Votteler ve ark., 2010; Kim ve ark., 2011).

Reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu MAPK yolağındaki proteinlerden MAP2K1 ve MAPK3/1'in, farelerde plasentasyonun kritik düzenleyicileri olduğu gösterilmiştir (Giroux ve ark., 1999; Hatano ve ark., 2003; Saba-El-Leil ve ark., 2003; Bissonauth ve ark., 2006).

Hücrel hipoksik yanıtın önemli bir düzenleyicisi olan Hipoksiyle indüklenen faktörün (HIF) sinyal yolağındaki birçok genin eksikliği, plasental gelişimde anormalliklere neden olur (Gnarra ve ark., 1997; Adelman ve ark., 2000; Cowden Dahl, Fryer, ve ark., 2005; Maltepe ve ark., 2005; Takeda ve ark., 2006). HIF-içermeyen plasentalarda hücre kaderi belirlenmesinde bozulmalar ortaya çıkmaktadır. Fare plasentalarında HIF ekspresyonunun spongiyotrofoblast (SpT) ve trofoblastik dev hücre (TDH) oluşumu için zorunlu olduğu ve sinsisyotrofoblasta farklılaşmayı belirlediği bulunmuştur (Cowden Dahl, Fryer, ve ark., 2005; Maltepe ve ark., 2005).

Tedavi edilmezse eklampsiye ve ölüme sebebiyet verebilen ciddi bir gebelik komplikasyonu olan PE'nin etiolojisi tam olarak bilinmemesine rağmen, birçok çalışmada O₂ taşınımı ve ESM yeniden modellenmesinde bozukluklar ve yetersiz

trofoblast invazyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Estelles ve ark., 1989; Estelles ve ark., 1994; Genbacev ve ark., 1996; Graham ve McCrae, 1996; Genbacev ve ark., 1997; Caniggia, Winter, ve ark., 2000; Narumiya ve ark., 2001; Merchant ve Davidge, 2004; Myers ve ark., 2005; Redman ve Sargent, 2005; Rolfo ve ark., 2010).

Fare TKH'lerde ESM bağımlı HIF-1 α stabilizasyonu ve TDH farklılaşmasının, MAPK yolağı aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (Choi ve ark., 2013). Ancak insan plasentasında bu mekanizma bilinmemektedir. Bunun yanısıra, PE plasentalarda bu yolağın işleyip işlemediği hakkında da veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda amacımız fare kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen ESM indüklü MAPK-HIF ilişkisini normal ve PE insan plasentalarında incelemektir.

Bu amaçla, normal ve PE term plasentalarda ESM indüklü MAPK-HIF ilişkisini inceleyebilmek adına daha önce fare TKH çalışmasında kullanılan yolak elemanları, ikili immünoflorasan boyamalar, Western blot ve qRT-PCR analizleriyle değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Plasenta

Plasenta memelilerde görülen, anne ve embriyo/fetüs arasında bağlantı sağlayan geçici bir organdır. Plasentanın fetüs gelişimi için hayati öneme sahip fonksiyonları vardır. Bunlardan bazıları; fetüse gerekli oksijen ve besin maddelerinin sağlanması, metabolik artıkların ve karbondioksitin fetüsten uzaklaştırılmasının yanı sıra gebelik ve doğum ile ilişkili birtakım hormonların (Plasentadan sentezlenen hormonlar: protein hormonlardan human koryonik gonadotropin (hCG), human plasental laktojen (hPL), human koryonik tiotropin (hCT), human koryonik somatomammotropin (hCS), human koryonik adrenokortikotropin (hCACTH) ve steroid hormonlardan progesteron ve östrojen) sentezlenmesidir. Gebeliğin devamı ve normal fetüs gelişiminin olabilmesi, bu geniş kapsamlı görevlere bağlıdır (Sadler, 2004; Benirschke ve ark., 2006; Burton ve ark., 2006).

2.2. Term Plasentasının Yapısı

Fetüs büyüdükçe plasenta da büyümektedir. Plasentanın genişlemesi ve kalınlaşması, gebeliğin yaklaşık 20. haftasına kadar hızlı şekilde devam eder (Benirschke, 1972; Benirschke ve ark., 2006). 4. ayın sonunda villus sistemi tamamlandığında plasenta tam şeklini alır (De Wolf ve ark., 1980). Gelişimini tamamlamış bir plasenta desiduanın %15-30'unu kaplar ve ağırlığı fetüs ağırlığının yaklaşık 1/6'sıdır. Term plasentası ortalama 500 gr ağırlığında, 18-20 cm çapında, 2-2,5 cm kalınlığındadır ve 10-20 kotiledondan oluşur (Benirschke, 1972; Benirschke ve ark., 2006). Term plasentasındaki villusların toplam yüzeyi (anne fetüs arasında madde değişim alanı) 10-15 m²'dir. Plasentadaki intervillöz aralıkların hacmi ise tahminen 150-250 ml'dir (Fox, 1995). İnsan term plasentası, koryon kesesi tarafından oluşturulan fetal kısım ve desidua bazalisten oluşan maternal kısım olmak üzere iki bölümden oluşur (Şekil 2.1.).

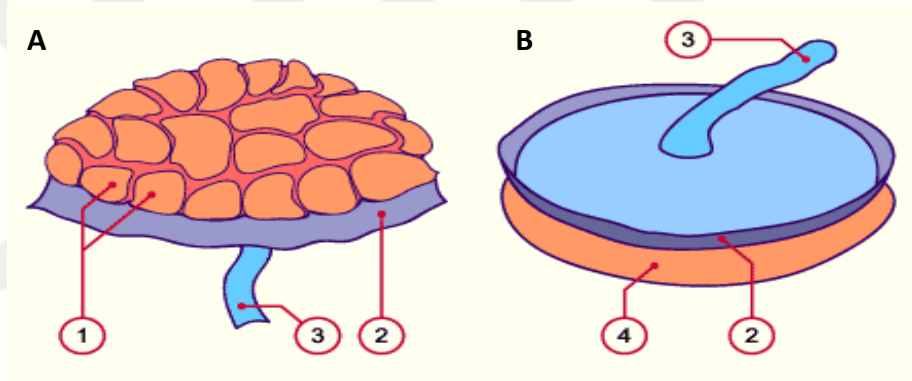
2.2.1. Plasentanın Fetal Kısmı

Koryon frondozumun oluşturduğu koryonik plak ve buna bağlı villuslardan meydana gelir. Villuslar, maternal kanın dolaştığı intervillöz boşluğa uzanır. Koryonik plağın

intervillöz boşluğa bakan yüzü sinsisyotrofoblast tabakası ile fetüse bakan yüzü ise amniyon epitelile örtülüdür.

2.2.2. Plasentanın Maternal Kısmı

Bazal plak ve plasental septumlardan meydana gelir. Bazal plak; ekstravillöz trofoblastlar (EVT'ler), desidual hücreler, maternal immün hücreler (Doğal öldürücü (NK) hücreler v.b.), bol miktarda ESM ve fibrinoid içerir (Huppertz, 2008). Bazal plaktan sonra yine maternal ve fetal dokuların karışımından oluşan plasental yatak vardır. Ancak, plasental yatak bazal plak gibi doğum sırasında atılmaz. Bazal plak ve plasental yatağa birlikte bağlantı zonu ismi verilir (Benirschke ve ark., 2006).



Şekil 2.1. İnsan term plasentasının dış görünümünün çizimi. A: Maternal yüz. B: Fetal yüz. Koryonik plak ve göbek kordonu, amniyon ile örtülüdür. 1- Kotiledon, 2- Amniyon, 3- Göbek kordonu, 4- Desidua (<http://www.embryology.ch/anglais/fplacenta/villosite01.html>).

İnsan plasentası hemokoryal yapıdadır. Bu tipteki plasentaların başlıca iki özelliği vardır; a- maternal ve fetal dolaşım birbirine karışmaz ve b- intervillöz aralıktaki maternal kan doğrudan villus yüzeyindeki trofoblastlarla temastadır. Maternal ve fetal kanın birbirine karışmasını önleyen yapı plasental bariyerdir. Plasental bariyer başlangıçta şu katmanlardan meydana gelir; 1- Sinsisyotrofoblast 2- Sitotrofoblast (ilk trimesterde kesintisiz, sonrasında kesintilidir) 3- Trofoblastik bazal membran 4- Villöz bağ dokusu 5- Fetal kapiller endoteli bazal membranı 6- Fetal kapiller endoteli. Plasental bariyer moleküllerin transportu için, molekül belirli büyüklükte, şekilde ve yükte olduğu zaman gerçek bir bariyer gibi hareket eder. Anne kanındaki bazı hormonlar, metabolitler ve toksinler embriyo ya da fetüsü etkileyecek konsantrasyonlarda plasental bariyerdan geçemez. Anne kanındaki çoğu ilaç ise plasental bariyeri aşıp fetüse geçebilir (Benirschke ve ark., 2006).

2.3. Villusların Yapısı

Villuslar makroskopik olarak ağaç şeklindedir. Her bir villus, plasentanın koryonik plağından kalın bir kök halinde çıkar ve giderek dallanır. Villusların çoğunluğunu oluşturan yüzen villuslar intervillöz aralıkta serbestçe dolaşırken, demirleyici villuslar ise desiduaya tutunur. Plasental gelişim süresince, villus tipleri yapısal ve fonksiyonel olarak farklılıklar sergilese de tüm villusların temel yapıları aynıdır (Şekil 2.2.):

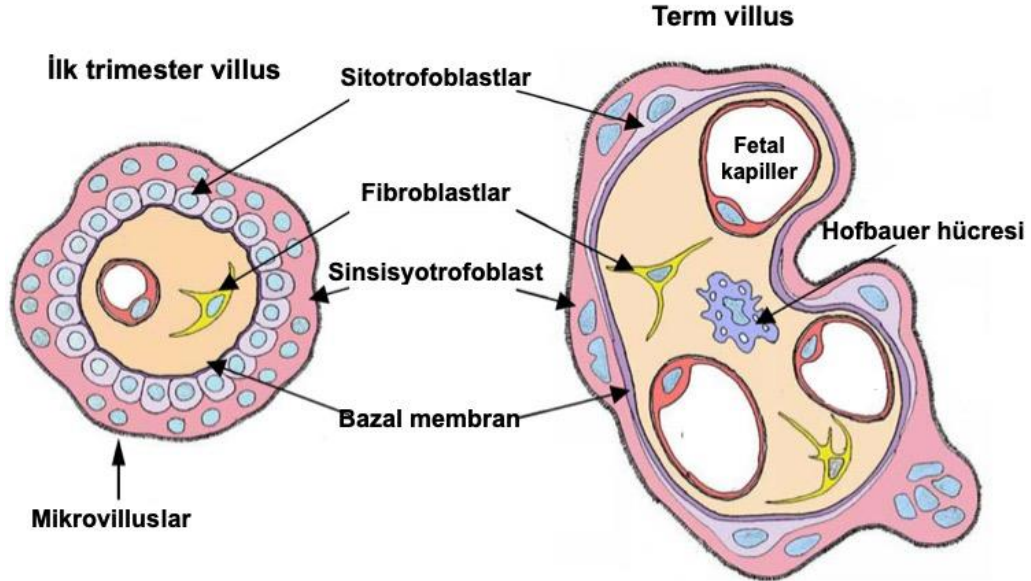
a) En dışta kesintisiz bir sinsisyotrofoblast tabakası bulunur. Sinsisyotrofoblastın proliferatif aktivitesi yoktur ve sitotrofoblastların füzyonundan gelişir. Sitotrofoblast nükleuslarının kaynaşması, hücre zarlarının kaybolması ve çeşitli morfolojik değişikliklere uğramalarıyla meydana gelen çok nükleuslu bir hücre kitlesidir. Başlangıçta büyük, ovoid ve ökromatini fazla olan nükleuslu hücreler iken: sıkı kromatin yapısı içeren, küçük nükleuslu hücreler haline gelir. Sinsisyotrofoblastın intervillöz aralığa bakan yüzü, yüzey alanını artıran mikrovilluslarla döşelidir. Mikrovilluslarla birlikte toplam villus yüzey alanı termde 7,67 kat artar. Golgi kompleksi, granüler ve agranüler endoplazmik retikulum, mitokondri ve lipid damlalarınca zengindir. Sinsisyotrofoblast tabakasından östrojen, progesteron, hCG ve laktojenler salgılanır (Benirschke ve ark., 2006).

b) Sinsisyotrofoblastın altında proliferasyon yeteneğine sahip hücreler olan sitotrofoblastlar (Langhan's hücreleri) bulunur. Sitotrofoblastlar, sinsisyotrofoblastı oluşturan, ökromatini fazla olan büyük nükleuslu, kübik yapıdaki hücrelerdir. Sitoplazmaları glikojen, vakuoller ve az miktarda organeller içerir. Sitotrofoblastlar da steroid hormonları ve hCG üretir.

c) Trofoblastik bazal membran, sinsisyotrofoblast ve sitotrofoblastları villöz stromadan ayırır. Kalınlığı ortalama 20-50 nm arasındadır.

d) Villusun ortasında bulunan villöz stroma, villus tipine göre farklılık gösteren bağ dokusu hücreleri, bağ dokusu lifleri, fetal damarlar, damarları çevreleyen kontraktıl hücreler ve fetal makrofajlardan (Hofbauer hücreler) oluşur. Villöz stroma, fetal mezenşim kökenlidir. Gebeliğin 2. ayı sonuna kadar villöz stromada en çok bulunan hücre tipi, farklılaşmamış stromal hücreler olan mezenşimal hücrelerdir. Mezenşimal

hücreler; küçük, iğsi şekilli ve az sitoplazmalıdır. 3. aydan itibaren stromal yapı ve içerikte değişiklikler başlar. Mezenşimal hücreler villusların merkezi kısımlarından başlayıp perifere yayılacak şekilde retikulum hücrelerine ve fibroblastlara farklılaşmaya başlar. Retikulum hücrelerinin uzamış hücre gövdeleri vardır ve bunlardan birçok uzun, ince sitoplazmik uzantılar çıkar. Komşu retikulum hücrelerinin sitoplazmik uzantıları birbiriyle birleşerek stromal kanalları oluşturur. Fibroblastlar ise genellikle büyük damarların çevrelerine yerleşen, villöz stromanın sabit bağ dokusu hücreleridir. Retikulum hücrelerinin aksine fibroblastların uzantıları kısa, kalın ve az sayıdadır. Gebeliğin geç evrelerinde ise mezenşimal hücreler kontraktil özellikteki miyofibroblastlara farklılaşır (Baergen, 2005). Fetal damarları çevreleyen miyofibroblastlar, fetal damarların kontraksiyon ve dilatasyonunu ve böylece fetal dolaşımı düzenler. Hofbauer hücreleri makrofaj karakterinde, yuvarlağa benzer şekilli, periferik nükleuslu ve vakuollü sitoplazmalı hücrelerdir. Villöz stromada az miktarda mast hücresi de vardır. Bunlara ek olarak, villöz stroma farklı tip ve büyüklükte fetal damarlar içermektedir. Büyük villuslardaki damarları genellikle arter ve venler oluştururken, periferik villus dallarındaki damarların çoğu kapiller ve sinüzoiddir (Benirschke ve ark., 2006).



Şekil 2.2. İlk trimester ve term villuslarının içeriği ve farklılıkları (Malassine ve ark., 2008).

2.4. Olgunlaşan Plasentada Meydana Gelen Değişiklikler

Fetüs büyüdükçe, artan metabolik ihtiyaçları karşılamak üzere uteroplasental dolaşımın etkinliğini arttırmak için plasentada histolojik değişiklikler oluşur. Bu değişiklikler; sinsisyotrofoblast kalınlığının azalması, villöz sitotrofoblastların kesintiye uğraması, Hofbauer hücrelerinde artış, villöz stromada azalma, kapiller sayısının artması ve bunların sinsisyal yüzeye yaklaşmasıdır (Şekil 2.2.) (Cunningham ve ark., 1994).

Trofoblastlar, plasental elemanlar arasında yapısal, fonksiyonel ve gelişimsel olarak en çok değişiklik gösterendir. Gebelik ilerledikçe villöz sitotrofoblastlar büyük ölçüde ortadan kalkar ve term plasentasının villus yüzeyinin yalnızca %20'sinde kalır (Kingdom ve Kaufmann, 1999). Sinsisyotrofoblast kalınlığı da ortalama 20 µm iken termde 3.5 µm'ye düşer (Benirschke ve ark., 2006). Villuslar dallandıkça hacimleri azalır. Sinsisyum incelendiğinde, fetal damarlar daha belirginleşerek yüzeye iyice yaklaşır (Mayhew ve Simpson, 1994).

Bu değişikliklerle ilk trimesterde 50-100 µm olan materno-fetal difüzyon mesafesi, termde yaklaşık 4-5 µm'ye iner. Termde plasental bariyerin en ince kısmı, sinsisyotrofoblast, birbiriyle kaynaşmış trofoblastik ve fetal endotel bazal membranları ve fetal kapiller endoteli tabakalarından meydana gelir. Böylelikle fetüs kapillerindeki kan, intervillöz boşluktaki maternal kan ile mümkün olduğunca yaklaşır (Kingdom ve Kaufmann, 1999).

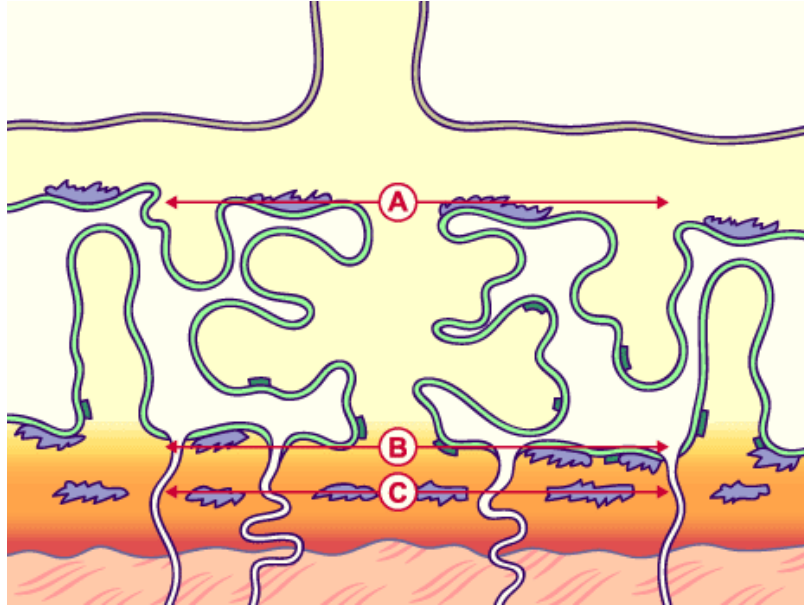
Villöz stroma da plasental olgunlaşmayla birlikte değişime uğrar. Erken dönem plasentasında villöz stromada gevşek intersellüler matriks bulunurken, terme doğru villöz stroma sıkılaşır. Ayrıca, terme doğru fetal makrofajlar olarak bilinen Hofbauer hücrelerinde artış görülür.

Üçüncü trimesterde çok sayıda sinsisyotrofoblast nükleusu, koryon villusların yüzeyinde sinsisyal düğüm adı verilen nükleus birikimlerini oluşturur. Sinsisyal düğümlerden kopan parçalar villuslararası boşluktan maternal kan dolaşımına katılır (Benirschke ve ark., 2006).

Gebeliğin ilerleyen zamanlarında, plasentada fibrinoid birikim meydana gelir. Fibrinoid; fibrin, plasental salgılar ve ölü trofoblast hücrelerinin oluşturduğu, hücreden yoksun eozinofilik birikimdir. Fibrinoidin maternal ve fetal elemanlarca üretildiği belirlenmiştir. 37 haftanın üstündeki gebeliklerin %22'sinde makroskopik olarak gözlenebilen fibrinoid birikim vardır. Plasentanın birçok bölgesinde fibrinoid birikim oluşabilir:

- Düz koryonda,
- Villusların içinde,
- Maternal ve fetal damarlarda,
- Plasental septumlarda,
- Bazal plakta (Rohr ve Nitabuch fibrinoid tabakaları),
- Koryonik plağın intervillöz aralığa bakan yüzünde (Langhans fibrinoid tabakası).

Bazal plaktaki fibrinoid birikimler olan Rohr ve Nitabuch tabakaları ve Langhans fibrinoid tabakası tüm plasentalarda bulunan yapılardır (Şekil 2.3.). Rohr tabakası, bazal plağın intervillöz aralıkla temas eden kısmıdır. Nitabuch tabakası ise daha derinde maternal ve fetal hücrelerin karşılaştıkları bölgededir (Baergen, 2005).

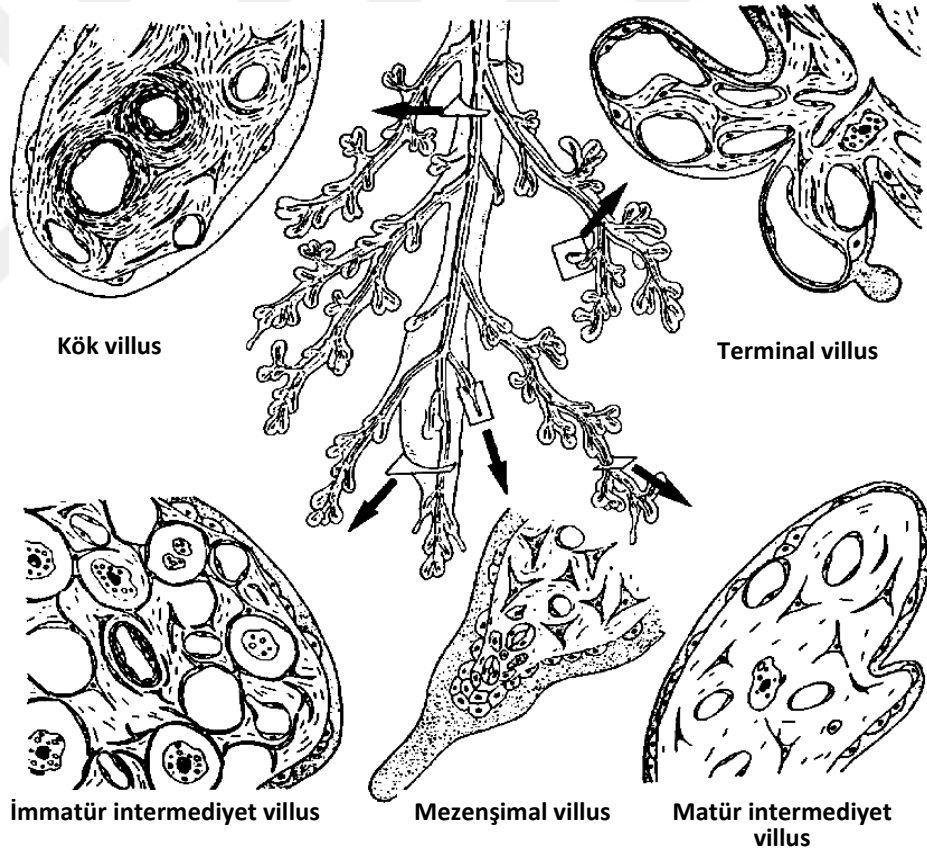


Şekil 2.3. Term plasentadaki fibrinoid tabakaları. A. Langhans fibrinoid tabakası B. Rohr fibrinoid tabakası C. Nitabuch fibrinoid tabakası. Mor renkle gösterilenler fibrinoid birikimler, turkuaz renkle gösterilen sinsisyotrofoblast tabakası, sarı ve turuncu renkle gösterilenler kısım plasenta, sinsisyotrofoblast yüzeyine komşu beyaz renkli alanlar ise intervillöz aralıktır (<http://www.embryology.ch/anglais/fplacenta/villosite05.html>).

Fibrinoid birikimin birkaç rolü olduğu düşünülmektedir: a) mekanik destek olma, b) intervillöz dolaşımı düzenleme, c) fibrinoidin bir bileşeni olan sialik asidin fetal antijenleri maternal hücrelerden koruması. Fibrinoid birikim plasentalarda farklı seviyelerde izlenebilir ve fazla olması bir anormalliğin göstergesidir (Benirschke ve ark., 2006).

2.5. Villus Ağacının Yapısı

Bir villus ağacındaki villuslar: büyüklükleri, stroma karakterleri ve içerdikleri fetal damarların özelliklerine göre 5 çeşittir (Şekil 2.4.) (Kingdom ve Kaufmann, 1999; Castellucci ve ark., 2000; Benirschke ve ark., 2006);



Şekil 2.4. Villus ağacı ve villus tiplerinin enine kesitleri (Fox ve ark., 2003).

2.5.1. Mezenşimal Villus (MV)

Villus ağacının en ilkel villusudur ve intermediyet villusların üzerinde tomurcuklanma şeklinde bulunur. Sitotroblast içeriği çok fazla olan kalın trofoblastik yüzeyleri vardır. Gevşek stromasında kollajen liflerin ağ şeklinde sardığı mezenşimal ve Hofbauer

hücreleri bulunur. Fetal kapillerler belirgin değildir. MV'ler gebeliğin ilk evrelerinde sayıca fazla olup terme doğru giderek azalır. Gebeliğin ilk haftalarında, MV'ler villus proliferasyonunun yanı sıra materno-fetal madde değişimi ve hemen hemen bütün endokrin aktivitelerin gerçekleştiği bölgelerdir.

2.5.2. İmmatür İntermediyet Villus (İİV)

Kök villusların ucunda bulunan olgunlaşmamış, şişkin villustur. MV'ye benzer şekilde sitotrofoblast sayısı çok olan kalın bir trofoblastik tabaka ile kaplıdır. En belirgin özelliği, yelken-benzeri stromal hücrelerle sınırlandırılan birçok stromal kanalın gözlendiği retiküler tipteki stromasıdır. Stromal kanallar içinde, Hofbauer hücreleri ve bir miktar plasental sıvı bulunurken stromal kanalların arasında fetal damarlar ve kollajen lifler yerleşmiştir. MV'lerden köken alan İİV'ler, kök villuslara farklılaşır. 14. ile 20. haftalar arasında yaygın şekilde bulunan İİV'ler ilk iki trimester boyunca, temel materno-fetal madde değişimi bölgeleridir.

2.5.3. Kök Villus (KV)

Villus ağacının köküdür. Çapları 80 µm'den birkaç milimetreye kadar değişen KV'ler, villus ağacındaki yapılara mekanik destek verir. Kalın bir trofoblastik tabaka vardır. İçinde çoğunlukla fibroblastların ve az miktarda da makrofajların bulunduğu, yoğun kollajen lif demetleri ile karakterize olan fibröz bir stroması vardır. Stromanın merkezinde miyofibroblastlar yaygın iken, periferde ise fibroblastlar yerleşmektedir.

KV'nin ortasında, adventisya ve medya tabakaları gözlenebilen arter, ven, geniş arteriyol ve venüller bulunur. Fetal damarlar ile intervillöz aralıktaki maternal kan arasında geniş mesafe olduğundan, bu damarlar madde alışverişinde aktif rol oynamaz. KV'ler şu yapılardan meydana gelir:

- a) Villus ağacını koryonik plağa bağlayan, villus ağacının ana kökleri olan truncus chorii,
- b) Ana kökten gelişen, 4 nesil kısa ve kalın dallanmalar olan rami chorii,
- c) Villus ağacının periferine uzanan, 2 ile 30 arası nesil, daha ince ve düzensiz dallanmalar olan ramuli chorii,

- d) KV'lerin spesifik bir grubu olan ve trofoblastik hücre kolonlarıyla bazal plağa tutunan demirleyici villuslar.

Bu yapıların çapları, 3 mm (koryonik plak yakınındaki bazı truncus chorii'ler) ile 80 µm (en küçük ramuli chorii) arasında değişir.

2.5.4. Matür İntermediyet Villus (MİV)

Villus ağacının uzun, ince ve çapları 60-160 µm arasında olan periferik dallarıdır. Stroması, düzensiz, gevşek bağ dokusu, lif demetleri ve bağ dokusu hücrelerinden meydana gelir. MİV'lerde adventisya ve medya tabakaları tespit edilemeyen fetal arteriyol, venül ve kapillerler bulunur. Gelişmiş fetal damarlanmaları ve geniş yüzey alanı sayesinde, materno-fetal madde değişiminde çok önemlidir. Gebeliğin son dönemi olan term döneminin başlamasıyla MV'lerin farklılaşmasıyla oluşur. Terminal villuslara dönüşür. MİV'lere farklılaşmanın gecikmesi; MV ve İİV'lerin çoğunlukta olmasına, villus ağacının çok büyümesine ancak fonksiyonel olarak yetersiz bir plasentaya sebebiyet verir. Erkenden MİV'lere dönüşüm ise; erkenden farklılaşmaya, çok küçük bir plasentaya ve plasentanın çok farklılaşmış olmasına rağmen yeterli madde değişimi yüzeyine sahip olmamasına neden olur.

2.5.5. Terminal Villus (TV)

MİV'lerin genişlemiş sinüzoidler içeren, çapları 30–40 µm arasındaki son kısımlarıdır. İnce bir sinsisyotrofoblast tabakasıyla örtülüdür. Stromasında lifler, stromal hücreler ve makrofajlar azdır. Stromasında 1-6 arasında kapiller bulunur. TV'lerde damarlanma yoğunudur ve materno-fetal difüzyon mesafesinin çok kısalmıştır (ortalama 3.7 µm). Bu nedenle, anne ile fetüs arasındaki madde değişimi çok hızlı ve etkilidir. TV'ler termde egemen konuma geçip villusların %30-40'ını oluşturur. Diğer villus tiplerinden farklı şekilde TV'ler, başka villuslardan farklılaşan aktif birimler değil, kapillerlerin ilmek oluşturmasıyla ortaya çıkan pasif yapılardır. TV'lerin oluşumu, MİV'lerdeki kapillerlerin uzayıp villusların boyunu aştığında, kapillerlerin bükülüp ilmekler oluşturmasıyla gerçekleşir. TV'lerin yapısı ince olduğundan, ilmekler yüzeyden intervillöz aralığa doğru üzüm-benzeri çıkıntılar meydana getirir.

Gebeliğin ilk haftalarında villus ağacında sadece MV'ler bulunur. İlk trimesterde villus ağacının gelişimi hızlı iken MV'ler ve İİV'ler gözlenir. Gebeliğin 20. haftasına gelmeden egemen villus tipi İİV'lerdir. Gebeliğin ortalarına kadar villus ağacı gelişirken, yapı olarak fazla değişim geçirmeden çoğalır. Fetal gelişimin plasental gelişimi aştığı gebeliğin ikinci yarısında, immatür villus tipleri (MV'ler ve İİV'ler) matür formlarına dönüşür. Term plasentasında ise, MİV'ler ve özellikle TV'ler yaygındır. Aktif büyümenin göstergesi olarak küçük gruplar halinde MV'ler bulunur. Bu plasental gelişim ve olgunlaşma süreçleri, plasentanın materno-fetal madde değişimi etkinliğini artırmak ve optimum hale getirmek amacıyla gerçekleşmektedir (Kingdom ve Kaufmann, 1999; Castellucci ve ark., 2000).

2.6. HIF

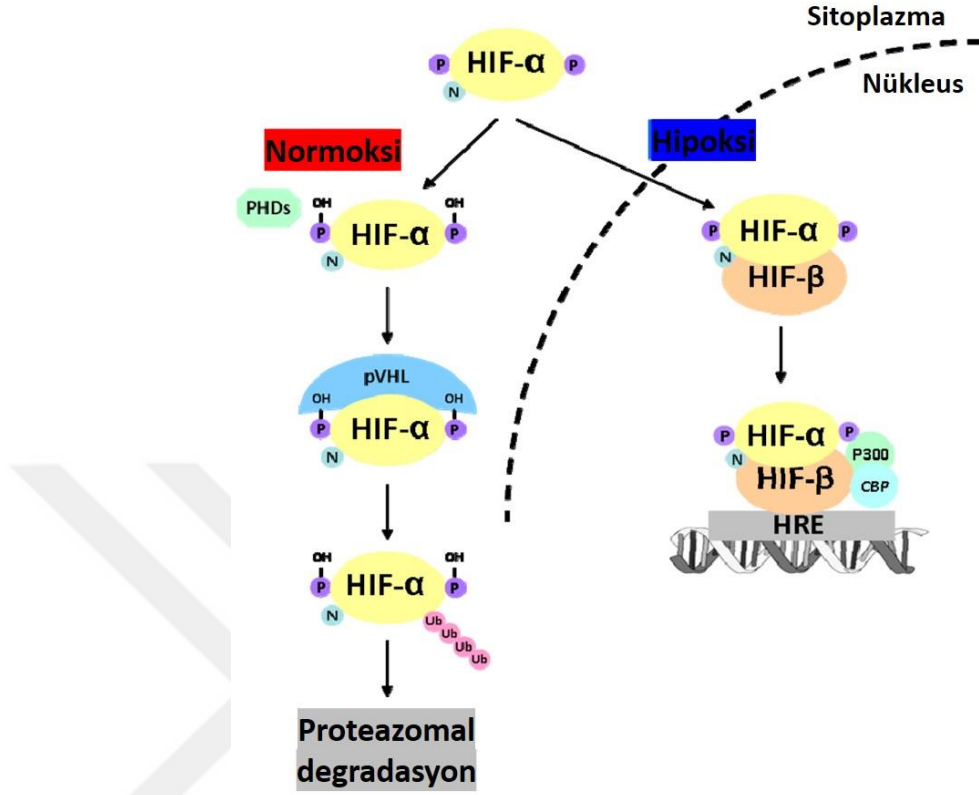
Atmosferdeki ve yetişkin dokulardaki oksijen düzeyleri karşılaştırıldığında; memelilerin gelişiminin önemli ölçüde düşük düzeydeki oksijenli ortamda gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Örneğin, atmosferik oksijen %21 iken memelilerin fallop tüpleri ve uteruslarındaki oksijen miktarı %1-3 arasındadır (Fischer ve Bavister, 1993; Catt ve Henman, 2000). In vitro döllenen insan embriyo kültürü için uygun oksijen miktarı ile ilgili çalışmalar, fizyolojik hipoksinin yararlarını doğrular niteliktedir (Waldenstrom ve ark., 2009). Ayrıca, yalnızca ilk trimesterden sonra, spiral arterler plasental yatağı maternal kanla pulsatil bir şekilde besler (Enders ve King, 1991). Bu yüzden, organogenez olaylarının tümü nispeten hipoksik koşullarda gerçekleşirken, hızlı plasental gelişimi de teşvik eder (Genbacev ve ark., 1997).

Oksijenin birçok kök hücre tipinin kendini yenileme ve farklılaşma süreçlerini düzenlediği bilinmektedir. Örneğin, hipoksinin hematopoetik, nöral ve mezenşimal kök hücreler gibi birçok farklı kök hücre tiplerinin kendini yenilemesini teşvik ettiği ayrıca farklılaşmalarını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bunun yanısıra endotel hücreleri de hipoksiye yanıt olarak proliferasyon olmaktadır (Phillips ve ark., 1995; Adelman ve ark., 1999; Das ve ark., 2010; Mohyeldin ve ark., 2010; De Filippis ve Delia, 2011; Suda ve ark., 2011). Oksijen; trofoblast proliferasyonu, farklılaşması ve invazyonunu da düzenlemektedir. Hipoksinin insan sitotrofoblastlarının proliferasyonunu stimüle ettiği ve invazif yönde farklılaşmalarını ise inhibe ettiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan yüksek

oksijenli ortamdaki insan plasentasında ise sitotrofoblastların proliferasyon özelliklerinin azalıp invazif özelliğe sahip olmaya başladıkları belirlenmiştir (Genbacev ve ark., 1996; Genbacev ve ark., 1997; Caniggia, Mostachfi, ve ark., 2000; Seeho ve ark., 2008). Fare TKH'lerinde de aynı durum geçerlidir (S. Zhou ve ark., 2011). Ayrıca, insan EVT'lerin invazyonunun düşük oksijenle inhibe olduğu gösterilmiştir (Crocker ve ark., 2005). Benzer şekilde, hipoksik ortamda villus eksplant kültüründe EVT filizlenmesinin azaldığı bulunmuştur (James ve ark., 2006).

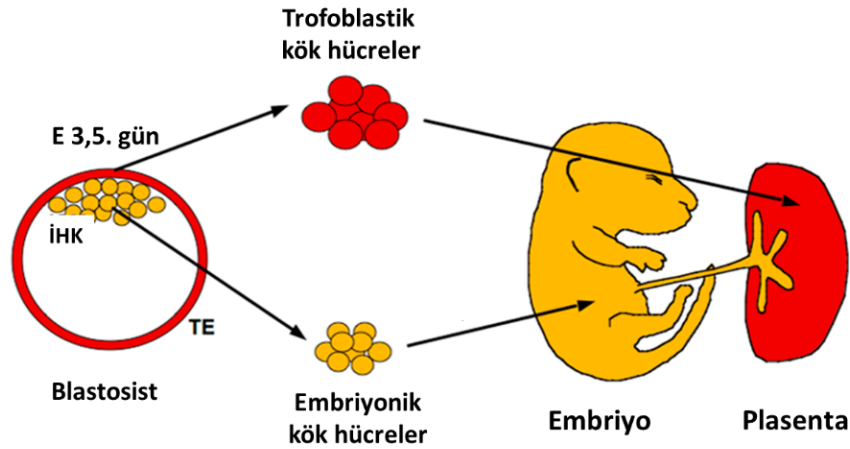
HIF, hücrel hipoksik yanıtın önemli bir düzenleyicisidir. HIF'ler bazik heliks-loop-heliks (bHLH) transkripsiyonel düzenleyici ailesi üyeleridir (Gu ve ark., 2000). Oksijen tarafından regüle edilen HIF- α ile HIF-1 β [aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator (ARNT)] alt ünitelerinden oluşan heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür (L. Chen ve ark., 2009). Hipoksi (%5'ten az oksijen bulunması), HIF- α 'nın (memelilerde HIF-1 α veya HIF-2 α) nükleer translokasyonunu ve nükleusta bulunan HIF-1 β ile dimerizasyon gerçekleştirerek HIF-1 veya HIF-2 komplekslerini oluşturmasını sağlar (G. L. Wang ve ark., 1995; Ema ve ark., 1997; Tian ve ark., 1997). Oluşan kompleks, hedef genlerin 5'-CGTG-3' ortak sekansına sahip hipoksiye yanıt elemanına (HRE) bağlanarak hedef genlerin ekspresyonu gerçekleştirilir (Dunwoodie, 2009; Patel ve ark., 2010; Pringle ve ark., 2010). Eritropoez, anjiyogenez, hücre proliferasyonu, apoptoz ve glukoz metabolizmasında rol oynayan birçok genin ekspresyonu HIF'ler tarafından düzenlenir (Semenza, 2000; Safran ve Kaelin, 2003; Rocha, 2007).

Memelilerde HIF-1 α ve HIF-2 α ekspresyonu hücrel oksijen konsantrasyonuna bağlıdır (Dunwoodie, 2009). Normoksik koşullarda, HIF-1 α ve HIF-2 α üzerindeki prolin kısımları, prolin hidroksilaz domeyn (PHD) proteinleri tarafından hidroksillenir. Hidroksillenen prolin kısımları protein Von Hippel-Lindau (pVHL) tarafından tanınan HIF- α , E3 ubiquitin ligaz enzimiyle proteazomal degradasyona uğrar (Maxwell ve ark., 1999; Cockman ve ark., 2000). Hipoksida ise HIF- α degradasyonundan sorumlu enzimler inhibe olur ve HIF- α stabilizasyonu sağlanarak hedef genlerin ekspresyonu gerçekleşir (Greer ve ark., 2012) (Şekil 2.5.).



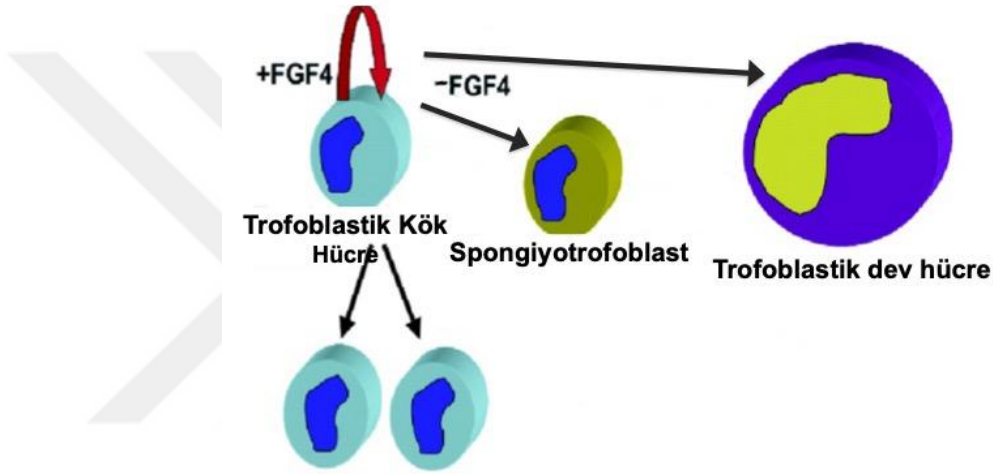
Şekil 2.5. Normoksi ve hipoksi durumlarında HIF proteinlerinin reaksiyonlarının şematik gösterimi (Nauta ve ark., 2014).

Farelerde plasenta oluşumu embriyonik 3,5. günde başlar (Rossant ve Tam, 2009). Morula kompaksiyonu sonrasında, iki ayrı hücre popülasyonu ortaya çıkar: dışta trofoektoderm (TE) ve içte iç hücre kütlesi (İHK) (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Blastosistten oluşan iki ayrı hücre popülasyonu ve kaynaklık etiketleri kök hücre ve yapıların şematik çizimi.

Fare blastosistlerinin TE'sinden izole edilen kök hücreler olan TKH'ler, plasentayı oluşturan diğer hücelere dönüşebilme yetenekleriyle, dönüştükleri hücrelerin fonksiyonlarını araştırmak ve plasental gelişimin açıklanması için ideal bir in vitro modeldir. TKH'ler kültürde sınırsız olarak çoğalırlar ve FGF4 büyüme faktörü hücre kültür ortamına ilave edilmediğinde, kendiliğinden iki ana plasental hücre türüne farklılaşırlar: invazif TDH ve onların öncülleri olan SpT (Şekil 2.7.) (Maltepe ve ark., 2010).



Şekil 2.7. TKH'lerin SpT'ler ve TDH'lere farklılaşmalarının şematik çizimi.

HIF-1 α ve HIF-2 α insan plasental gelişiminde yüksek ölçüde ekspresyon gösterir (Caniggia, Mostachfi, ve ark., 2000; Rajakumar ve Conrad, 2000). Benzer şekilde, hipoksik koşullardaki in vitro insan trofoblast ve plasental villus eksplant kültürlerinde de HIF-1 α ve HIF-2 α protein ekspresyonu vardır (Caniggia, Mostachfi, ve ark., 2000; Caniggia, Winter, ve ark., 2000; Rajakumar ve Conrad, 2000; Genbacev ve ark., 2001). HIF sinyal yolağındaki birçok genin (HIF-1 α , HIF-2 α , ARNT, PHD protein 2 ve VHL genleri) eksikliğinde plasental gelişimde anormallikler gözlenmiştir (Gnarra ve ark., 1997; Adelman ve ark., 2000; Cowden Dahl, Fryer, ve ark., 2005; Maltepe ve ark., 2005; Takeda ve ark., 2006). *Hif-1 α ^{-/-}* fare embriyolarında vasküler gelişimde anomaliler tespit edilmiştir (Iyer ve ark., 1998; Ryan ve ark., 1998). İlginç şekilde *Hif-1 α ^{-/-}* ve *Hif-2 α ^{-/-}* farelerde belirgin plasental defektler gözlenmemiştir. *Arnt^{-/-}* fareler ise yetersiz vitellüs kesesi oluşumu ve embriyonik damarlanma, azalmış hematopoez, kalp yetmezliği ve belirgin plasental anomaliler nedeniyle E10.5'da ölmüştür (Kozak ve ark.,

1997; Maltepe ve ark., 1997; Adelman ve ark., 1999; Adelman ve ark., 2000). *Arnt*^{-/-} embriyoların plasental anomalilerinin labirent ve SpT tabakalarının belirgin şekilde küçülmesi nedeniyle olduğu gösterilmiştir (Kozak ve ark., 1997; Adelman ve ark., 2000). *Arnt*^{-/-} embriyolarda, PE insan plasentalarına benzer şekilde maternal desidua trofoblast invazyonunun yetersiz olduğu gözlenmiştir (Adelman ve ark., 2000). *Hif-1 α /2 α* ^{-/-} farelerin plasentaları da *Arnt*^{-/-} plasentalarla benzer fenotip göstermiştir. (Cowden Dahl, Fryer, ve ark., 2005).

HIF-içermeyen plasentaların en temel kusuru hücre kaderi belirlenmesindeki bozulmadır. Geleneksel yöntemlerle vahşi tip fare TKH farklılaşması (FGF4 büyüme faktörü ortamdan çekildiğinde) sonucunda özellikle SpT'ler ve TDH'lerin olduğu gösterilmiştir (Burton, 2009; Suda ve ark., 2011). Ancak, *Hif-1 α /2 α* ^{-/-} veya *Arnt*^{-/-} TKH'ler in vitroda SpT'lere ve TDH'lere dönüşmemiş ve SpT gelişimi için zorunlu bir transkripsiyon faktörü olan Mash2 ekspresyonunu gerçekleştirmemiştir (Guillemot ve ark., 1994; Guillemot ve ark., 1995). Bunun yerine multinükleer sinsisyotrofoblastlara farklılaşmıştır. Bu yüzden, fare plasentalarında HIF ekspresyonu in vitroda SpT ve TDH oluşumu için zorunludur ve sinsisyotrofoblasta farklılaşmanın belirleyicisidir (Cowden Dahl, Fryer, ve ark., 2005; Maltepe ve ark., 2005).

Tüm bu veriler, O₂ seviyesi ve O₂-bağımlı yolların (HIF'lerin) plasental vaskülarizasyon, invazyon ve trofoblast farklılaşmasında temel düzenleyiciler olduğunu ve plasental gelişim için zorunlu olduklarını göstermektedir.

2.7. ESM

ESM, hücrelerarasını dolduran ve hücreleri birarada tutan, dokular için mekanik ve yapısal destek oluşturan bir ortamdır. ESM'nin baş bileşenleri yapısal proteinler (örneğin kollajen, laminin, fibronektin, vitronektin ve elastin) ve bunun yanısıra büyüme faktörleri gibi önemli biyolojik işlevlere sahip moleküller ile etkileşim kurabilen özelleşmiş glikoproteinlerdir. ESM içeriği bulunduğu yere göre değişir. ESM içeriğindeki çeşitlilik, yer aldığı dokuya ve buna bağlı olarak bulunduğu konum ve fizyolojik şartlara bağlıdır (Stevens ve George, 2005).

Başlangıçta sadece bir iskele olarak düşünülen ESM'nin hücrelerarası iletişim, proliferasyon, hayatta kalma, göç ve farklılaşma dahil olmak üzere hücre davranışının birçok yönlerini düzenlediği gösterilmiştir (Guilak ve ark., 2009; Reilly ve Engler, 2010; Suda ve ark., 2011). ESM bu özellikleriyle hücre nişinin anahtar bileşeni olup hücre kaderinin belirlenmesinde önemli roller üstlenir. Hücre-ESM etkileşimleri, çeşitli algılama mekanizmaları ve aşağı sinyal yolları yoluyla hücre yanıtlarını değiştirebilir. Nişle olan etkileşimler karşılıklı olup hücreler de aldıkları uyarılara yanıt olarak ESM'yi yeniden modelleme yeteneğine sahiptirler (Watt ve Driskell, 2010).

Blastosist evresindeki TE epitelyal karakteri, implantasyonu ve uterin invazyonu gerçekleştirmek için invazif bir fenotipe dönüşür (Sutherland, 2003; Armant, 2005; J. D. Aplin ve ark., 2009; Harris ve ark., 2009). Bu, konuma ve trofoblast fonksiyonuna bağlı olarak motilite farklılıklarına izin veren dinamik bir süreçtir (Parast ve ark., 2001). TE'deki fenotipik değişikliklerle eş zamanlı şekilde, başarılı bir implantasyon ve trofoblast invazyonu için uterus ESM'si de yeniden modellenme yapar (Red-Horse ve ark., 2004; Singh ve Aplin, 2009; Fitzgerald ve ark., 2010; H. J. Lim ve Wang, 2010). Bu süreç, trofoblastlarca eksprese edilen, ESM içeriğini yıkan enzim ailesi olan matriks metalloproteazlar (MMP'ler) tarafından yönetilir (Cockle ve ark., 2007). Birçok çalışma, bu proteazların trofoblast invazyonunun düzenlenmesindeki rollerini göstermektedir (Fisher ve ark., 1985; Estelles ve ark., 1989; Estelles ve ark., 1994; Graham ve McCrae, 1996; Hurskainen ve ark., 1996; Morgan ve ark., 1998; Xu ve ark., 2000; H. Wang ve ark., 2001; Isaka ve ark., 2003; H. Wang ve ark., 2003; Seval ve ark., 2004). Ayrıca, MMP'lerin doku inhibitörlerinin ekspresyonu da erken plasental gelişim ile ilişkilidir (Seval ve ark., 2004) ve bu da trofoblast invazyonu ve farklılaşması için bunların aktivitesinin hassas bir dengede olmasının önemli olduğunu gösterir. Uterus epiteline blastosist yapışmasının adezyon molekülü ekspresyonunu değiştirdiği (Rout ve ark., 2004) ve ESM'in değiştirilerek trofoblast farklılaşmasının geliştirilebildiği (Lei ve ark., 2007) farelerde deneysel olarak gösterilmiştir. Koryonik villusların ESM içeriğinin de MMP9 gibi MMP'ler tarafından düzenlendiği bulunmuştur (Isaka ve ark., 2003).

2.7.1. Fibronektin

Fibronektin ESM ana bileşenleri arasında yeralan yüksek moleküler ağırlığa sahip bir glikoproteindir. Fibrin, kollajen, proteoglikanlar gibi ESM elemanlarıyla ve yüzeylerinde fibronektin reseptörleri (örneğin integrin) taşıyan hücrelerle etkileşir (Ruoslahti, 1988). Fibronektinler, embriyogenez, normal hücre morfolojisinin korunması, hücre migrasyonu, homeostaz, thromboz ve yara iyileşmesinde görev alır (Miyamoto ve ark., 1998).

Fibronektinlerin iki formu vardır, bunlar hepatositler tarafından sentezlenerek kan dolaşımına salınan çözünebilir form (plazma fibronektin) ve fibroblastlar, epitel hücreleri tarafından sentezlenerek ESM'de depolanan çapraz bağlı formdur (hücreSEL fibronektin) (Ruoslahti, 1988). Fibronektin birbirine disülfid bağıyla bağlanan iki adet 200-250 kDa'luk alt üniteden oluşan bir dimer yapısındadır (Mosher ve Johnson, 1983).

Fibronektin üç homolog tekrar ünitesinden (tip I, II, III) oluşur. Bu üniteler tip I, tip II ve tip III olarak isimlendirilmektedir. Fibronektinde 12 tip I bölgesi, 2 tip II bölgesi ve 15-17 tip III bölgesi bulunur. Bu üniteler farklı fonksiyonları olan fibronektin bölgelerinin temelini oluşturur. Örnek olarak, tip I üniteleri heparin ve fibrine bağlanan bölgelerin oluşumunda, tip II üniteleri kollajen veya jelatine bağlanan bölgelerin yapımında ve tip III üniteleri de hücrelere, DNA ve heparine bağlanan bölgelerin yapımında kullanılmaktadır (Kornbliht ve ark., 1985; Huppertz ve ark., 1998).

Endometriyumun fibronektin, laminin, kollajenlerden zengin olduğu bilinmektedir (Wartiovaara ve ark., 1979; Wewer ve ark., 1985). Fibronektin ekspresyonu insan plasentasının vilous stroması, fetal damarlar, demirleyici trofoblast kolonlarının distal kısımları ve fibrinoidlerde gözlenirken villöz trofoblastlarda bulunmamıştır (Earl ve ark., 1990; Tossetta ve ark., 2016).

2.8. Adezyon Molekülleri

Adezyon molekülleri, hücre yüzeyinde bulunan ve hücre-hücre ve hücre-ESM etkileşiminde rol oynayan moleküllerdir. Hücre proliferasyonu, göçü, farklılaşması, endotel ve epitel hücrelerinin seçici bir bariyer oluşturması, doku bütünlüğünün sağlanması ve hücre iskeleti aracılığıyla hücre hareketinin organizasyonu adezyon

molekülleri aracılığıyla gerçekleştirilir. Ayrıca bu moleküller, hücre içi ve hücrelerarası sinyal iletiminin düzenlenmesinde de önemli roller üstlenmektedir. Hücre adezyon molekülleri yapısal ve fonksiyonel özellikleri göz önünde tutularak dört grup altında toplanabilir: 1) integrinler, 2) immüoglobulin süper ailesi, 3) kaderinler, 4) selektinler (A. E. Aplin ve ark., 1998).

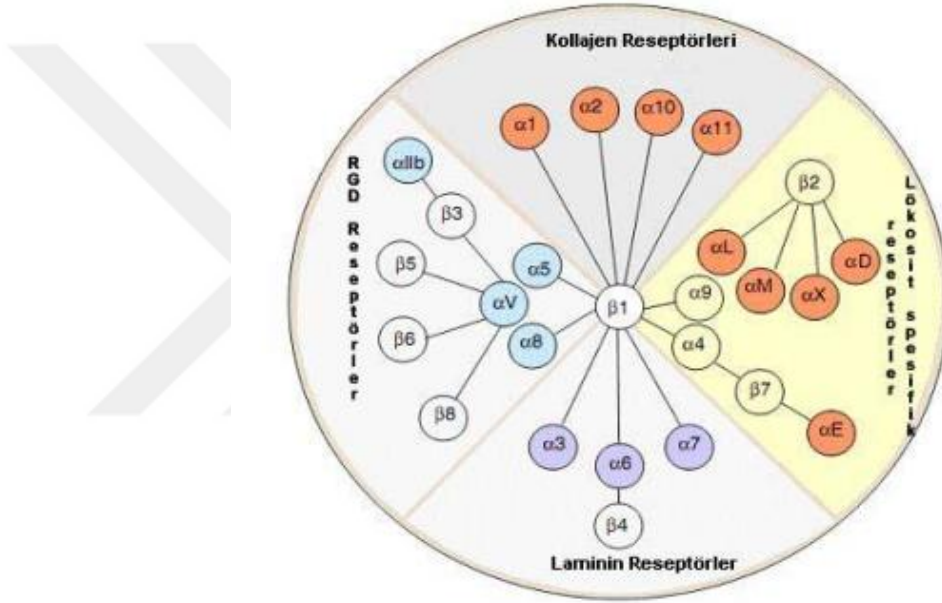
2.8.1. İntegrinler

İntegrinler, tanımlanmış 18 adet α ve tanımlanmış 8 adet β altünitelerin kombinasyonlarından oluşan heterodimerik hücre adezyon molekülleridir (Hynes, 2002). İntegrinler birçok ESM elemanlarına ve VCAM-1 (vasküler hücre adezyon molekülü) gibi hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak ekstrasellüler ve hücre içi ortamlar arasında etkileşim kurar (Plow ve ark., 2000; Hynes, 2002). İntegrinler hücre adezyonu, migrasyon, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi birçok hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde görev alır (Giancotti ve Tarone, 2003). Trombozda, yara iyileşmesinde, immünitede ve fertilizasyon, implantasyon ve blastosist oluşumunu içeren erken gelişimsel olaylarda kritik rol oynar (Tarone ve ark., 2000; Meighan ve Schwarzbauer, 2008).

Her bir integrin heterodimeri, ESM proteinlerine bağlanan büyük bir N-terminal ekstrasellüler bölge (β alt ünitesi için yaklaşık 700 aminoasit, α alt ünitesi için 1000 aminoasit), bir transmembran bölge ve α -aktinin, paksilin, talin gibi hücre iskeleti proteinlerine bağlanan kısa bir C-terminal sitoplazmik bölgeden oluşur (Hynes, 2002).

İntegrinlerin, her birinin bir veya daha fazla ESM proteinine bağlanan 24 fonksiyonel reseptör oluşturduğu bilinmektedir (Hynes, 2002). Ligand spesifitelerine göre integrinler; laminin bağlayıcı integrinler ($\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha7\beta1$ ve $\alpha6\beta4$), kollajen bağlayıcı integrinler ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$ ve $\alpha11\beta1$), lökosit spesifik integrinler ($\alphaL\beta2$, $\alphaM\beta2$, $\alphaX\beta2$, $\alphaD\beta2$, $\alpha4\beta1$, $\alpha9\beta1$, $\alpha4\beta7$ ve $\alphaE\beta7$) ve fibronektin, vitronektin, fibrinojen gibi ESM bileşenlerinde gözlenen bir tripeptid olan arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) tanıyıcı integrinler ($\alpha5\beta1$, $\alpha8\beta1$, $\alphaV\beta1$, $\alphaV\beta3$, $\alphaV\beta5$, $\alphaV\beta6$, $\alphaV\beta8$ ve $\alphaIIb\beta3$) olarak gruplara ayrılabilir (Barczyk ve ark., 2010) (Şekil 2.8.).

ESM, integrinler yoluyla hücre kaderi belirlenmesini sağlayabilir (Votteler ve ark., 2010; Kim ve ark., 2011). Örneğin, eritropoezde birincil eritroid progenitörlerin fibronektine $\alpha4\beta1$ integrin aracılı adezyonu, in vitroda proliferasyonun doğru olması için gereklidir. Böylece, ESM'den gelen sinyallerle çözünebilen faktör olan eritropoietinden gelen sinyaller iş birliği yaparak terminal farklılaşma ve proliferasyon için gerekli yolları aktive eder. Böylelikle, ESM bağımlı kök hücre-niş etkileşimleri, farklılaşmayı teşvik ya da inhibe etmek için başka yollarla birleşir (Eshghi ve ark., 2007).



Şekil 2.8. İntegrin ailesinin şematik çizimi (Barczyk ve ark., 2010).

$\beta3$ ailesi integrinlerinin yani $\alphaIIb\beta3$ ve $\alpha v\beta3$ 'ün birçok önemli rolü olduğu bilinmektedir. $\alphaIIb\beta3$ ekspresyonu sadece trombositlerde ve megakaryositlerde vardır ve trombosit agregasyonunda zorunludur (Du ve Ginsberg, 1997). $\alpha v\beta3$ ise trombositler, osteoklastlar, fibroblastlar ve endotel hücrelerinde ekspresyon gösterir (Cheresh ve Harper, 1987). $\alphaIIb\beta3$ ve $\alpha v\beta3$ için başlıca ligandlar fibrinojen, fibronektin, von Willebrand faktör ve vitronektindir (Felding-Habermann ve Cheresh, 1993).

Arnt^{-/-} ve *Hif1 α ^{-/-}Hif2 α ^{-/-}* fare TKH'lerin $\alpha v\beta3$ integrin ekspresyonunun azaldığı ve buna bağlı olarak trofoblastların adezyon ve invazyon yeteneklerinin azaldığı gösterilmiştir (Cowden Dahl, Robertson, ve ark., 2005). PE plasentalarda $\beta3$ integrin ekspresyonunun normalden düşük olduğu bulunmuştur (Y. Zhou, Damsky, ve ark., 1997). Fare

trofoblastlarının fibronektin üzerine adezyon ve migrasyonunu $\alpha\beta3$ integrin ve $\alpha\text{IIb}\beta3$ integrinin düzenlediği gösterilmiştir (Rout ve ark., 2004). $\beta3$ integrin ekspresyonun fare plasentalarında labirent ve SpT'lerde bulunduğu gösterilmiştir (Bowen ve Hunt, 1999). İntegrin $\beta3^{-/-}$ fare embriyolarında plasental defektlere bağlı olarak ölümler gözlenmiştir (Hodivala-Dilke ve ark., 1999). $\beta3$ integrin heterodimeri olan αv integrin içermeyen fare embriyolarının ise çoğunlukla öldüğü ve azalmış labirent bölgesi ve anormal SpT bölgeleri içeren plasental defektleri bulunduğu gösterilmiştir (Bader ve ark., 1998). İnsan plasentasında $\alpha\text{V}\beta3$ integrin ekspresyonunun trofoblast yüzeyinde lokalize olduğu gösterilmiştir (Xia ve ark., 2009).

İntegrin sitoplazmik bölgeleri genellikle enzimatik aktiviteden yoksundur. Bu nedenle, birçok sinyal aracıları, altyolakları aktive etmek için integrin reseptörleri ile etkileşim halindedir. Bunların en çok çalışılanlarından birisi fokal adhezyon kinaz (FAK)'tır. Hücre membranının iç yüzündeki FAK'lar integrinlerle bağlantı kurarak hücre iskeleti bağlantılarının organizasyonuna bir odak noktası oluşturur. FAK'lar hücre iskeleti, proliferasyonu ve canlılığını etkileyen sinyalleşme ağı oluşturur (Harburger ve Calderwood, 2009). Ayrıca, integrinler ve reseptör tirozin kinazlar (RTK) arasında önemli etkileşimler bulunmaktadır (Eliceiri, 2001; Soung ve ark., 2010). Hem integrin hem de RTK sinyalleşmesi, MAPK sinyalini aktive eden, Ras ailesi GTPazlarında keşişir (Kinbara ve ark., 2003; Ramos, 2008).

2.9. MAPK Yolakları

Ökaryotik hücrelerin tümünde bulunan bu yolak, iletinin hücre membranından çekirdeğe aktarılmasında görevlidir. Bu sinyal iletimi yolakları, embriyogenez, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır. MAPK'ler dört ana gruptan oluşur:

- a) Ekstrasellüler sinyallerle aktive olan kinaz (ERK) ailesi (ERK1/2)
- b) p38 MAP kinaz ailesi (α , β , γ , δ)
- c) c-Jun NH₂- terminal kinaz (JNK) ailesi (JNK1,2,3)
- d) ERK5

MAPK yolağı reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadıdır. Kaskad sistemi hem sinyalin amplifikasyonu hem de sinyalin süresi, şiddeti ve kinetiği açısından önemlidir (Liem ve ark., 2002).

2.9.1. ERK Yolağı

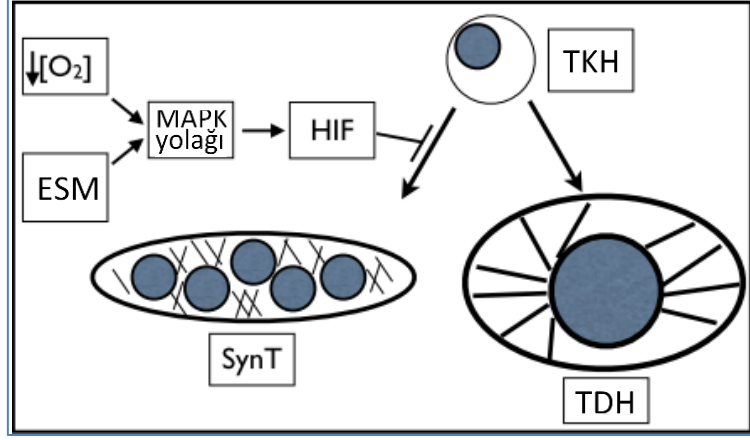
Hormonlar, büyüme faktörleri, farklılaşma faktörleri ve tümör faktörleri bu sinyal yolunu kullanırlar. Sinyal iletimi ilk olarak Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf (MAP kinaz kinaz kinaz=MAPKKK) aktivasyonundan sonra sırasıyla MEK (MAP2K1) (MAP kinaz kinaz=MAPKK) ve Erk (MAPK3/1) (MAP kinaz=MAPK) proteinleri aktive olur. Erk ise sitoplazmik substratlarını ve/veya nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive ederek hücrenin biyolojik cevabını oluşturur (Kolch, 2000). Ras ve Raf protoonkogenlerdir. Ras, membrana bağlı bir G proteindir ve birçok tirozin kinaz reseptörünü aktive etmektedir. Dinlenme halindeki hücrelerde Ras proteini inaktif (Ras-GDP) haldedir. Hücrenin uyarılması ile GDP'nin yerine GTP bağlanarak aktif (Ras-GTP) hale gelir. Aktive olan Ras, Raf'a yüksek afinite ile bağlanır ve Raf'ın hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlar (Kolch, 2000; Lee ve McCubrey, 2002).

ERK/MAPK sinyal yolağı çok fazla organizmanın hücre kaderini düzenlemektedir (Hsu ve Perrimon, 1994; Kornfeld ve ark., 1995; Umbhauer ve ark., 1995; Wu ve ark., 1995). Bu yolağın hipoksi tarafından aktive edildiği gösterilmiştir (Muller ve ark., 1997; Conrad ve ark., 1999; Minet ve ark., 2000; Fujita ve ark., 2010). Farelerde, MAP2K1 ve alt yolağında yer alan MAPK3/1, plasantasyonun kritik düzenleyicileridir (Giroux ve ark., 1999; Hatano ve ark., 2003; Saba-El-Leil ve ark., 2003; Bissonauth ve ark., 2006). MAP2K1 eksikliği in vitroda HIF-eksik TKH'lerde multinükleer sinsisyotrofoblast oluşumuyla (Maltepe ve ark., 2005) ve benzer şekilde in vivo da çok fazla multinükleer hücre içeren malformasyonlu plasentalarla karakterizedir (Nadeau ve ark., 2009). Ayrıca, MAPK3/1'i inhibe etme yeteneğine sahip olan çift özgülük fosfataz 9/MAPK fosfataz 4 (DUSP9 /MKP4) da düzgün plasental gelişim için kritiktir (Christie ve ark., 2005; Y. Liu ve ark., 2007).

Kök hücrelerin yaşamlarını in vitro ortamda devam ettirebilmeleri için, besleyici bir hücre tabakası (feeder cell layer) gerekmektedir. Choi ve arkadaşları, CELLstart'ı

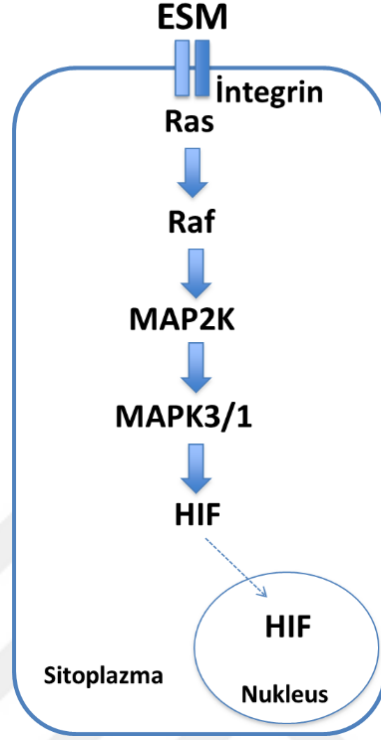
(başlıca insan fibronektini ve insan plasental ESM elemanlarını içerir) (Hughes ve ark., 2011); farklılaşmamış TKH'leri, fibroblast hücre tabakası veya fibroblast koşullu medyumun yokluğunda kültüre ederken kullanmıştır. TKH'ler CELLstart'ta, büyüme faktörlerinin veya fibroblast-koşullu medyumun (standart farklılaşma protokolü) yokluğunda kültüre edildiğinde, bu hücreler, standart farklılaşma koşullarında sıklıkla gözlenen TDH'ler yerine sinsisyotrofoblast (SynT)'a farklılaşmıştır. Ancak CELLstart'ta hipoksik ortamda yapılan kültürde ise yine TDH'ler oluşmuştur. Bu verilere göre, CELLstart üzerinde kültüre edilen TKH'ler, fibroblast hücreleri üzerinde kültüre edilen TKH'lerden farklı hücre kaderleri kazanmış ancak hipoksik kültür koşulları, bu ESM'e bağımlı hücre kaderi değişiminin üstesinden gelmiştir. CELLstart'ta fibroblast koşullu medyum kullanılması, CELLstart'ın TKH farklılaşması üzerine etkilerini geriye döndürememiştir. Bu sonuçlar, fibroblastlardan türetilmiş çözüner (soluble) faktörlerin, TKH farklılaşmasından sorumlu olmadığını göstermektedir. Normoksik koşullarda fibroblastlar üzerinde kültüre edilen TKH'ler farklılaşırken, HIF-1 α ve HIF-2 α ekspresyonu stabilizasyonu gözlenmiştir. Ancak, normoksik koşullarda CELLstart'ta kültüre edilen TKH'lerde ise farklılaşma sırasında HIF-1 α ekspresyonu çok az gözlenirken HIF-2 α ekspresyonu olmamıştır. Hipoksik ortam ise CELLstart üzerinde kültüre edilen TKH'lerin farklılaşması sırasında, HIF-1 α ve HIF-2 α stabilizasyonunu indüklemiştir. Bu sonuçlar, ESM içeriği ve oksijenin, TKH'lerde farklılaşmaya bağımlı HIF stabilizasyonu ve TDH oluşumunu yöneten önemli etmenler olduğunu göstermektedir (Choi ve ark., 2013).

Choi ve arkadaşları, ESM'ye bağımlı HIF ekspresyonunda MAPK yolağının olası rolünü de incelemiştir. MAP2K1 proteinini inhibe etmek, CELLstart üzerinde kültüre edilen TKH'lerin farklılaşması sırasında fizyolojik hipoksi ile indüklenen HIF-1 α stabilizasyonunu engellemiştir. Bunun yanı sıra, MAP2K1 inhibisyonu, normoksik koşullarda fibroblastlar üzerinde kültüre edilen TKH'lerin farklılaşması sırasındaki ESM'e bağımlı HIF-1 α stabilizasyonunu da engellemiştir. Ayrıca, MAP2K1 inhibisyonu, CELLstart'ta hipoksik koşulda kültüre edilen TKH'lerin TDH'a farklılaşmasını engellemiştir (Choi ve ark., 2013). Bu sonuçlar göstermektedir ki, ESM ve oksijene bağımlı HIF-1 α stabilizasyonu ve TDH farklılaşması, MAPK yolağı aracılığıyla olmaktadır (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. TKH'lerin HIF'e bağımlı olarak farklılaşma modeli. Oksijen veya ESM bağımlı MAPK- HIF aktivasyonu, TKH'lerin sinsisyotrofoblasta dönüşümünü engellemekte ve TDH'a dönüşümünü sağlamaktadır (SynT: sinsisyotrofoblast).

Choi ve arkadaşları, ESM bileşimindeki değişikliklerin MAPK sinyal yolağı aracılığıyla nasıl TKH kader farklılıklarına yol açabileceğini anlamak için, TKH yüzey integrin ekspresyon değişikliklerinin ESM içeriğinin bir fonksiyonu olarak değişip değişmediğini test etmiştir (Choi ve ark., 2013). Çünkü, integrin ligasyonu, bilinen bir MAPK yolağı tetikleyicisidir (Harburger ve Calderwood, 2009). Fibroblast hücreleri üzerinde kültüre edilen TKH'ler hem farklılaşmamış ve hem de farklılaşmış iken, $\beta 3$ integrin ekspresyonunu sürdürmüştür. CELLstart üzerinde kültüre edilen TKH'ler ise her iki durumda da $\beta 3$ integrin ekspresyonu gerçekleştirilmemiştir (Choi ve ark., 2013). Bu nedenle, TKH'ler CELLstart üzerinde kültüre edildiğinde azalmış olan integrin sinyali, değişmiş HIF stabilitesi ve TKH kader tayininden sorumlu olabilir. Choi ve arkadaşlarının çalışması özetle aşağıdaki sinyal iletim yolağı mekanizması ile açıklanabilir (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. ESM aracılığıyla aktive olan TKH'lerin, MAPK sinyal iletim yolağı ile etkileşiminin HIF'i aktive etmesinin şematik çizimi.

2.10. PE

PE; maternal hipertansiyon, böbrek yetmezliği ve ödem ile karakterize olan ve tedavi edilmezse eklampsiye ve ölüme sebebiyet verebilen ciddi bir gebelik komplikasyonudur (Sibai ve ark., 1997). Hamileliğin 20. haftası veya sonrasında ortaya çıkan vazospazm, maternal endotelial disfonksiyon ve azalmış sekonder organ perfüzyonu ile seyreden bir hastalıktır (Kuo ve ark., 1992).

İleri anne yaşı (40 yaş üstü), nulliparite, daha önceki gebeliğinde PE veya eklampsi öyküsü, çoğul gebelikler, kronik hipertansiyon, kronik böbrek hastalığı, genetik yatkınlık ve diabetes mellitus PE için başlıca risk faktörleri arasındadır (Acog, 2002).

PE, tüm gebeliklerin yaklaşık %5'inde görülür. PE'nin sebepleri bilinmediğinden, hastalığı tahmin etmek ya da önlemek mümkün değildir. PE'nin kesin tedavisi gebeliğin sonlanmasıdır; bu yüzden, preterm doğumların en önde gelen sebeplerindendir (Goldenberg ve ark., 2008; Jim ve Karumanchi, 2017). Fetüsün olmadığı molar gebeliklerde de ortaya çıkması ve doğum sonrasında belirtilerin ortadan kalkması,

PE'nin plasental bir hastalık olduğunu kanıtlamaktadır. PE'nin kesin tedavisinin gebeliğin sonlanması olması da bunu açıkça göstermektedir. Ayrıca, molar gebelik ve çoğul gebelik gibi hiperplasentasyon durumlarında PE riski artmaktadır. Buna koryonik villöz yapılarının artmasının sebep olduğu düşünülmektedir (Chesley ve Cooper, 1986; Piering ve ark., 1993).

PE'nin etiyojisiyle ilgili çok fazla araştırma yapılmasına karşın, hastalığın nedenini açıklayan bütünleştirici bir teori ortaya konulamamıştır ancak multifaktöriyel olduğu düşünülmektedir. Ancak tanımlanan bazı mekanizmalara göre, PE'nin altında yatan temel anormallik, spiral arterlere yeterli EVT invazyonu gerçekleşmemesinden dolayı oluşan vazospazm ve endotel hasarıdır. Bunlara bağlı olarak da organ hipoperfüzyonu ve maternal enflamatuvar yanıt gibi multisistemik bozukluklar gelişir (Nilsson ve ark., 2004; Redman ve Sargent, 2005).

Normal gebeliklerde, endovasküler EVT'ler desiduadaki maternal spiral arterlere invaze olur. Psödo-vaskülogenez olarak adlandırılan olayla EVT'ler, uterus spiral arter endotelinin yerine geçer ve mükülo-elastik medya tabakayı da fibrinoid maddeyle değiştirir. Bu spiral arterlerdeki yeniden modellenmenin amacı, embriyonik/fetal büyümeyi desteklemek için gerekli olan daha fazla miktarlardaki kanı taşıyabilen düşük dirençli, yüksek kapasiteli damarları oluşturmaktır (Y. Zhou ve ark., 1993; Red-Horse ve ark., 2004). Psödo-vaskülogenez, EVT'lerin eksprese ettiği adezyon molekülleri ile uterus ESM'si ve damarları arasındaki etkileşimlere dayanır (Y. Zhou, Fisher, ve ark., 1997; Soghomonians ve ark., 2005; Cao ve ark., 2008). EVT'ler psödo-vaskülogenez esnasında adhezyon reseptör fenotiplerini değiştirmektedir. EVT'lerdeki epitel hücre karakteristiği moleküller olan integrinler $\alpha6/\beta4$, $\alpha5/\beta1$ ve E-kadherin'in ekspresyonu azalmakta, endotel hücre karakteristiği olan integrinler $\alpha1/\beta1$, $\alpha v/\beta3$, VE-kadherin, MMP-9 ve HLA-G'yi ekspresyonları artmaktadır (Y. Zhou, Damsky, ve ark., 1997). Başka bir çalışmada da EVT'lerde vaskülogenezden sorumlu VEGF ailesi üyeleri VEGF-A, PIGF ve VEGFR-1 ekspresyonlarının arttığı bulunmuştur (Y. Zhou ve ark., 2002). Psödo-vaskülogenez oluşumu desiduadan miyometriyumun ilk üçte birlik kısmına kadar uzanır ve çoğunlukla gebeliğin 20. haftasına kadar tamamlanır. Psödo-vaskülogenez yoluyla transforme olan spiral arterlerin çapları 4-6 kat artar ve yüksek

akımlı düşük direnç sistemi oluşur. Böylelikle, uteroplasental kan akımı ortalama 10 kat artar (Nilsson ve ark., 2004).

PE'nin etiyolojisi tam olarak bilinmemesine rağmen, birçok çalışmada O₂ taşınımı ve ESM yeniden modellenmesinde bozukluklar ve yetersiz trofoblast invazyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Estelles ve ark., 1989; Estelles ve ark., 1994; Genbacev ve ark., 1996; Graham ve McCrae, 1996; Genbacev ve ark., 1997; Caniggia, Winter, ve ark., 2000; Narumiya ve ark., 2001; Merchant ve Davidge, 2004; Myers ve ark., 2005; Redman ve Sargent, 2005; Rolfo ve ark., 2010). PE'deki temel bozukluk, spiral arterlerdeki EVT invazyonunun yetersizliği veya hiç olmamasıdır (Roberts ve ark., 1989). Kültüre edilen PE plasenta hücrelerinin invazif potansiyelinin ölçüldüğü bir çalışmada psödo-vaskülogenez belirteçleri $\alpha 1$ integrin, MMP-9 ve HLA-G ekspresyonlarının PE'de gerçekleşemediği gösterilmiştir (K. H. Lim ve ark., 1997). Başka bir çalışmada PE'de, endovasküler EVT'lerin farklılaşmada başarısızlığa uğrayarak $\alpha 1\beta 1$ ve $\alpha v\beta 3$ integrinlerin ekspresyonunu hücre yüzeylerinde upregüle edilemedikleri gösterilmiştir (Y. Zhou, Damsky, ve ark., 1997). Transkripsiyonel düzeyde, PE EVT'lerin temel heliks-loop-heliks aile üyelerinin negatif bir regülatörü olan ve farklılaşmayı engelleyen Id2'yi çok yüksek düzeyde eksprese ettiği gösterilmiştir (Janatpour ve ark., 1999; Janatpour ve ark., 2000). Birçok çalışma, değişmiş MMP aktivitesi ile PE patogenezini ilişkilendirmiştir (Narumiya ve ark., 2001; Merchant ve ark., 2004; Jeyabalan ve ark., 2006; Jeyabalan ve ark., 2007). MMP-2 ile ilgili çalışmalar daha fazladır çünkü PE kadınlarda dolaşımdaki MMP-2 düzeyi yükselmektedir (Narumiya ve ark., 2001; Myers ve ark., 2005). Ayrıca, MMP-1'in doku inhibitörünün dolaşımdaki düzeyi de PE'de azalmıştır (Kolben ve ark., 1996). Böylece, uterus ESM yeniden modellenmesindeki bozukluklar, yetersiz trofoblast invazyonu nedeniyle plasantasyonu negatif etkileyebilir.

PE'nin anjiyogenik faktörlerdeki dengesizlik ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (S. Maynard ve ark., 2008). Örneğin, EVT'ler tarafından gerçekleştirilen endovasküler invazyonun PE'de, VEGF-A ve VEGFR-1'in düşük seviyeleri ve artan VEGF antagonisti sFlt-1 nedeniyle bozulabildiği gösterilmiştir (Y. Zhou ve ark., 2002). Buna paralel şekilde, aşırı sFlt-1 ekspresyonu sıçanlarda PE-benzeri bir sendroma yol

açmaktadır (S. E. Maynard ve ark., 2003; Kanasaki ve ark., 2008). PE sinsisyotrofoblastta vaskülogenezi bozan endoglin ekspresyonu artmaktadır ve gebe sıçanlara bu molekülün verilmesi PE-benzeri bir sendroma yol açmıştır (Venkatesha ve ark., 2006). Bu faktörlerin aksine, insan sinsisyotrofoblastlarında da bir peptid vazodilatör olan adrenomedullin ekspresyonu PE'de düşer (Wilson ve ark., 2004) ve farelerde bu molekülün maternal ve/veya fetal ekspresyonunun azalmasıyla PE sendromunun belirtileri gelişir (Li ve ark., 2006). Adrenomedullin ve onunla ilişkili adrenomedullin 2 ekspresyonlarının EVT invazyonunu da etkileyebildiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2005; Chauhan ve ark., 2009).

Önceki çalışmalar, HIF fonksiyonu ve PE arasında ilişki olduğunu göstermektedir (Genbacev ve ark., 1996; Genbacev ve ark., 1997; Caniggia, Winter, ve ark., 2000; Redman ve Sargent, 2005; Rolfo ve ark., 2010). Plasental vaskülogenez ve dallanmada rol oynayan glial cells missing 1 (GCM1) ekspresyonu PE'de azalmıştır (C. P. Chen ve ark., 2004). Plasental GCM1 ekspresyonunun oksijen tarafından düzenlendiği bulunmuştur (McCaig ve Lyall, 2009). Ayrıca, oksijen miktarının insan sinsisyotrofoblast farklılaşmasını düzenleyebildiği gösterilmiştir (Kudo ve ark., 2003). PE plasentalardaki gen ekspresyonu, in vivo kronik hipoksi modeli olan yüksek rakımdaki plasentalar ve in vitro hipoksi modeli olan %3 oksijende ilk trimester villus eksplant kültürü ile çok benzer bulunmuştur (Soleymanlou ve ark., 2005; Zamudio, 2007). Farelerde HIF-eksikliğin trofoblast farklılaşmasında değişikliklere ve VEGF ekspresyonunda azalmaya yol açtığı bulunmuştur (Maltepe ve ark., 1997). PE benzeri sendroma yol açan sFlt1 proteininin insan plasentasında HIF-1 α ile indüklendiği gösterilmiştir (Nevo ve ark., 2006; Kanasaki ve ark., 2008). Bir östrojen metaboliti olan ve HIF aktivitesini inhibe eden 2-methoxyestradiol (Mabjeesh ve ark., 2003), PE kadınlarda azalmıştır ve eksikliği farelerde PE-benzeri bir sendroma neden olmuştur (Kanasaki ve ark., 2008). Son olarak, HIF-2 bağımlı ekspresyon gösterdiği ve fare plasentalarında TDH farklılaşmasını indüklediği belirlenen (Choi ve ark., 2013) Lim domain kinase 1 (Limk1) ekspresyonunun PE'de azaldığı gösterilmiştir (Y. Zhou ve ark., 2014). Özetle, PE, endovasküler invazyonu, anjiyogenik faktör dengesizliğini, sinsisyotrofoblast oluşumunu ve plasental gelişimi olumsuz etkileyen EVT

farklılaşmasındaki temel hatalar ile ilişkilidir ve hücrel hipoksi yanıtları, neredeyse açıklanan tüm yolaklarda rol oynamaktadır.

PE'de psödo-vaskülogenez ya hiç gerçekleşmez ya da spiral arterlerin sadece desidua kısımlarında gerçekleşir. Spiral arter çapı normalde yaklaşık 500 µm iken olduğu halde PE'de sadece ortalama 200 µm'de kalır. Ayrıca, PE'de spiral arterlerin ancak %30-50'sine invazyon gerçekleşmektedir (Gerretsen ve ark., 1981). Sonuçta, gebelikte yaklaşık 10 kat artması gereken uteroplental kan akımı artışı oluşamaz. Bunun sonucunda plasental hipoksi oluşur ve fetüse giden kan miktarı azalır (Khong ve ark., 1986; Papageorghiou ve ark., 2001).

PE'de oluşan plasental hipoksi sonucunda, plasentadan salınan faktörler (Hipoksik plasentadan kaynaklanan artmış reaktif oksijen türleri (Burton, 2009; Myatt ve Webster, 2009) ve annenin dolaşımında artan sinsisyotrofoblasttan kopan parçacıklardır (Meziani ve ark., 2006; Redman ve Sargent, 2008; Guller, 2009).), maternal endotelial hasara neden olur (Redman, 1992). PE'de artan maternal serum ve plasental fibronektin seviyeleri, artan endotelial hasarın göstergesidir (Uzun ve ark., 2010). Maternal endotelial hasar, vasodilatör (prostasiklin ve nitrik oksit) üretiminin azalmasına neden olur ve böylece vazospazm oluşur. Vazospazm, özellikle böbrek, karaciğer ve beyin olmak üzere tüm maternal organlarda düşük perfüzyona ve periferel direncin artmasına yol açar. Bu da hipertansiyona sebep olur (Roberts ve Lain, 2002). Böbreklerdeki renal kan akışı ve glomerüler filtrasyon hızında azalma gözlenir, glomerüler bariyer bütünlüğünü kaybeder ve sonuçta proteinüri meydana gelir. Karaciğer fonksiyonlarının bozulması sonucunda HELLP sendromu (hemoliz, karaciğer enzim seviyesi artışı, trombosit azlığı) oluşabilir. HELLP sendromu PE hastalarının %10-20'sinde görülür. Beyindeki azalmış serebral perfüzyon, baş ağrısı ve baş dönmesine neden olur.

PE'nin fetal etkileri ise uteroplental yetmezlik sonucu intrauterin büyüme geriliği (IUGR), ablasyo plasenta, erken doğum ve intrauterin ölümdür. IUGR riski, erken ortaya çıkan PE'de artış gösterir (Moran ve ark., 2004; Jim ve Karumanchi, 2017). Plasentadaki bozukluklar, gebeliğin 10-16. haftaları arasında yani PE'nin klinik bulguları ortaya çıkmadan önce oluşmakta iken; klinik belirti ve bulgular ise çoğunlukla 2. trimester ve termde ortaya çıkmaktadır.

PE'nin ileri boyutu eklampsidir. Eklampsi PE'nin bütün bulgularına havale nöbetlerinin (konvülziyon) eklenmesiyle oluşur. Eklampsinin yarısı termden önce ortaya çıkmaktadır. PE ve eklampsi, perinatal morbidite ve mortaliteyi belirgin ölçüde artıran obstetrik olgulardır. Perinatal mortalite, PE'lerde %5-14 arasında görülürken, eklampsi olgularında %13-37,9 arasında değişmektedir (Pritchard ve ark., 1994). Maternal mortalite ise PE'de çok nadir oluşurken, eklampside bu oran %17,5'a kadar yükselmektedir (Dennis ve ark., 1982; Pritchard ve ark., 1994).

2.10.1. PE Plasentada Gözlenen Makroskopik Değişiklikler

PE hastaların uteroplasental yapılarında PE için ayırt edici olan histolojik değişiklikler oluşur. Bu değişikliklerden bazıları; bazal membran bütünlüğünün bozulması, endotel hücre hasarı, plasental enfarktüs, trombosit birikimleri, fibrinoid nekroz, intimal hücre proliferasyonu ve miyointimal hiperplazi, düz kas hücresi proliferasyonu, vazospazm gibi bulgulardır.

PE gebeliklerin plasentaları normal gebeliklere göre daha küçüktür ve placent/fetüs ağırlık oranı azalmaktadır. Yetersiz intervillöz dolaşım sebebiyle ölen villus dokuları olan plasental enfarktüs, PE'de en çok gözlenen plasental bulgulardandır. PE'de plasental enfarktüs görülme sıklığı %33-60'tır. Plasentanın desiduaya tam tutunamaması nedeniyle erken ayrılması olan ablasyo placent, PE'de 3 kat daha fazla görülür. PE'de intravillöz fibrinoid birikimi artar. PE plasentalarda ultrastrüktürel olarak gözlenen fokal sinsisyal nekroz ve mikrovillus kaybı, plasental iskeminin göstergeleridir (Bulmer, 1992). PE plasentaların sinsisyumu ince ve düzensizdir ve vakuoller içerir (Huang ve ark., 2013). PE'nin önemli bir histopatolojik bulgusu, villus trofoblastik bazal membranının kalınlaşmasıdır. Umbilikal arterlerin vazokonstriksiyonu sonucunda aşırı sinsisyal düğüm ve stromal fibroz oluşabilir. Villuslardaki kapillerlerin sayıca artması durumu olan koranjyoz, PE'de hipoksik duruma adaptasyon olarak oluşur. Histolojik olarak villus matürasyonu gebelik yaşıyla uyumludur (Baergen, 2005; Benirschke ve ark., 2006). PE plasentaların TV'leri küçük ve atrofiktir (Ishihara ve ark., 2002). PE'de EVT'lerin %15 ile %50'sinin apoptoza uğradığı tespit edilmiştir. PE'deki yetersiz EVT invazyonunda bu artan apoptozun payı olabileceği düşünülmektedir (DiFederico ve ark., 1999).

2.11. Hipotez

Fare TKH'lerin kültüre edildiğinde ESM'nin, farklılaşmaya bağlı olarak HIF indüksiyonunu teşvik eden MAPK sinyal iletim yolağını tetikleyebildiğine dair bulgular bulunmaktadır. Ancak insan plasentasında bu mekanizma henüz incelenmemiştir. Ayrıca PE plasentalarda bu yolağın işleyişi hakkında da veri bulunmamaktadır. Bu nedenlerden dolayı, “Plasentanın ESM içeriğinin HIF aktivasyonunu tetikleyebileceği ve bu sürecin PE'de bozulabileceği” hipotezini kurduk. Bu alışma ile amacımız normal ve PE plasentalarda, ESM indüklü MAPK-HIF ilişkisinin incelenmesidir. Bu nedenle bu çalışmada, daha önce fare kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen plasental yolakların, insan plasenta dokularında da işlevselliğini araştırdık.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Doku Temini ve Hazırlanması

Bu çalışmadaki deney grupları, Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümleri'ne başvuran ve yazılı onam alınan hastalardan gerekli etik kurul izinleri alınarak oluşmuştur. PE tanısı konulan hastaların ve herhangi bir komplikasyon saptanmayan gebelerin (kontrol grubu) plasentaları çalışmaya dahil edildi. Kadın Doğum uzmanları tarafından PE (n:15) ve kontrol grubunun (n:13) term plasentaları sezaryen doğum sırasında alındı. Plasentalar doğumdan hemen sonra steril koşullarda kuru buz üzerinde laboratuvara getirildi. Plasentaların maternal ve fetal yüzünün farklı bölgelerinden parçalar alındı. Doku parçaları önce serum fizyolojik ile çalkalanarak fazla kanın uzaklaştırılması sağlandıktan sonra aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- Dokuların bir kısmı immünoflorasan boyama için rutin histolojik takibe alınarak parafine gömüldü.
- Bir kısım doku Western blot tekniği için sıvı nitrojene (-196°C) alındı.
- Bir kısım doku ise RT-PCR metodu için sıvı nitrojene (-196°C) alındı.

3.1.1. İmmünoflorasan Boyama Tekniği İçin Doku Hazırlanması

Alınan PE ve normal term plasenta örnekleri %10'luk nötral formalin (%4'lük formaldehid) fiksatifine alınarak 24 saat fikse edildi. Fiksasyondan sonra, dokular 2 saat akan çeşme suyu ile yıkandı. Ardından, sırasıyla %70, %80, %90'lık alkol 24'er saat ve %100'lük alkolde 3 saat tutularak sudan kurtarma (dehidrasyon) işlemi gerçekleştirildi. Ksilol içinde üç defa ikişer dakika bekletilerek dokular şeffaflaştırıldı. Örnekler 58°C'lik etüvde üç defa 1'er saat parafinize edildikten sonra temiz parafine gömülerek parafin bloklar hazırlandı.

3.1.2. Western Blot Tekniği İçin Lizat Hazırlama

Kullanılan solüsyonlar

- Lizis Buffer:
 - 10 ml 0.1M Tris (pH 7.4) (Bio-Rad, #161-0719)

- 1 ml 100X Na-orthovanadate (Sigma, #S6508)
- 90 ml distile su
- 1 gr SDS (Sigma, # L4390)
- Proteaz inhibitör kokteyli:
 - 40 µl Proteaz inhibitör kokteyli 25X (2 ml dH₂O + 1 tablet proteaz inhibitör kokteyli (Protease inhibitor cocktail tablet, Roche, #1169749800120))
 - 600 µl dH₂O

Sıvı nitrojene (-196°C) alınıp muhafaza edilen kontrol ve PE plasenta örneklerinin öncelikle bisturi yardımıyla mekanik olarak parçalanması sağlandı. Parçalanmış doku örnekleri uygun tüplere alınarak ağırlıkları tartıldı. 0,2 gr dokuya 600 µl lizis tamponu ve 10 µl proteaz inhibitör kokteyli olacak şekilde hesaplanarak dokunun içinde bulunduğu tüplere lizis tamponu ve proteaz inhibitör kokteyli eklendi. Dokular vortekslenildi ve homojenizatör yardımıyla örneklerin iyice parçalanması gerçekleştirilerek örneklerin homojen bir biçimde lizise uğraması sağlandı. 15.000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar alınıp pelet kısmı saklanarak lizatlar hazırlandı. Hazırlanan lizatlar -20°C de muhafaza edildi.

3.2. İmmünoflorasan Boyama Protokolü

Kullanılan solüsyon ve cihazlar

- Süperfrost plus elektostatik lam: (Thermo Scientific, #4951PLUS)
- Fosfat tamponlu tuz (PBS):
 - 7.2 gr Na₂HPO₄.12H₂O (Merck)
 - 0.8 gr KH₂PO₄ (Merck)
 - 16 gr NaCl (Merck)
 - 2 litre distile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2N NaOH ile pH 7.4 olacak şekilde ayarlandı.
- Sitrik asit (pH:6.0; 900 ml distile suda 2,1 gr sitrik asit)
- Permeabilizasyon solüsyonu: %0.5 Triton X-100 (Sigma, #T8787)
- Bloklama solüsyonu: Ultra V Block (LabVision Corporation, #TA-125UB)
- Antikor Dilüent solüsyonu: Large Volume UltrAb Diluent (LabVision, #TA-125UD)
- İzotip Kontrol: Mouse IgG₁ [225X0931] (Dako, #X0931)

- İzotip Kontrol: Rabbit serum (Dako, #X0902)
- DAPI'li Kapatma solüsyonu: (Vector, #H-1200)
- Floresan mikroskobu: Olympus BX61

Parafin bloklarından alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler Superfrost plus lamalar üzerine alınarak, 3 kere 5'er dakika ksilolde tutularak deparafinize edildi ve daha sonra derecesi azalan alkol serilerinden geçirilerek suya alındı. Kesitler sitrik asit çözeltisinde 3 kere 7'şer dakika kaynatılıp 20 dakika oda ısısında bekletilip soğutuldu. Kesitlerin etrafı hidrofobik kalem ile çizildikten sonra PBS ile 3 kez beşer dakika yıkandı. Hücresel permeabilizasyon PBS'te hazırlanmış %0.5 Triton X-100 içeren solüsyon ile 10 dakika yapıldı. Ardından kesitler 5 dakika PBS ile yıkandı. Özgül olmayan bağlanmaları bloke etmek için kesitler Ultra V Block ile oda ısısında 10 dakika bekletildi. Yıkama yapılmadan üçlü primer antikorlarla gece boyu +4 derecede inkübe edildi. Üçlü boyama için mavi, yeşil ve kırmızı sekonder antikorlar gerektiği ancak mavi renkli sekonder antikor (Alexa Fluor 350, Invitrogen A21081) çalışmadığından üçlü boyama gerçekleştirilemedi. Bunun üzerine, çiftli boyamalar yapıldı ve ikili boyamaların seri kesitlerinde de trofoblastik hücreler için belirteç olarak sitokeratin 7 gösterildi. İkili boyanan primer antikorlar Tablo 3.1.'de gösterilmiştir. Negatif kontrol olarak, primer antikorlar ile aynı konsantrasyonda olmak üzere, uygun izotip kontrol antikorları veya bunları içeren serum kullanıldı. Kesitler PBS ile 3 kez 5 dakika yıkayıp karanlıkta uygun floresan işareti taşıyan sekonder antikorlarla (FITC ve Alexa Fluor 568 ile konjuge) ile oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Kesitler tekrar PBS ile 3 kez 5 dakika yıkayıp DAPI'li kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Floresan mikroskobu düzeyinde plasental kesitlerdeki boyanmalar değerlendirildi ve fotoğraflandırıldı. Çalışmada kullanılan primer ve sekonder antikorlar Tablo 3.2.'te verilmiştir.

Tablo 3.1. İkili boyanan primer antikorlar.

Fibronektin	HIF-1 α
Fibronektin	HIF-1 β
Fibronektin	HIF-2 α
β 3 integrin	HIF-1 α
β 3 integrin	HIF-1 β
β 3 integrin	HIF-2 α
Fosfo-MAPK3/1	HIF-1 α
Fosfo-MAPK3/1	HIF-1 β
Fosfo-MAPK3/1	HIF-2 α

Tablo 3.2. İmmünofloresan analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar ve dilüsyonları.

Primer Antikor	Dilüsyon	Katalog Numarası	Sekonder Antikor
Fibronektin	1:200	Abcam ab2413	1:250 FITC goat anti-rabbit IgG, Santa Cruz sc-2012
β3 integrin	1:100	Abcam ab75872	1:250 FITC goat anti-rabbit IgG, Santa Cruz sc-2012
Fosfo-MAPK3/1	1:200	Cell Signaling 4370	1:250 FITC goat anti-rabbit IgG, Santa Cruz sc-2012
HIF-1α	1:100	Abcam ab1	1:250 Alexa Fluor 568 donkey anti-mouse IgG (H+L), Invitrogen A10037
HIF-1β	1:100	Abcam ab2771	1:250 Alexa Fluor 568 donkey anti-mouse IgG (H+L), Invitrogen A10037
HIF-2α	1:50	Santa Cruz sc-13596	1:250 Alexa Fluor 568 donkey anti-mouse IgG (H+L), Invitrogen A10037
Sitokeratin 7	1: 500	Dako M7018	1:250 Alexa Fluor 568 donkey anti-mouse IgG (H+L), Invitrogen A10037

3.3. SDS-PAGE Western Blot Protokolü

3.3.1. Protein Miktarının Belirlenmesi

Kullanılan solüsyonlar ve cihazlar

- Bovine Serum Albümin (Sigma, #A9647)
- Lowry Solüsyonu:
 - Lowry A: 2 gr NaOH + 10.6 gr Na₂CO₃, 500 ml distile su
 - Lowry B: 1 gr KNaC₄H₄O₆, 100 ml distile su
 - Lowry C: 1 gr CuSO₄.5H₂O, 100 ml distile su
- Spektrofotometre: µQuant BioTek Spectrophotometer

Önceden hazırlanıp -20°C de muhafaza edilen lizatların içerdiği protein miktarının belirlenmesi için Lowry yöntemi (Lowry ve ark., 1951) kullanıldı. Bu yöntemde standart olarak protein içeriği 1mg/ml olan BSA kullanıldı. BSA'nın (1000 µg/ml), 1:1 (500 µg/ml protein), 1:2 (250 µg/ml), 1:3 (125 µg/ml), 1:5 (31.3 µg/ml) dilüsyonları yapılarak standart protein aralığı hazırlandı. Lizatlar, 1:30 ve 1:60 dilüsyonlar halinde çalışıldı. Hazırlanan standart ve lizat dilüsyonlarından 20 µl alınarak lowry tüplerine pipetlendi. Kör olarak distile su kullanıldı. Bu işlem her örnek için 2 kez tekrarlandı. Tüm lowry tüplerine 600 µl lowry solüsyonu konuldu. Lowry solüsyonu 100:1:1 oranında LowryA: LowryB: Lowry C solüsyonlarının karıştırılmasıyla hazırlandı. İlk önce Lowry B ve C solüsyonları karıştırılıp ardından Lowry A solüsyonu ilave edildi. Lowry solüsyonu ile 10 dakika inkübasyonun ardından tüm tüplere 60 µl folin pipetlendi. Folin solüsyonu 1:1 oranında distile su ile dilüe edilerek kullanıldı. Folin eklenmiş olan tüpler 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Ardından tüm tüplerden 200 µl örnek 96 kuyucuklu plate'lere pipetlendi. Daha sonra 60°C'lik inkübatörde 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda okunması sağlandı. Standartlar ile karşılaştırılarak her bir numunenin protein miktarı tespit edildi. Tüm numunelerin protein miktarlarının eşit olması sağlanarak Western Blot analizlerinde kullanıma hazır hale getirildi.

3.3.2. SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve İmmün Blot

Kullanılan solüsyonlar ve cihazlar

- Sample Buffer 2X, Laemmli electrophoresis Reagent (Sigma, #S-3401)

- 5X Yürütme Tamponu:
 - 9 g Tris (Bio-Rad, #161-0719)
 - 43.2 g Glisin (Bio-Rad, #161-0718)
 - 3 g SDS (Sigma, #L4390)
 - 600 ml Distile su
 - Distile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı.
- Transfer Tamponu:
 - 14.3 g Glisin (Bio-Rad, #161-0718)
 - 3 g Tris (Bio-Rad, #161-0719)
 - 700 ml bidistile su içerisinde çözüldü. Bu solüsyona 200 ml Metanol (Merck, #1.06.008.2500) eklendi ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
- Bloklama Solüsyonu (%5'lik süt tozu):
 - 5 g süt tozu (Bio-Rad) 100 ml TBS-T içerisinde çözüldü ve +4°C'de en fazla 24 saat kalacak şekilde muhafaza edildi.
- 10X Tris Tamponlu Tuz (TBS):
 - 60.55 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719)
 - 87.66 gr NaCl (Carlo Erba, #368257)
 - 800 ml distile suda çözdürüldü ve pH'sı HCl ile 7.4'e ayarlandı. Toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
- TBS-T Solüsyonu:
 - 1 litre 1X TBS içerisine 1 ml Tween-20 (Lab Vision, #TA-125-TW) eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.
- Thick blot paper (Bio-Rad, #165-0921)
- Blotting-Grade Blocker nonfat dry milk (Süt tozu) (Bio-Rad, # 170-6404)
- West Pico chemiluminescent substrates (Thermo Pierce, #34080)
 - Luminol solüsyon ve sabitleme solüsyonu 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.
- PVDF membran (Bio-Rad, #162-0177)
- Kaleidoscope Prestained Standards, broad range (Bio-Rad, #161-0324)
- CL-Xposure film 18x24 cm (Thermo Scientific, # 34089)

- Geliştirme (developer) solüsyonu:
 - 100 ml geliştirme solüsyonuna (PQ Universal Developer) (ILFORD, #1757314)
 - 900 ml distile su eklenerek hazırlandı.
- Sabitleme (fiksatif) solüsyonu:
 - 50 ml sabitleme solüsyonuna (Hypam Fixer) (ILFORD, #1758285)
 - 450 ml distile su eklenerek hazırlandı.

Protein ölçümü sonrası hazırlanan lizatların protein miktarları distile su ile eşitlendi. Lizatlar 1:1 oranında lizant ile karıştırıldı ve 95°C’de 5 dakika kaynatılarak numuneler yüklemeye hazır hale getirildi. Çalışılacak olan proteinin kilo dalton (kDa) ağırlığı dikkate alınarak uygun yüzdelerde jeller hazırlandı. Her kuyucuğa 20 µl numune yüklenerek jel elektroforezi gerçekleştirildi. Elektroforez sonrasında immunoblotting yapılarak jeldeki proteinlerin membrana geçmesi sağlandı. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra, membran 1 saat süre ile oda sıcaklığında pH’sı 7.2-7.4 olan, %0.1 Tween-20 ilaveli Tris Buffer Solüsyonu ile hazırlanan %5’lik yağsız süt tozu ile bloklandı. Membran Fibronektin, β 3 integrin, MAPK3/1, fosfo-MAPK3/1, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α ve Beta aktin antikoları ile uygun sıcaklık ve sürede karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Kullanılan primer ve sekonder antikolar liste halinde Tablo 3.3.’de görülmektedir. İnkübasyon sonrasında, 3 kez 10 dakika TBS-T ile yıkamanın ardından membran sekonder antikolarla oda ısısında karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tekrar 3 kez 10 dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Membran Chemiluminisans’la uygun sürede geliştirilip, membrandaki protein bantları karanlık odada hiperfilme aktarıldı. Görüntüleme amacıyla film, geliştirme ve sabitleme solüsyonlarından geçirildi ve distile su ile yıkanıp kurutuldu.

Tablo 3.3. Western Blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar ve dilüsyonları.

Primer Antikor	Dilüsyon	Katalog Numarası	Sekonder Antikor
Fibronektin	1:500	Abcam ab2413	1:2000 BioRad 1706515
β3 integrin	1:500	Abcam ab75872	1:3000 BioRad 1706515
MAPK3/1	1:1000	Cell Signaling 4695	1:2000 BioRad 1706515
Fosfo-MAPK3/1	1:500	Cell Signaling 4370	1:2000 BioRad 1706515
HIF-1α	1:200	Abcam ab1	1:2000 BioRad 1706516
HIF-1β	1:1000	Abcam ab2771	1:2000 BioRad 1706516
HIF-2α	1:100	Santa Cruz sc-13596	1:2000 BioRad 1706516
Beta aktin	1:5000	Abcam ab6276	1:5000 BioRad 1706516

3.4. qRT -PCR (Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Protokolü

3.4.1. Hedef mRNA'ların Kantitatif Düzeylerinin Belirlenmesi

Kullanılan malzemeler ve cihazlar:

- MagNAlyser Green Beads (Doku parçalamak için kullanılan bilye içeren tüpler) (Roche, #03358941001)
- Trizol (İnvitrogen, #15596-026)
- BCP (1-Bromo-3-chloropropane, Sigma, #B9673)
- İzopropanol (Sigma, #I-9516)
- DNase/RNase içermeyen distile su (Gibco, #10977-035)
- MagNA lyser: Roche
- Thermomixer Comfort: Eppendorf
- MiniSpin: Eppendorf
- Soğutmalı santrifüj: Eppendorf, 5417R

1. İnsan plasenta dokusundan mRNA eldesi için, kontrol ve PE gruplara ait plasenta dokusunun bir parçası, MagNA lyser bilyelerini içeren steril tüplere alındı ve üzerine 1 ml Trizol eklenerek, MagNA lyser cihazında 6500 devirde, 2 kere 45 saniye muamele edilerek parçalandı. Bu işlem arasında tüpler 1 dakika buzda bekletildi.

2. Doku parçalarını içeren tüpler, oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra 13.000 rpm'de 3 saniye kısaca spin edilerek doku debrisinin dibe çökmesi sağlandı. Bilyelerin üzerinde kalan sıvı kısımlar yeni eppendorflara aktarıldı ve üzerine 100 µl BCP eklenerek altüst etmek sureti ile karışması sağlandı. Eppendorflar 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
3. Bu sürenin sonunda tüpler 15 dakika +4°C'de 11.000 rpm'de santrifüj edildi.
4. Santrifüjden sonra tüpün üstünde RNA'nın bulunduğu şeffaf kısım, steril 1.5 ml'lik yeni bir tüpe alındı.
5. Tüpe 500 µl izopropanol eklenip altüst ederek karışması sağlandı ve oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
6. Bu sürenin sonunda, 8 dakika, +4°C'de, 11.000 rpm'de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp geriye kalan pelet üzerine 1 ml %70'lik etanol konularak yıkama gerçekleştirildi ve ardından 5 dakika, +4°C'de, 8400 rpm'de santrifüj edilerek süpernant atıldı.
8. Elde edilen pelet oda ısısında etanolün uçması için en fazla 10 dakika bekletildikten sonra, 50 µl RNaz içermeyen distile su ile çözüldü.
9. Çözülmüş olan RNA'yı içeren tüpler, Thermomikser cihazında 55 derecede 10 dakika inkübe edildi ve ardından -80°C'de muhafaza edildi.

3.4.2. DNaz Uygulaması

Kullanılan malzemeler ve cihazlar:

- UV Half Plate Area (With UV Transparent Bottom, 96 well, Corning #3679)
 - DNase I (Invitrogen, #18068-015)
 - DEPC su (DEPC Treated water, Pyrogen Free, Invitrogen, #46-2224)
 - Spektrofotometre: µQuant BioTek Spectrophotometer
1. İzole edilen total RNA'ların absorbans değerleri spektrofotometre cihazında yapılan ölçüm ile belirlendi. RNA miktarı = (Absorbans değeri) x (dilüsyon faktörü) x (RNA sabiti (40)) formülü ile hesaplandı.
 2. RNA konsantrasyonu 2 µg olacak şekilde hesaplama yapılarak genomik DNA'nın ortamdaki uzaklaştırılması için izole edilen total RNA ayrı bir tüpe alınarak DNaz uygulaması gerçekleştirildi. Bunun için;

Elde edilen RNA 10 mikrogram'lik µl'lik hacimde

DNaz I enzimi	1 µl
10X DNaz I tamponu	1 µl
DEPC su	12 µl'ye tamamlanacak şekilde hesaplama yapıldı.

- 0,2 ml'lik steril PCR tüpüne konulan içerikler, 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- Süre sonunda 1 µl DNase stop solüsyonundan konuldu. Vorteks yardımı ile içeriğin tamamen karışması sağlandı ardından tüpler spin edildi ve 65 derecede 10 dakika inkübe edildi.
- Bu sürenin sonunda tüpler buz üzerine alındı ve 13200 rpm'de, 2 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpematant yeni steril bir tüpe alındı. Böylece, genomik DNA ortamdan uzaklaştırıldı.

3.4.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi

Kullanılan malzemeler ve cihazlar:

- Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, #18080-051)
 - PCR cihazı: MyCycler Thermocycler, BioRAD
- DNase muamelesi yapılan RNA örneklerinden 8 µl 0.2 ml'lik yeni bir steril PCR tüpüne kondu. Üzerine 1 µl Random Hexamers ve 1 µl 10 mM dNTPmix pipetlendi.
 - Bu karışım 65°C'de 5 dakika bekletilerek RNA'daki ikincil kıvrımların çözülmesi sağlandı.
 - Süre sonunda tüpler buza alınarak karışım üzerine aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi hazırlanmış olan 10 µl'lik cDNA sentez karışımı konuldu.

<u>İçerik</u>	<u>Hacim</u>
10X RT buffer	2.0 µl
25 mM MgCl ₂	4.0 µl
0.1 M DTT	2.0 µl
RNase out	1.0 µl
Superscript III	1.0 µl
<u>Toplam</u>	10.0 µl

4. PCR cihazında tüpler 25°C’de 10 dakika, 50°C’de 50 dakika ve 85°C’de 5 dakika inkübe edildi.
5. Bu sürenin sonunda tüpler buza alındı. Tüplere 1 µl RNase H kondu ve vorteks yardımı ile karıştırılarak ardından spin edildi.
6. Ardından tüpler 37°C’de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere 80 µl DEPC su eklenerek toplam hacim 100 µl’ye tamamlandı. Vorteks-spin işleminden sonra elde edilen cDNA’lar -20°C’de saklandı.

3.4.4. qRT-PCR Uygulaması

Kullanılan malzemeler ve cihazlar:

- QuantiFast SYBR Green PCR kit (Qiagen, # 204054)
- PCR strip tüpleri (Axygen, #PCR-0108-LP-RT-C)
- Real Time PCR cihazı: StepONEplus Real Time PCR System, Applied Biosystems

1. Deney gruplarından yukarıda belirtildiği gibi elde edilen cDNA’lar qRT-PCR uygulamasında kullanıldı.
2. Aşağıdaki tabloda belirtilen içerikler konularak reaksiyon karışımı oluşturuldu.

<u>İçerik</u>	<u>Miktarları (µl)</u>
2X SybrGreen Mastermix	12.5
Primer ileri (10 µM)	1
Primer geri (10 µM)	1
cDNA	2
RNaz içermeyen su	8.5
<u>Toplam hacim</u>	25 µl

3. qRT-PCR uygulaması ikili (dublik) olarak gerçekleştirildi. Fibronektin, β3 integrin, MAPK3/1, fosfo-MAPK3/1, HIF-1α, HIF-1β, HIF-2α ve Beta aktin için hazırlanmış strip tüpler qRT-PCR aletinde okundu ve software programı yardımıyla CT (siklus eşik değerleri) değerleri belirlendi. Elde edilen CT değerleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülünde kullanılarak her genin (Tablo 3.4.) kontrol grubuna kıyasla göreceli değişim düzeyleri hesaplandı. Amplifikasyon, 35 siklusta gerçekleştirildi. Ayrıca, Melting curve analizi ile ürünlerin beklenen ve gözlenen Tm değerleri karşılaştırılarak PCR ürünlerinin doğruluğu değerlendirildi.

qRT-PCR uygulamasında uygulanan PCR programı:

Denatürasyon: 95°C’de 5 dakika

Amplifikasyon: 35 siklus

95°C...10 saniye,

55°C...30 saniye,

72°C...30 saniye

Melting curve: 1 siklus: 95°C...1 dakika, 55°C...1 dakika

Tablo 3.4. qRT-PCR için kullanılan oligonükleotid sekansları.

	Forward primer	Reverse primer
Fibronektin	5'-GCAGTGGCTGAAGACACAAG-3'	5'-TGGTGCAGGAGTAGAACGTC-3'
β3 integrin	5'-CCATGGATTCCAGCAATGTC-3'	5'-GCAGGTGGCATTGAAGGATA-3'
MAPK1	5'-CCATTCAGCTAACGTTCTGC-3'	5'-TCATGGTCTGGATCTGCAAC-3'
MAPK3	5'-ATTGTGCAGGACCTGATGGA-3'	5'-TTGGCGGAGTGGATGTACTT-3'
HIF-1α	5'-CCTTCGATCAGTTGTCACCA-3'	5'-ATTCATCAGTGGTGGCAGTG-3'
HIF-1β	5'-ACGGAACAAGATGACAGCCT-3'	5'-GGAGCCATCAGTGGATGTGT-3'
HIF-2α	5'-TGTCAACCTCAAGTCAGCCA-3'	5'-CACATGATGATGAGGCAGGA-3'
Beta aktin	5'-GAGCAAGAGAGGCATCCTCA-3'	5'-CCACACGCAGCTCATTGTAG-3'

3.5. İstatiksel Analiz

PE ve kontrol gruplarına ait hasta verileri SigmaStat 3.5 programı kullanılarak karşılaştırıldı. One Way ANOVA testleri uygulandı ve $p \leq 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Deney gruplarına ait western blot bantların yoğunlukları DigiDog 1000 programı kullanılarak analiz edildi. Değerler beta aktin yoğunluklarına göre normalize edildi. Elde edilen verilere SigmaStat 3.5 programı kullanılarak One Way ANOVA testleri yapıldı ve $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. qRT-PCR sonucu elde edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri için One Way ANOVA testinde

Holm Sidak metodu ile çoklu karşılaştırma yapıldı ve $p \leq 0,001$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Deney Gruplarının Verilerinin Karşılaştırılması

PE tanısı konulan hastaların ve herhangi bir komplikasyon saptanmayan gebelerin (kontrol grubu) doğum sonrası term plasentaları toplanmıştır. PE ve kontrol gruplarına ait hasta verileri (hastaların yaşı, gebelik haftası, fetal ve plasental ağırlıklar, sistolik ve diastolik kan basıncı ve proteinüri değerleri) toplanmıştır (Tablo 4.1.). PE hastaların fetal ve plasental ağırlıklarının ve plasenta/fetüs ağırlık oranlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu bulunmuştur. Bunların yanı sıra, PE grubun sistolik ve diastolik kan basıncı kontrolden anlamlı şekilde daha yüksektir.

Tablo 4.1. PE ve kontrol gruplarına ait hasta verileri.

	PE n=15	Kontrol n=13	p değeri
Anne yaşı	31.0 ± 0.77	28.61 ± 0.97	0.064
Gebelik haftası	37.26 ± 0.26	37.76 ± 0.20	0.095
Fetüs ağırlığı (g)	2962 ± 70.3	3383.07 ± 122.32	0.003*
Plasental ağırlık (g)	384.20 ± 24.74	541.07 ± 15	<0.001*
Plasenta/fetüs ağırlık oranı	0.13 ± 0.005	0.16 ± 0.003	<0.001*
Sistolik kan basıncı (mmHg)	154 ± 2.72	109.53 ± 2.90	<0.001*
Diastolik kan basıncı (mmHg)	100.33 ± 2.60	81.15 ± 2.27	<0.001*
Proteinüri (g/24 saat)	0.47 ± 0.021	-	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

*Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı değerler ($p < 0.05$; Student's t-test).

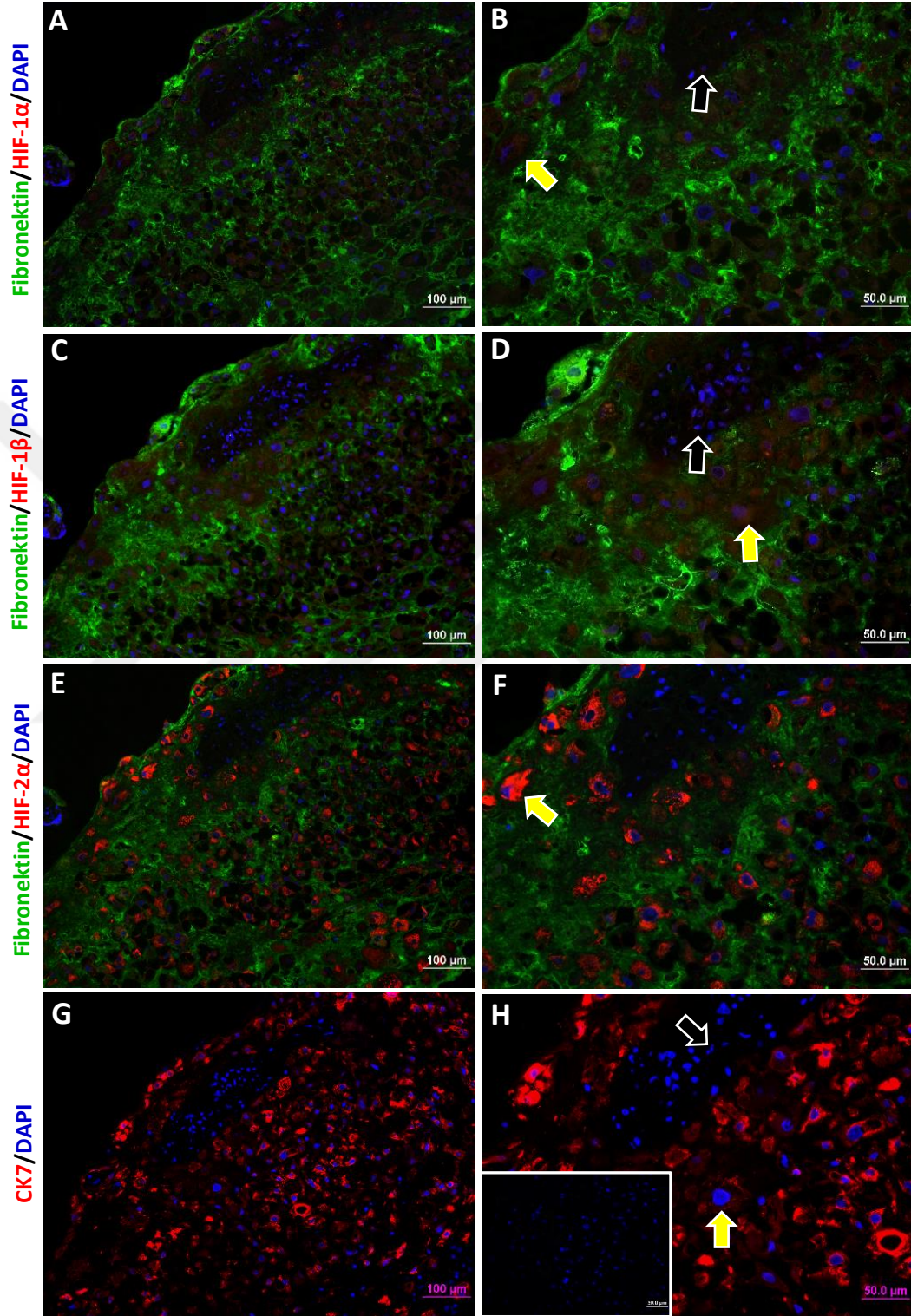
4.2. İmmünoflorasan Boyama Bulguları

4.2.1. Fibronektin ve HIF Proteinlerinin (HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α) Çiftli İmmünoflorasan Boyanmaları

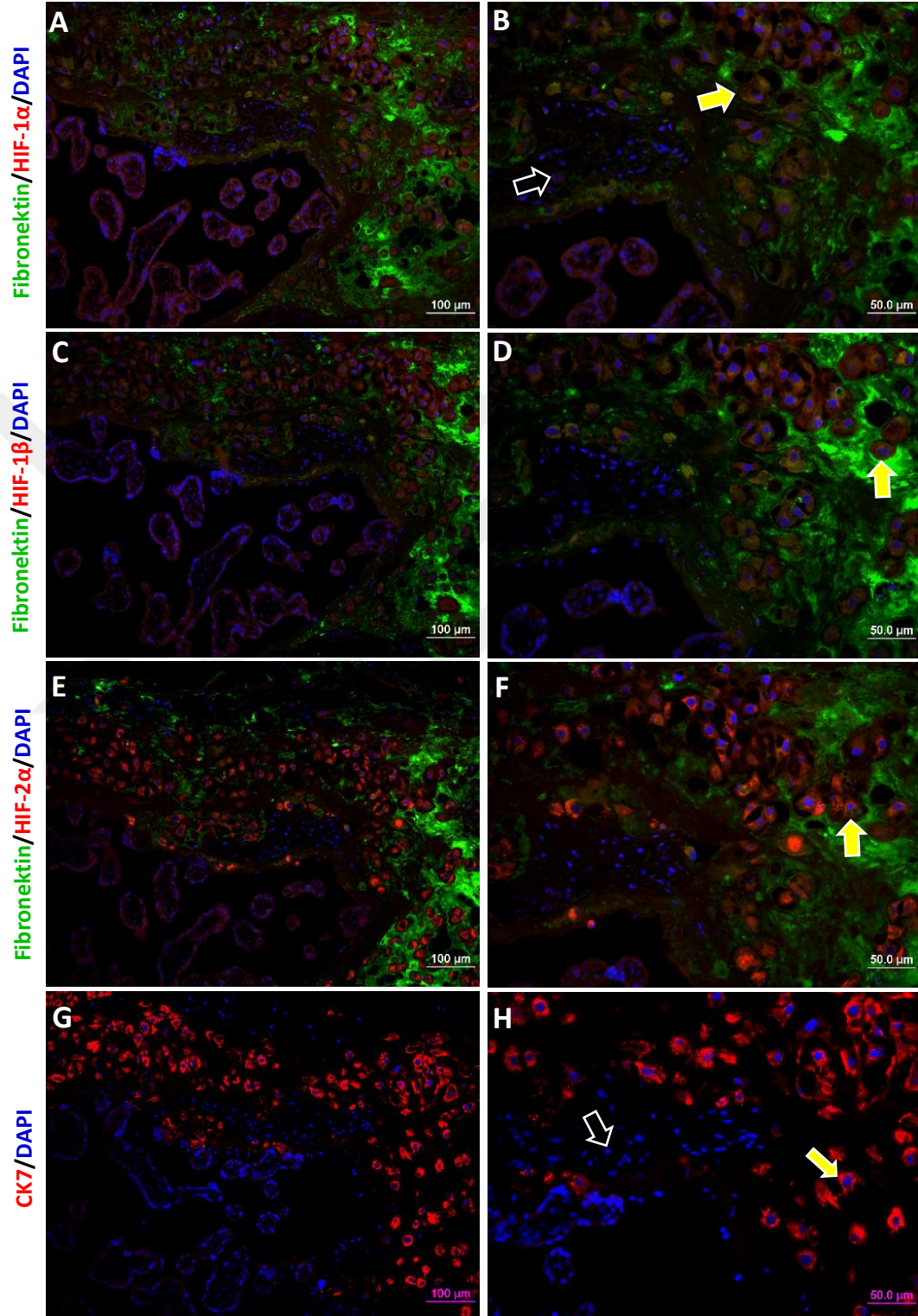
Plasentanın desidua bazalis kısmında ESM proteini fibronektinin immünoreaktivitesi desiduanın özellikle fibrinoid birikimlerinde (Şekil 4.2.) ve desidual hücrelerde (Şekiller 4.1. ve 4.2.) yoğun şekilde gözlendi.

HIF proteinleri (HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α) desidudaki EVT'lerde ve desidual hücrelerde ekspresyon gösterdi. HIF-1 α ve HIF-1 β proteinlerinin EVT'lerdeki ekspresyonu orta düzeyde iken HIF-2 α immünoreaksiyonu EVT'lerde yoğundu. Desidual hücreler ise her üç proteinle de zayıf şekilde immünoreaktivite verdi. (Şekil 4.1.).

Kontrol ve PE plasentalarda (Şekiller 4.1. ve 4.2.) sarı oklarla gösterilen EVT'ler fibronektin ile sırasıyla HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α proteinlerini birlikte eksprese etti.

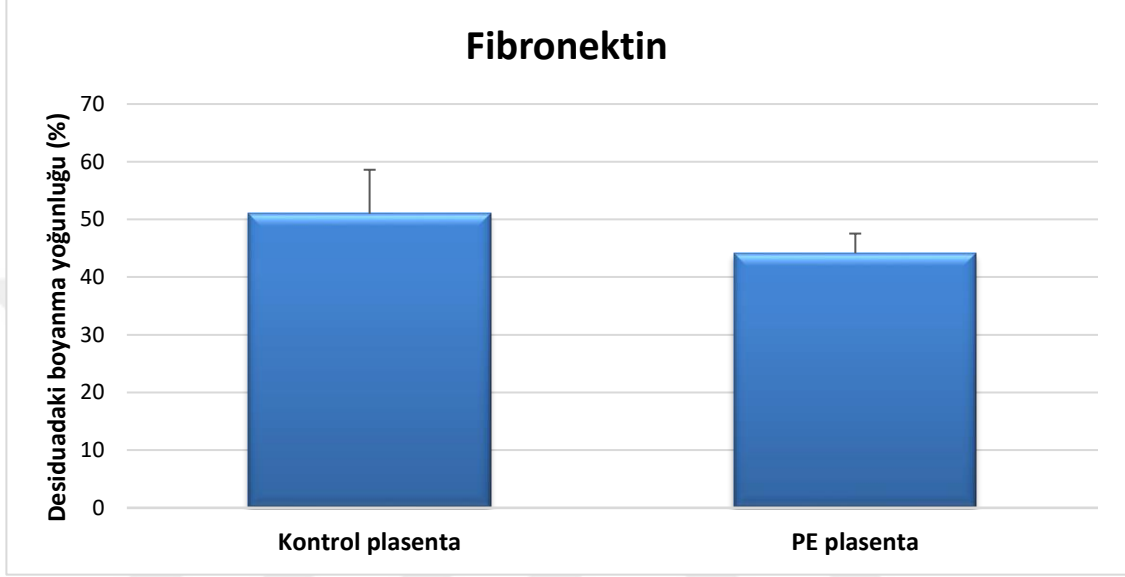


Şekil 4.1. Kontrol plasentaların desidua bazalis bölümünde fibronektin ve HIF çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: Fibronektin ve HIF-1 α , C ve D: Fibronektin ve HIF-1 β , E ve F: Fibronektin ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: Sitokeratin 7 (CK7) immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi), h'deki kutucuk: Negatif kontrol. EVT'ler (sarı oklar), desidual hücreler (siyah oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.



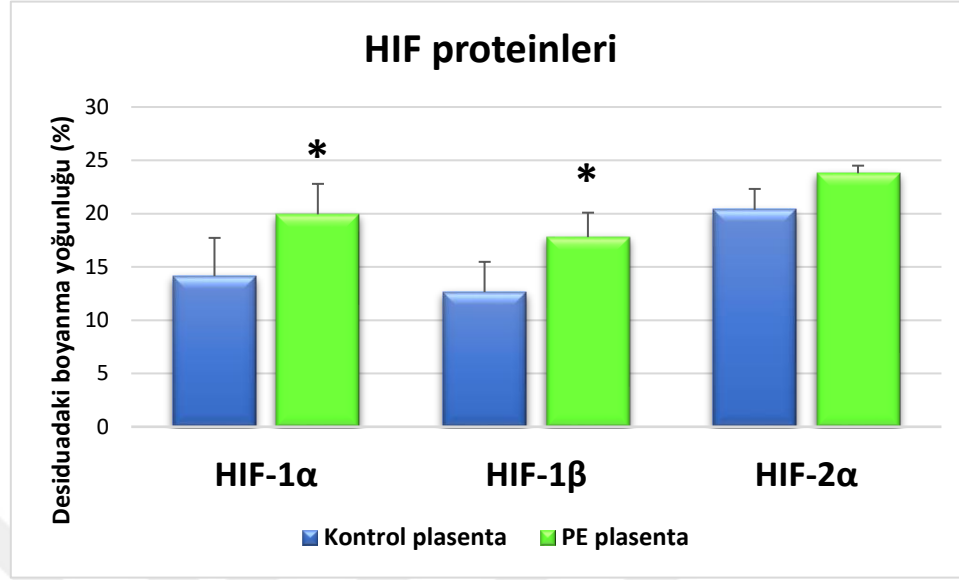
Şekil 4.2. PE plasentaların desidua bazalis bölümünde fibronektin ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: Fibronektin ve HIF-1 α , C ve D: Fibronektin ve HIF-1 β , E ve F: Fibronektin ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). EVT'ler (sarı oklar), desidua hücreler (siyah oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.

Kontrol ve PE plasentaların desidua bazalis bölümünde fibronektin immünoflorasan boyanma yoğunluğu kıyaslandığında, PE plasentalarda boyanma şiddetinin bir miktar azaldığı fakat bunun anlamlı olmadığı ($p=0,062$) belirlendi (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Kontrol ve PE plasentaların desidua bazalis bölümünde fibronektin immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik.

HIF-1 α ve HIF-1 β 'nin desidua bazalis'deki boyanma yoğunlukları PE plasentalarda kontrole göre anlamlı şekilde artış (sırasıyla $p=0,019$ ve $p=0,003$) gösterdi. PE plasentalarda HIF-2 α 'nın desidual boyanma yoğunluğu da kontrole göre arttı ancak bu artış anlamlı değildi ($p=0,351$) (Şekil 4.4.).

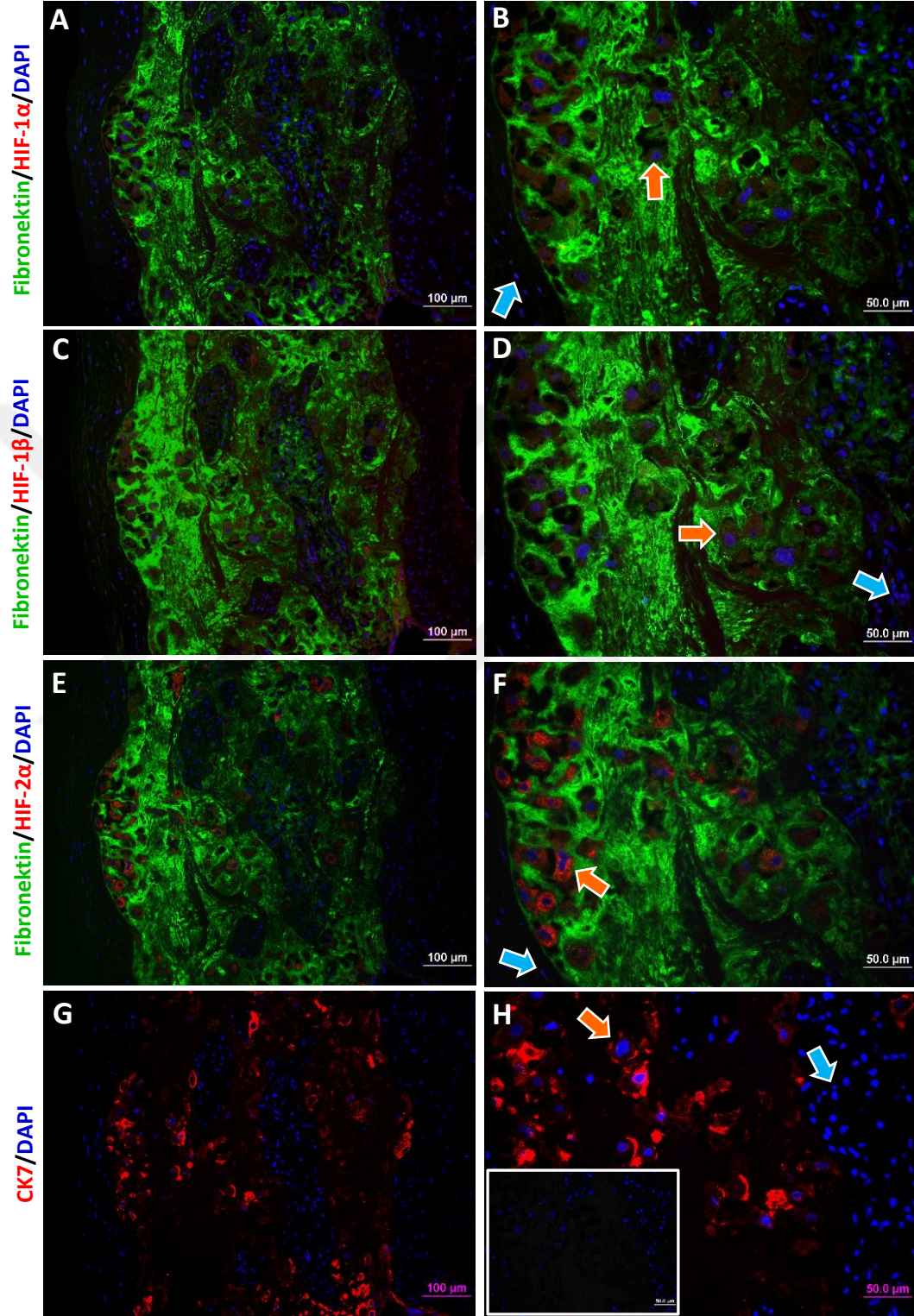


Şekil 4.4. Kontrol ve PE plasentaların desidua bazalis bölümünde HIF proteinlerinin immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik. * işareti $p \leq 0,05$ göstermektedir.

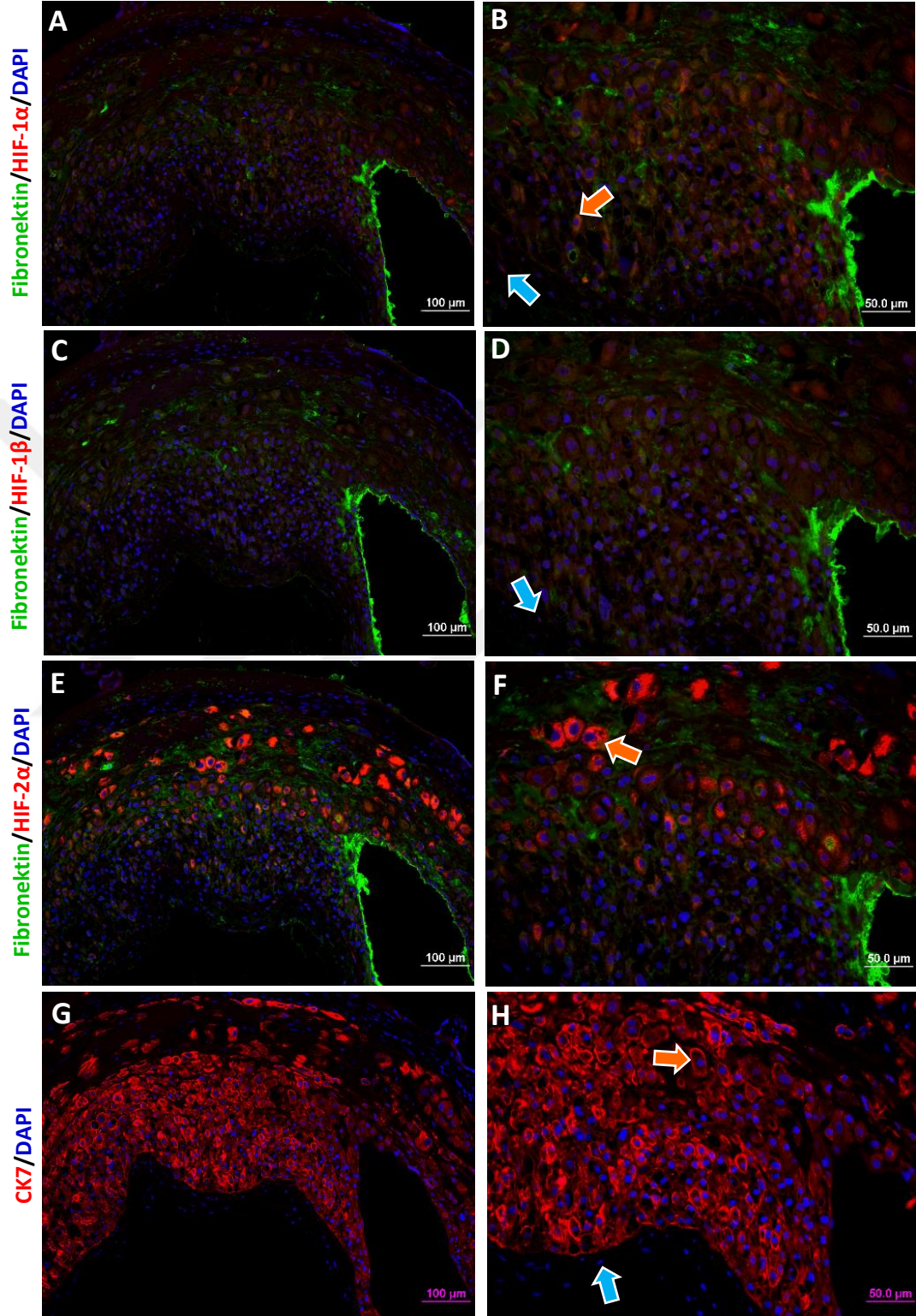
Koryonik plak'taki fibronektin immünoflorasan boyanması, özellikle fibrinoid birikim bölgelerinde ve ESM'de fazla miktarda tespit edildi (Şekil 4.5.).

HIF proteinleri (HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α) koryondaki sitotrofoblastlarda ve koryonik mezenşimal hücrelerde ekspresyon gösterdi. Koryonik sitotrofoblastlarda HIF-1 α ve HIF-1 β ekspresyonu orta düzeyde HIF-2 α immünoreaktivitesi ise şiddetli bulundu. Koryonik mezenşimal hücrelerin immünoflorasan reaksiyonu her üç proteinle de zayıf şekilde oldu (Şekil 4.5.).

Şekiller 4.5. ve 4.6.'da kontrol ve PE plasentalarda, turuncu okların belirttiği koryonik plaktaki sitotrofoblastlarda fibronektin ve sırasıyla HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α beraber ekspresyon gösterdi.

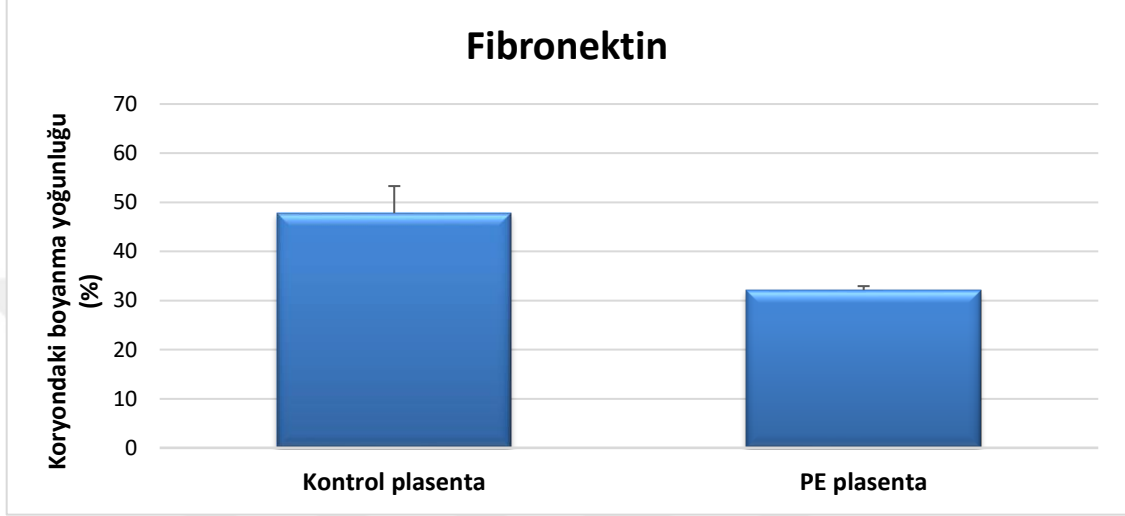


Şekil 4.5. Kontrol plasentaların koryonik plak bölümünde fibronektin ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: Fibronektin ve HIF-1 α , C ve D: Fibronektin ve HIF-1 β , E ve F: Fibronektin ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi), h'deki kutucuk: Negatif kontrol. Koryonik plaktaki sitotroblastlar (turuncu oklar), koryonik mezenşimal hücreler (mavi oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.



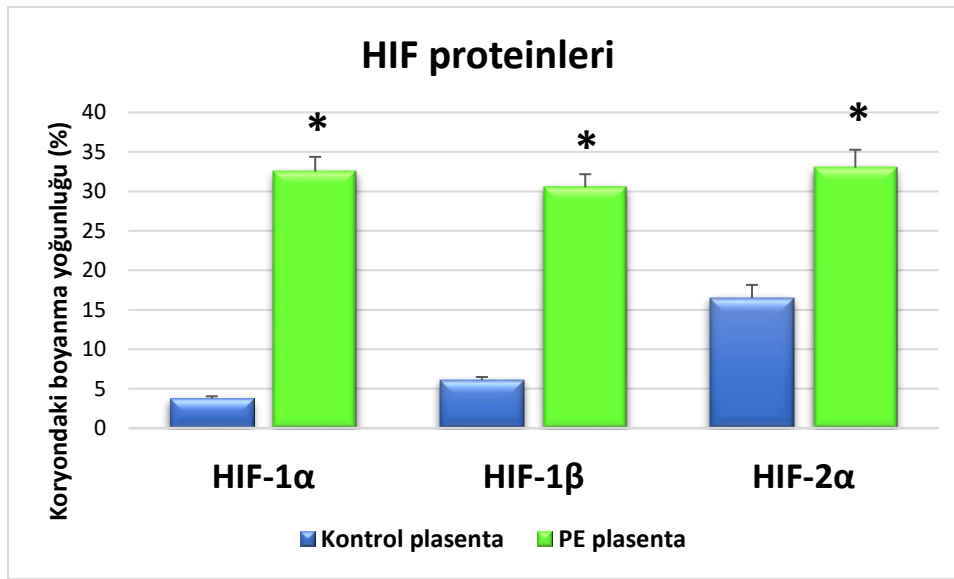
Şekil 4.6. PE plasentaların koryonik plak bölümünde fibronektin ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: Fibronektin ve HIF-1 α , C ve D: Fibronektin ve HIF-1 β , E ve F: Fibronektin ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). Koryonik plaktaki sitotrofolblastlar (turuncu oklar), koryonik mezenşimal hücreler (mavi oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.

Kontrol ve PE plasentaların koryonik plaklarında fibronektin immünoflorasan boyanma yoğunluğu PE plasentalarda biraz azaldı ancak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,102$) (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Kontrol ve PE plasentaların koryonlarındaki fibronektin immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik.

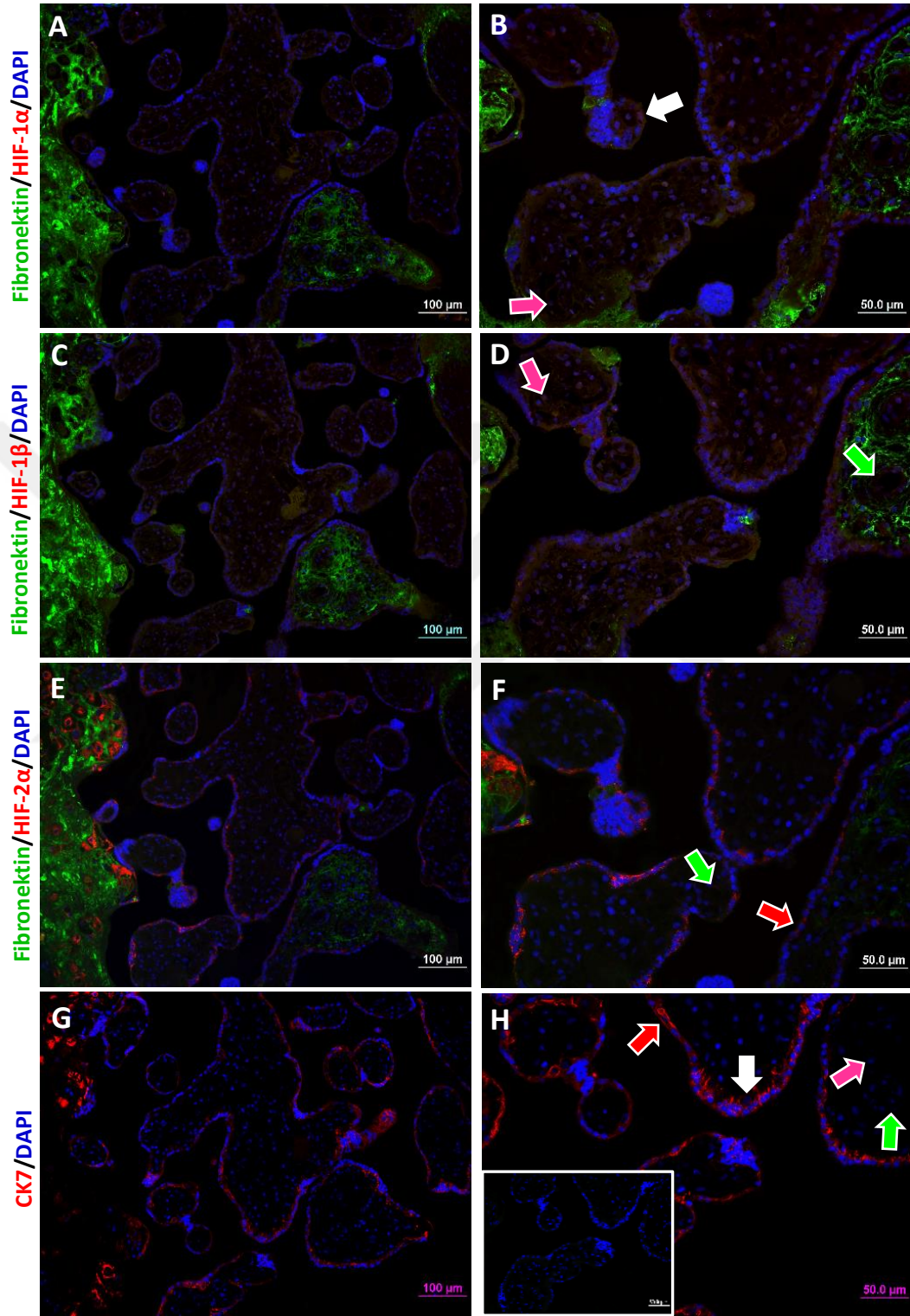
Tüm HIF proteinlerinin koryondaki boyanma yoğunlukları PE plasentalarda kontrole göre anlamlı şekilde artış ($p<0,001$) gösterdi. En şiddetli boyanmalar HIF-2 α tespit edildi (Şekil 4.8.).



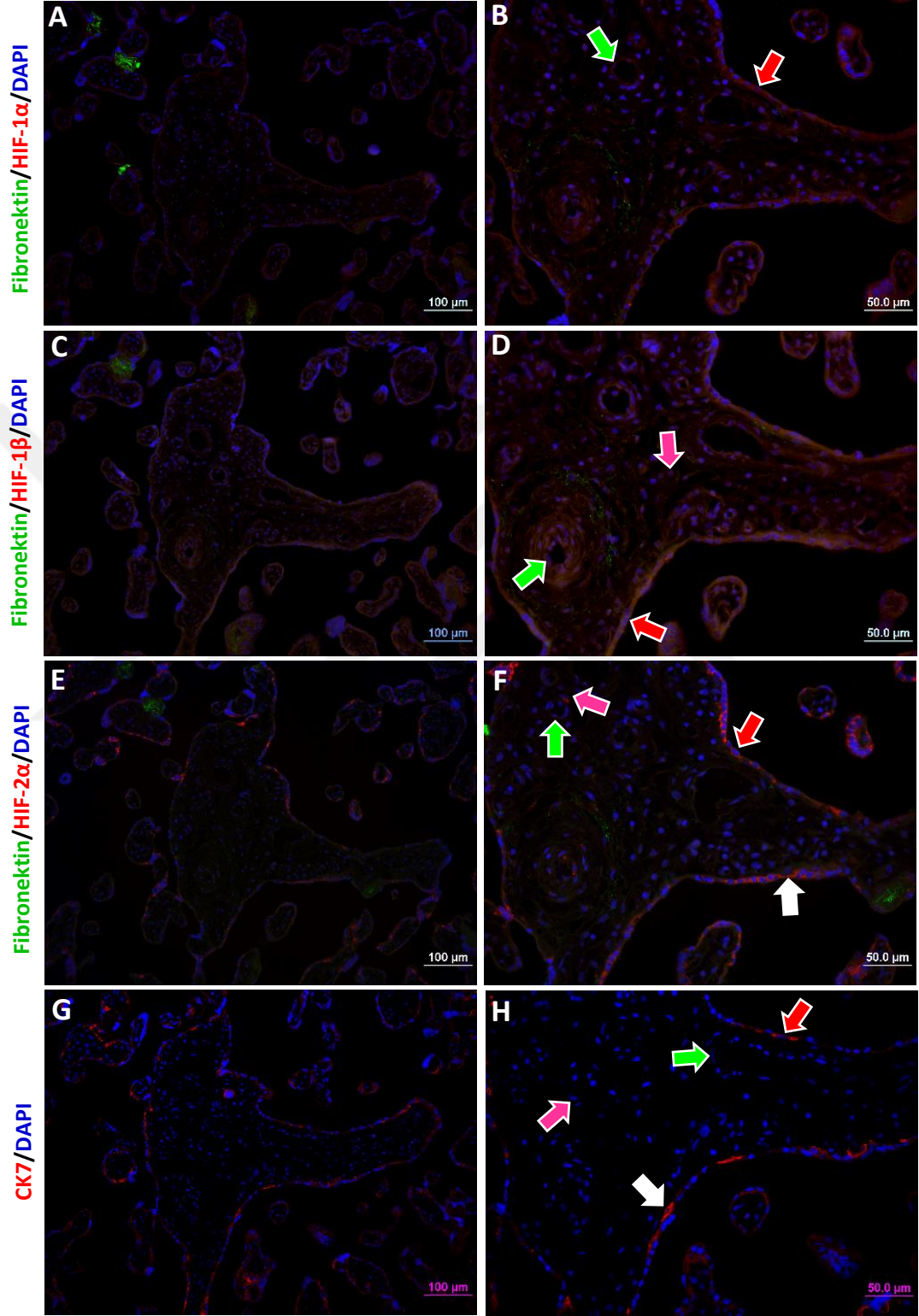
Şekil 4.8. Kontrol ve PE plasentaların koryonlarında HIF proteinlerinin immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik. * işareti $p\leq 0,001$ göstermektedir.

Plasental villüslerdeki fibronektin ekspresyonu plasentanın desidua bazalis bölümüne ve plasentanın koryonik plak bölgelerine kıyasla intervillöz ve intravillöz bölgelerde azaldı (Şekil 4.9.). Sonuçlarımıza göre fibronektin ekspresyonunun villüs tipine göre farklılıklar gösterebileceği düşünülmektedir. Örneğin, kontrol plasentadaki matür ve mezenşimal villüslerde yoğun boyanmalar mevcut iken (Şekiller 4.9. B, D, F) kontrol ve PE plasentadaki MİV'lerde daha az boyanmalar mevcut bulundu.

HIF proteinleri (HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α) villüslardaki tüm hücre tiplerinde (villöz sitotrofoblastlar, sinsisyotrofoblast, fetal endotel hücreleri, villöz stromal hücreler) ekspresyon gösterdi. Villöz sitotrofoblastlarda ve sinsisyotrofoblastta HIF-1 α ve HIF-1 β ekspresyonu orta düzeyde, HIF-2 α immünoreaktivitesi ise şiddetli olarak tespit edildi. Fetal endotel hücreleri ve villöz stromal hücrelerin boyanması ise her üç proteinle de orta düzeyde gerçekleşti (Şekiller 4.9. ve 4.10.).

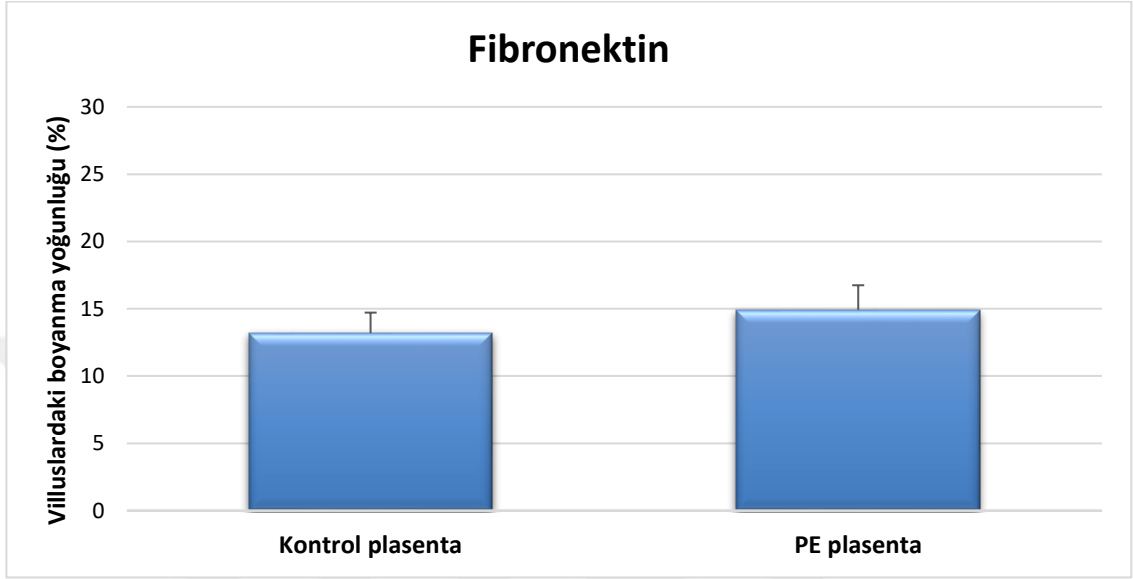


Şekil 4.9. Kontrol plasentaların villuslarında fibronektin ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: Fibronektin ve HIF- α , C ve D: Fibronektin ve HIF- β , E ve F: Fibronektin ve HIF- 2α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi), h'deki kutucuk: Negatif kontrol. Villöz sitotrofoblastlar (beyaz oklar), sinsisyotrofoblast (kırmızı oklar), fetal endotel hücreleri (yeşil oklar), villöz stromal hücreler (pembe oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.



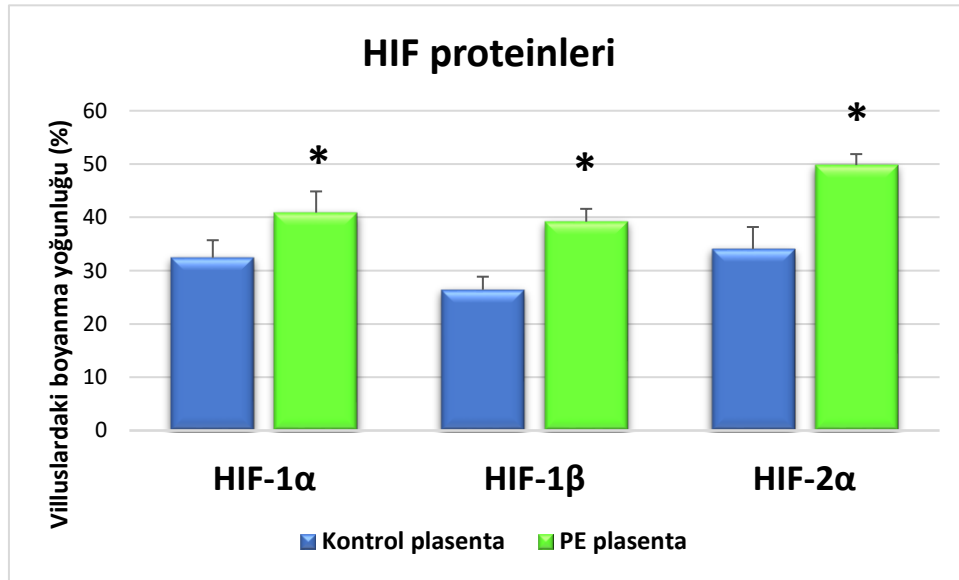
Şekil 4.10. PE plasentaların villuslarında fibronektin ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: Fibronektin ve HIF-1 α , C ve D: Fibronektin ve HIF-1 β , E ve F: Fibronektin ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). Villöz sitotrofoblastlar (beyaz oklar), sinsiyotrofoblast (kırmızı oklar), fetal endotel hücreleri (yeşil oklar), villöz stromal hücreler (pembe oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.

Kontrol ve PE plasentaların villuslarındaki fibronektin immünoflorasan boyanma yoğunluğu arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,477$) (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Kontrol ve PE plasentaların villuslarında fibronektin immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik.

Tüm HIF proteinlerinin (HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α) plasental villuslardaki boyanma yoğunlukları PE plasentalarda kontrole göre anlamlı şekilde arttı (sırasıyla $p= 0,019$, $p<0,001$ ve $p= 0,023$) (Şekil 4.12.).



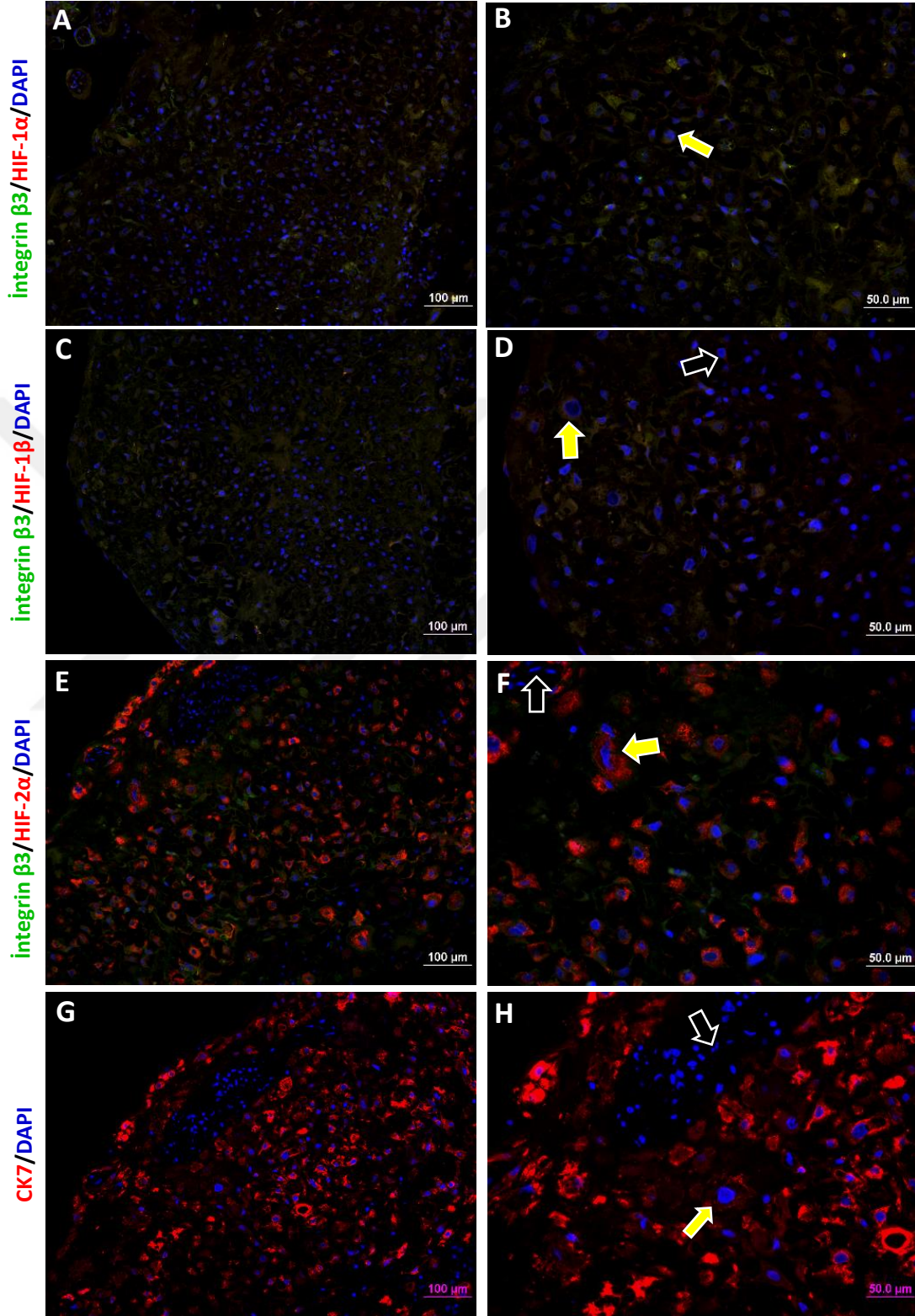
Şekil 4.12. Kontrol ve PE plasentaların villuslarında HIF proteinlerinin immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik. * işareti $p\leq 0,05$ göstermektedir.

4.2.2. $\beta 3$ integrin ve HIF Proteinlerinin (HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α) İkili İmmünoflorasan Boyanmaları

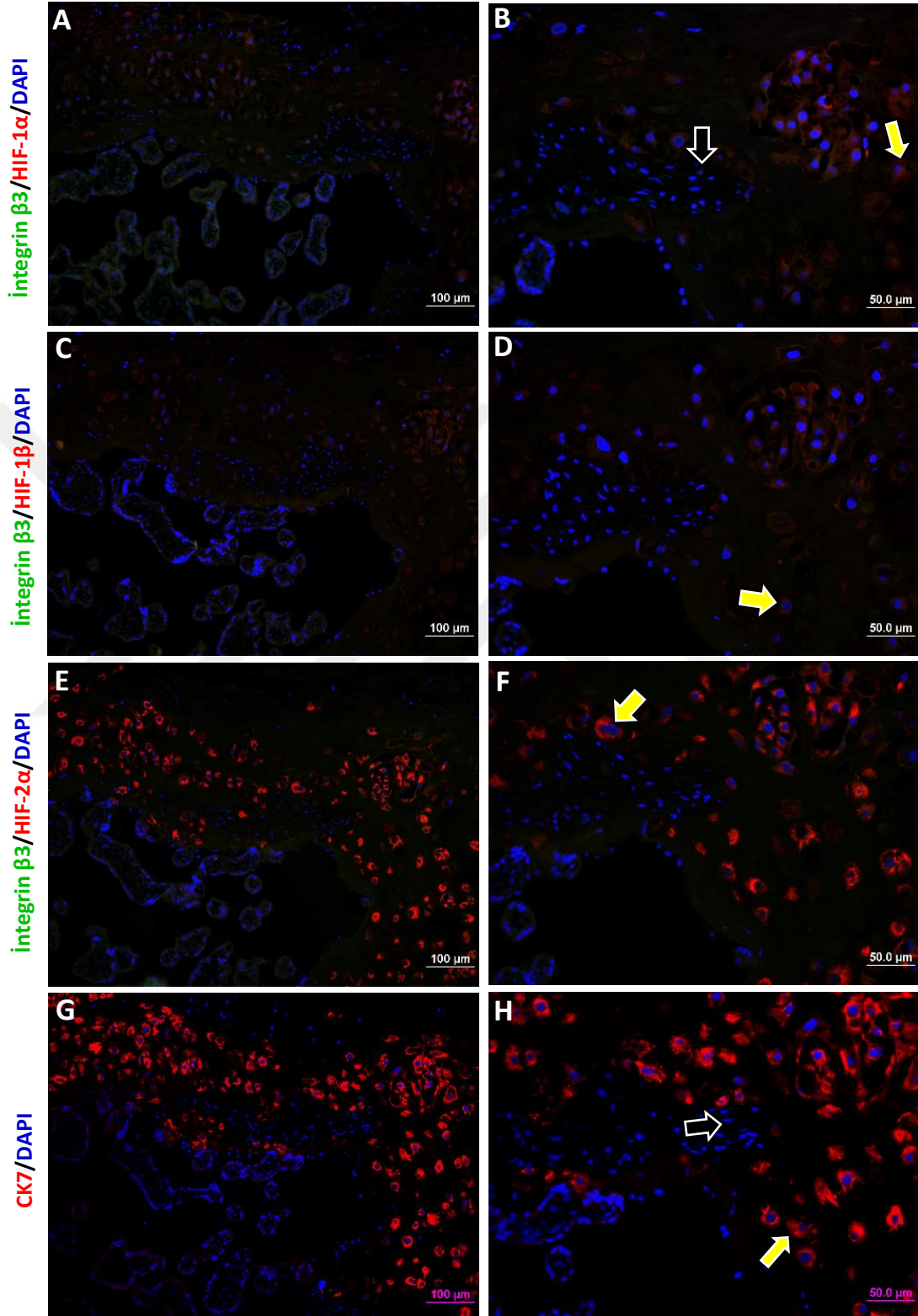
Plasentanın desidua bazalis kısmında hücre membranında mevcut olan $\beta 3$ integrin tüm desidual hücrelerde zayıf şekilde pozitif immünoreaktivite gösterdi (Şekiller 4.13. ve 4.14.).

Şekiller 4.13. ve 4.14.'te hem kontrol ve hem de PE plasentalarda sarı oklarla ayırt edilen EVT'lerde $\beta 3$ integrin ve sırasıyla HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α birlikte ekspresyon gösterdi.



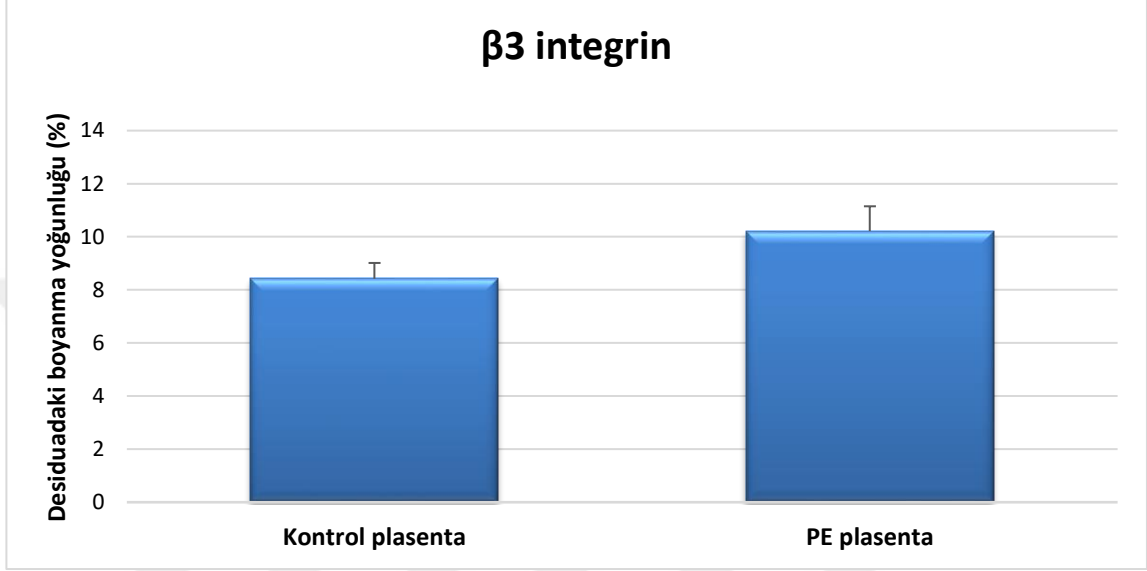


Şekil 4.13. Kontrol plasentaların desidua bazalis bölümlerinde $\beta 3$ integrin ve HIF çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: $\beta 3$ integrin ve HIF-1 α , C ve D: $\beta 3$ integrin ve HIF-1 β , E ve F: $\beta 3$ integrin ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). EVT'ler (sarı oklar), desidual hücreler (siyah oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.



Şekil 4.14. PE plasentaların desidua bazalis bölümlerinde $\beta 3$ integrin ve HIF çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: $\beta 3$ integrin ve HIF-1 α , C ve D: $\beta 3$ integrin ve HIF-1 β , E ve F: $\beta 3$ integrin ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). EVT'ler (sarı oklar), desidual hücreler (siyah oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.

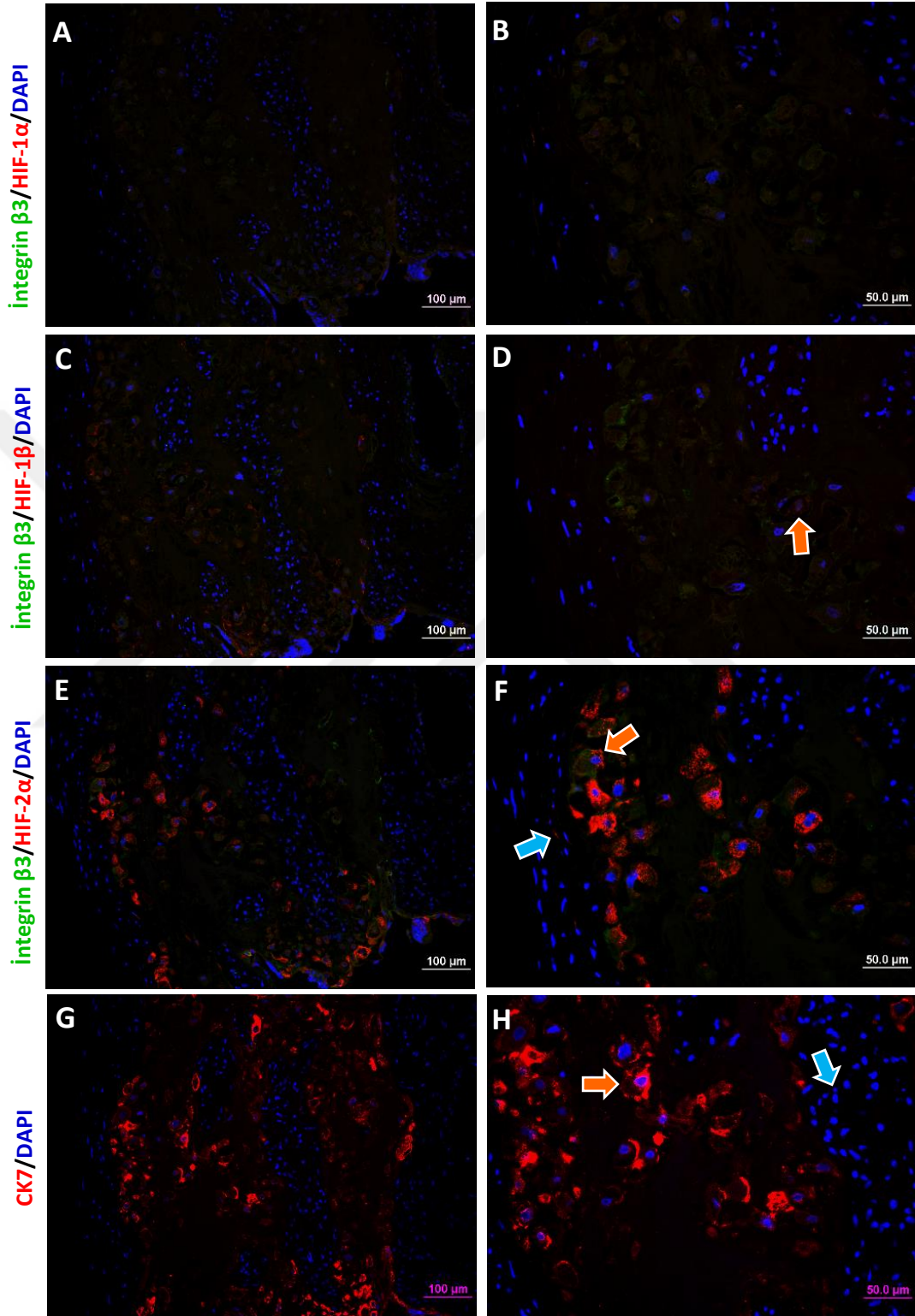
Kontrol ve PE plasentaların desidua bazalis bölümlerinde $\beta 3$ integrin immünoflorasan boyanma yoğunluğu kıyaslandığında, PE plasentalarda boyanma şiddetinin arttığı ancak bu artışın anlamlı olmadığı ($p=0,160$) bulundu (Şekil 4.15.).



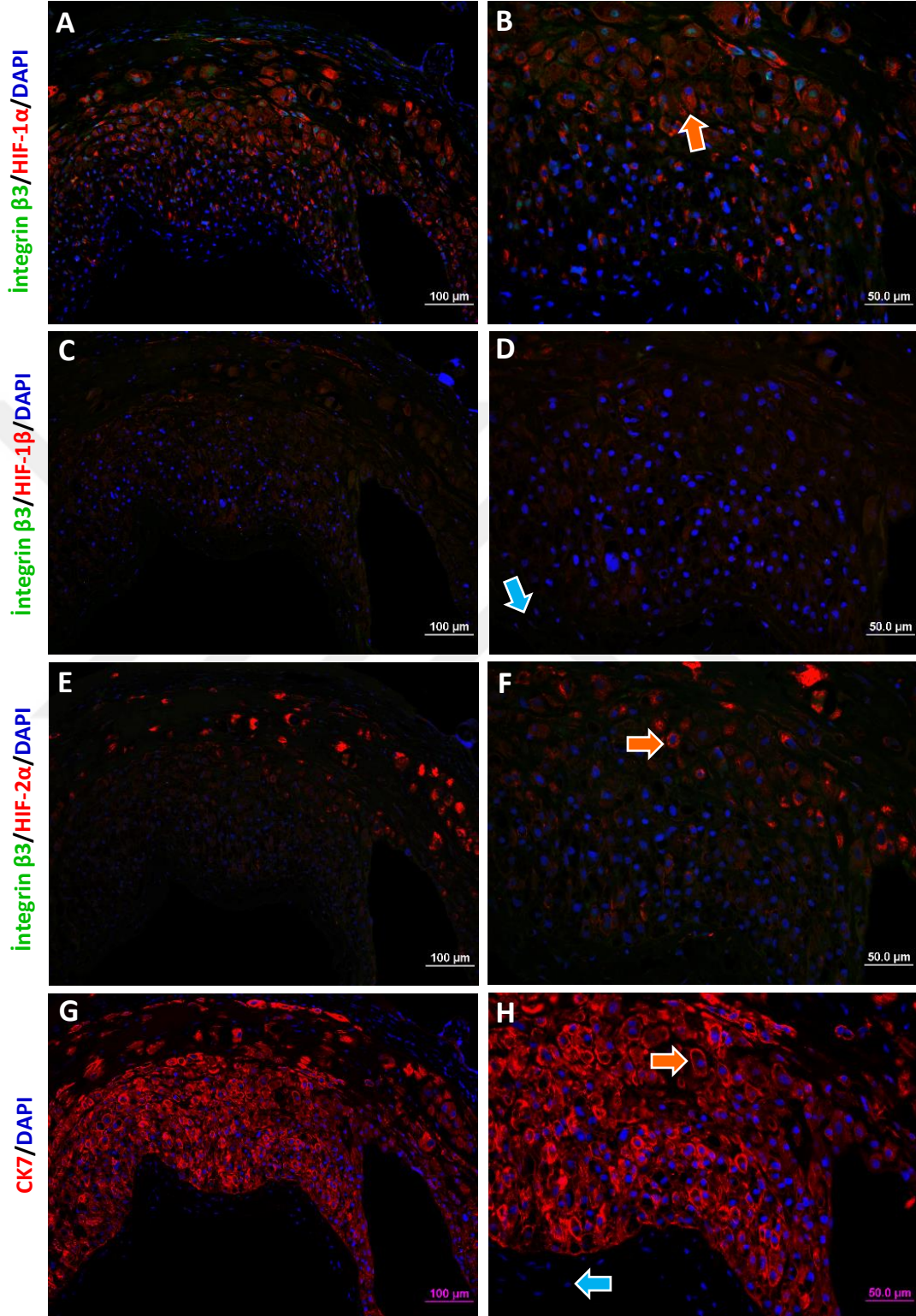
Şekil 4.15. Kontrol ve PE plasentaların desidua bazalis bölümlerinde $\beta 3$ integrin immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik.

Plasentanın koryonik plak bölümündeki $\beta 3$ integrin immünoflorasan boyanması, desidua bazalise benzer şekilde tüm hücrelerde zayıf şekilde idi (Şekiller 4.16. ve 4.17.).

Kontrol ve PE plasentalarda (Şekiller 4.16. ve 4.17.) sarı oklarla ayırt edilen EVT'lerde $\beta 3$ integrin ve sırasıyla HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α beraber eksprese oldu.

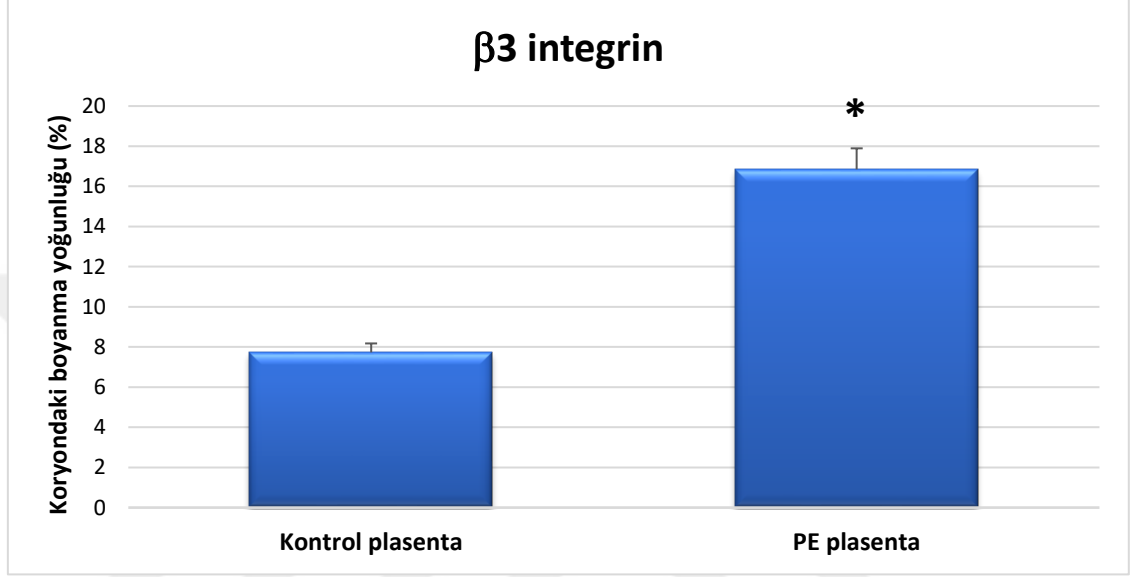


Şekil 4.16. Kontrol plasentaların koryonik plak bölümündeki $\beta 3$ integrin ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: $\beta 3$ integrin ve HIF-1 α , C ve D: $\beta 3$ integrin ve HIF-1 β , E ve F: $\beta 3$ integrin ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). Koryonik plaktaki sitotrofoblastlar (turuncu oklar), koryonik mezenşimal hücreler (mavi oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40



Şekil 4.17. PE plasentaların koryonik plak bölümündeki $\beta 3$ integrin ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: $\beta 3$ integrin ve HIF- 1α , C ve D: $\beta 3$ integrin ve HIF- 1β , E ve F: $\beta 3$ integrin ve HIF- 2α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). Koryonik plaktaki sitotrofoblastlar (turuncu oklar), koryonik mezenşimal hücreler (mavi oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.

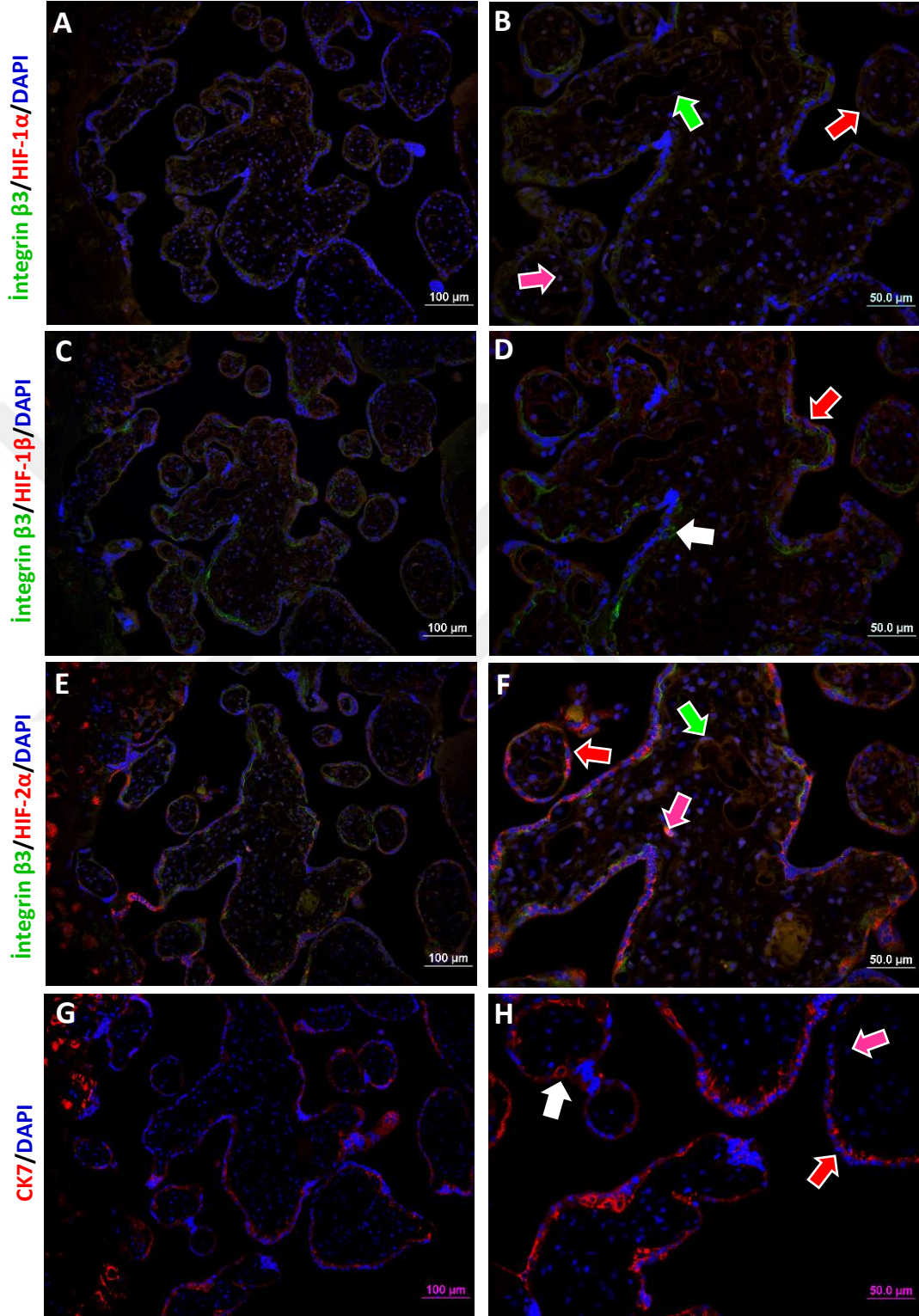
Kontrol ve PE plasentaların koryonik plak kısmında $\beta 3$ integrin immünoflorasan boyanma yoğunluğu kıyaslandığında, PE plasentalarda boyanma şiddetinin anlamlı şekilde arttığı ($p < 0,001$) görüldü (Şekil 4.18.).



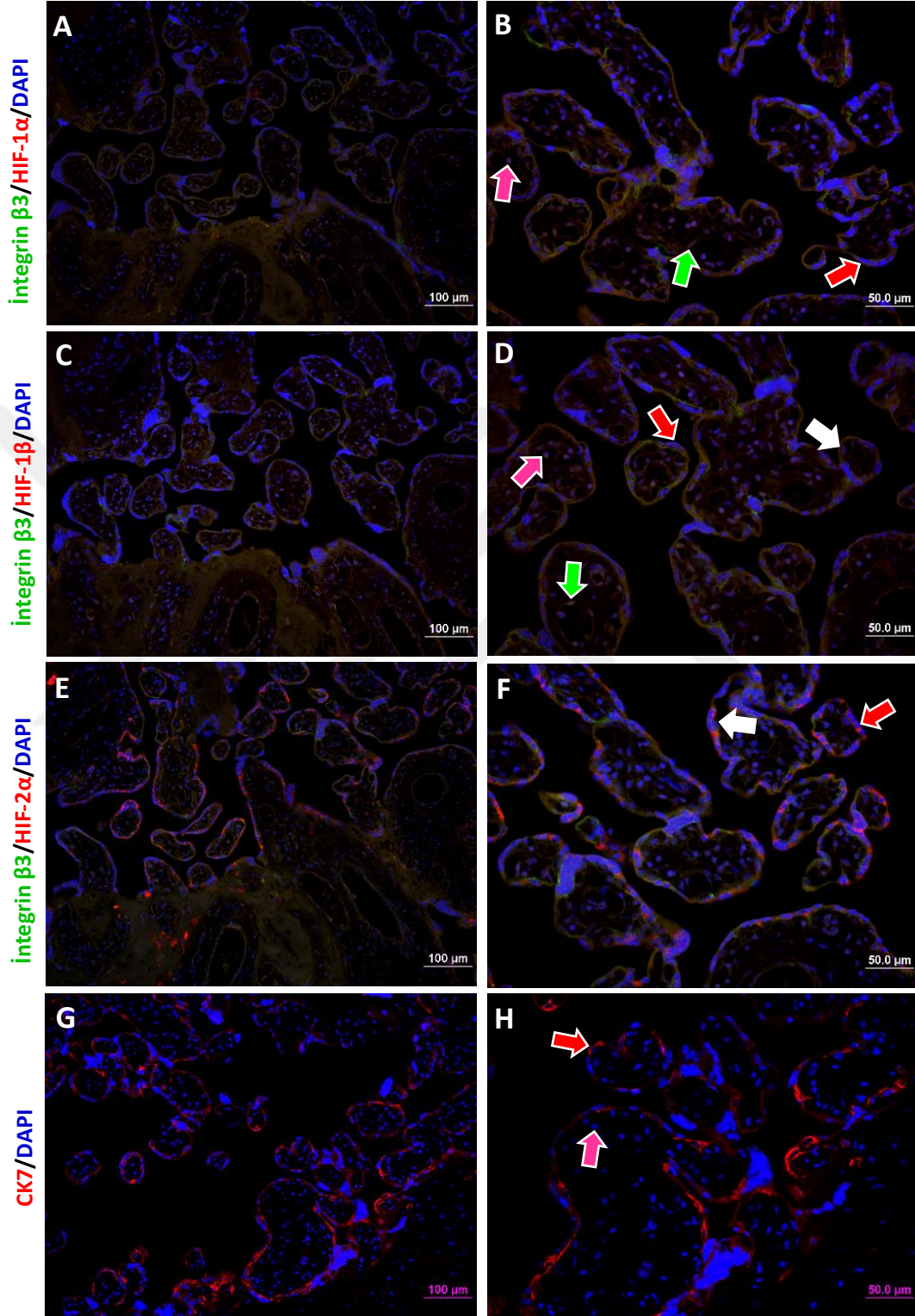
Şekil 4.18. Kontrol ve PE plasentaların koryonik plak kısmında $\beta 3$ integrin immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik. * işareti $p \leq 0,001$ göstermektedir.

Villuslardaki $\beta 3$ integrin ekspresyonu özellikle villöz sitotrofoblastlar ve sinsisyotrofoblast olmak üzere tüm hücrelerde tespit edildi (Şekiller 4.19. ve 4.20.).

Kontrol ve PE plasentaların villuslarında (Şekiller 4.19. ve 4.20.) kırmızı oklarla gösterilen sinsisyotrofoblastta $\beta 3$ integrin ve sırasıyla HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α birlikte ekspresyon gösterdi. Ayrıca Şekil 4.19F.'deki villöz stromal hücrede (pembe ok) de $\beta 3$ integrin ve HIF-2 α beraber eksprese oldu.

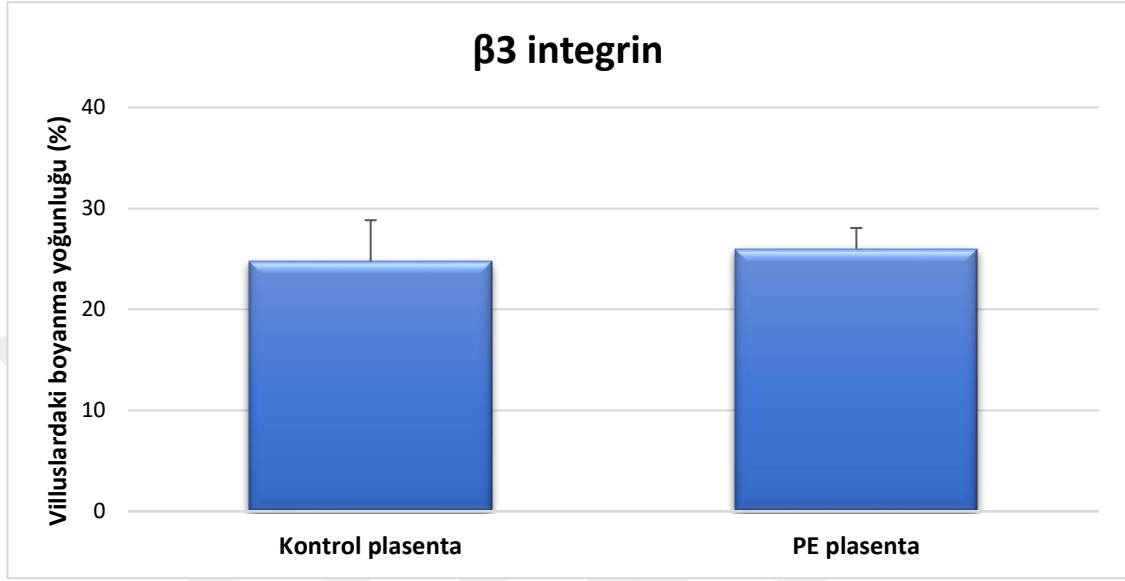


Şekil 4.19. Kontrol plasentaların villuslarında $\beta 3$ integrin ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: $\beta 3$ integrin ve HIF-1 α , C ve D: $\beta 3$ integrin ve HIF-1 β , E ve F: $\beta 3$ integrin ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). Villöz sitotrofoblastlar (beyaz oklar), sinsisyotrofoblast (kırmızı oklar), fetal endotel hücreleri (yeşil oklar), villöz stromal hücreler (pembe oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.



Şekil 4.20. PE plasentaların villuslarında $\beta 3$ integrin ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: $\beta 3$ integrin ve HIF-1 α , C ve D: $\beta 3$ integrin ve HIF-1 β , E ve F: $\beta 3$ integrin ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). Villöz sitotrofoblastlar (beyaz oklar), sinsisyotrofoblast (kırmızı oklar), fetal endotel hücreleri (yeşil oklar), villöz stromal hücreler (pembe oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.

Villuslardaki $\beta 3$ integrin immünoflorasan boyanma yoğunluğu kıyaslandığında, iki grup arasında anlamlı fark görülmedi ($p=0,160$) (Şekil 4.21.).

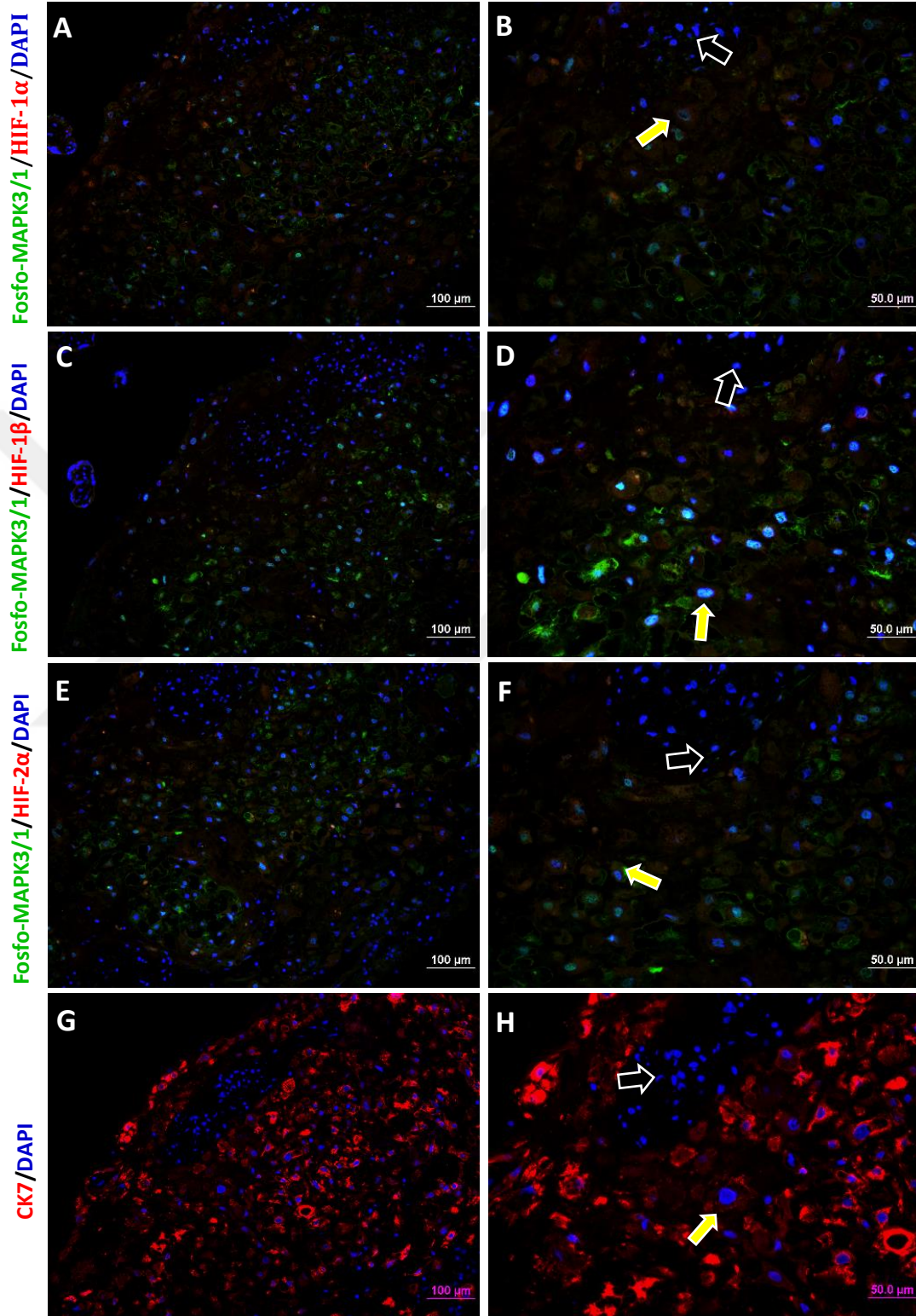


Şekil 4.21. Kontrol ve PE plasentaların villuslarında $\beta 3$ integrin immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik.

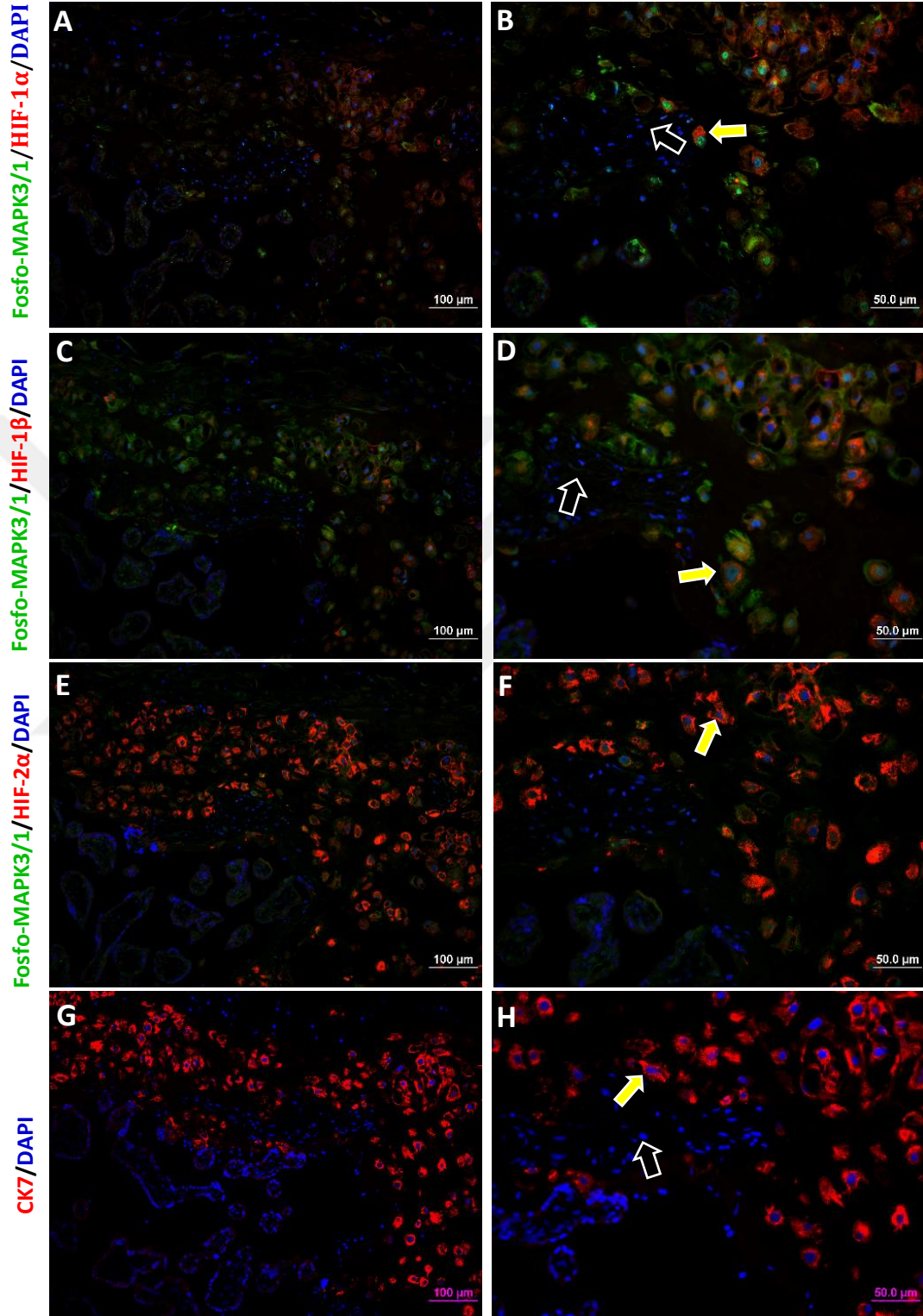
4.2.3. Fosfo-MAPK3/1 ve HIF Proteinlerinin (HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α) İkili İmmünoflorasan Boyanmaları

Plasentanın desidua bazalis kısmında fosfo-MAPK3/1 ekspresyonu EVT'lerde daha yoğun olmak üzere tüm desidual hücrelerde gözlemlendi. Fosfo-MAPK3/1 hem nüklear hem de sitoplazmik ekspresyon gösterdi (Şekiller 4.22 ve 4.23.).

Kontrol ve PE plasentaların desidualarında (Şekiller 4.22 ve 4.23.) sarı oklarla gösterilen EVT'lerde, fosfo-MAPK3/1 ve sırasıyla HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α beraber ekspresyonu vardı.

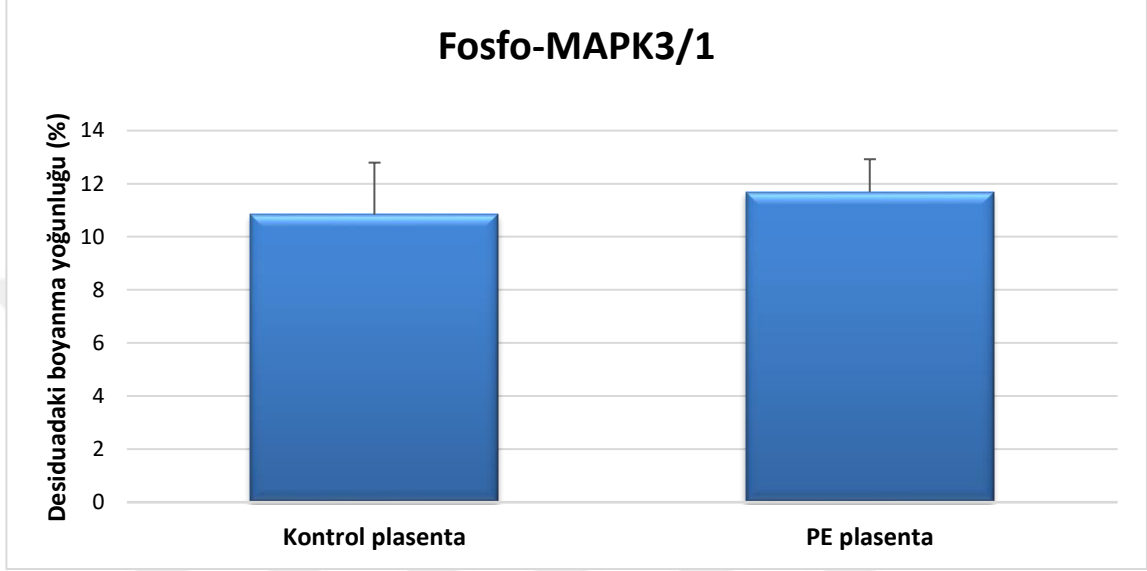


Şekil 4.22. Kontrol plasentaların desidualarında Fosfo-MAPK3/1 ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-1 α , C ve D: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-1 β , E ve F: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). EVT'ler (sarı oklar), desidual hücreler (siyah oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.



Şekil 4.23. PE plasentaların desidualarında Fosfo-MAPK3/1 ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasın boyanmaları. A ve B: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-1 α , C ve D: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-1 β , E ve F: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-2 α ikili immünoflorasın boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasın boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). EVT'ler (sarı oklar), desidual hücreler (siyah oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.

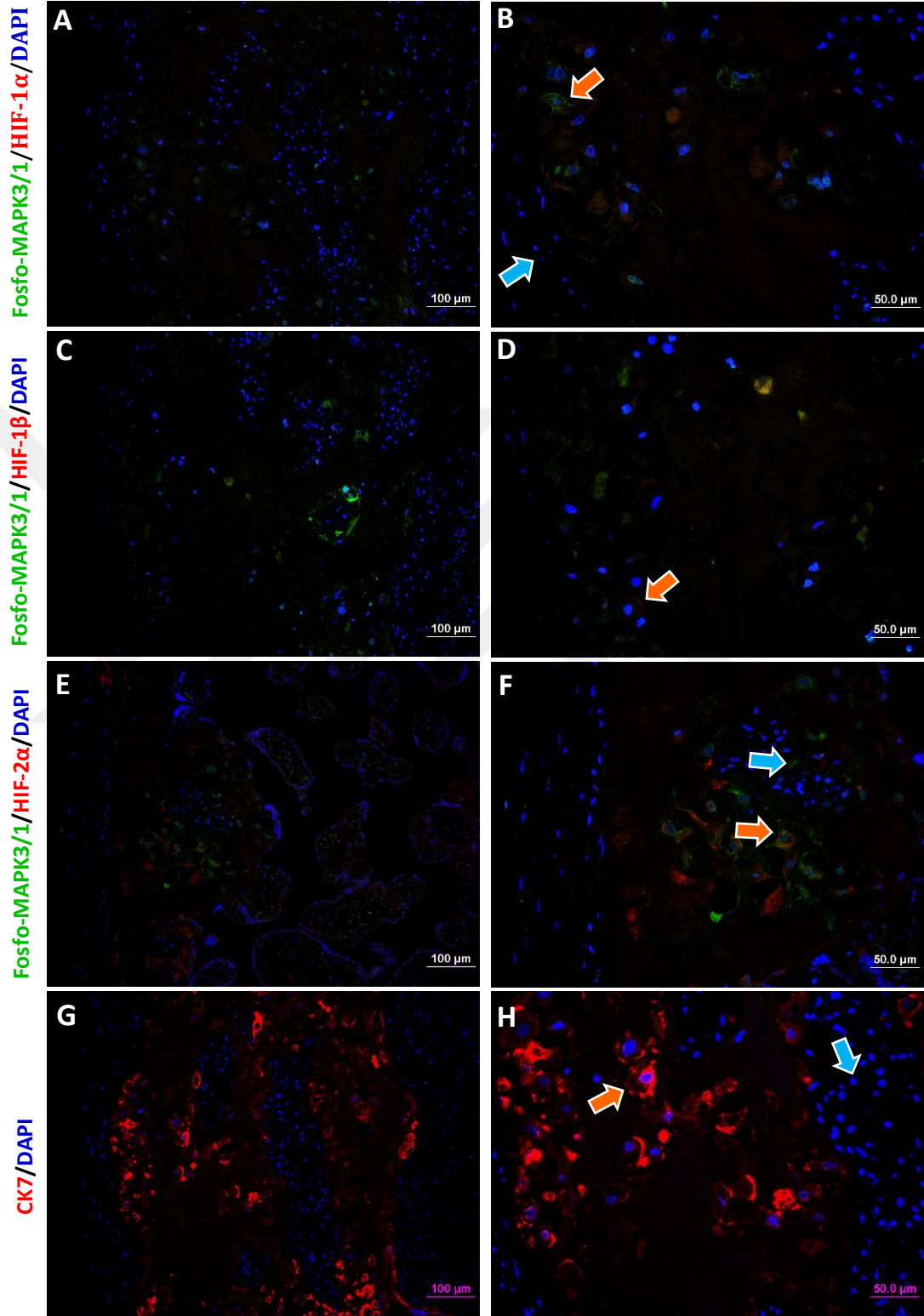
Kontrol ve PE plasentaların desidualarında fosfo-MAPK3/1 immünoflorasan boyanma yoğunluğu kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark olmadığı ($p=0,796$) bulundu (Şekil 4.24.).



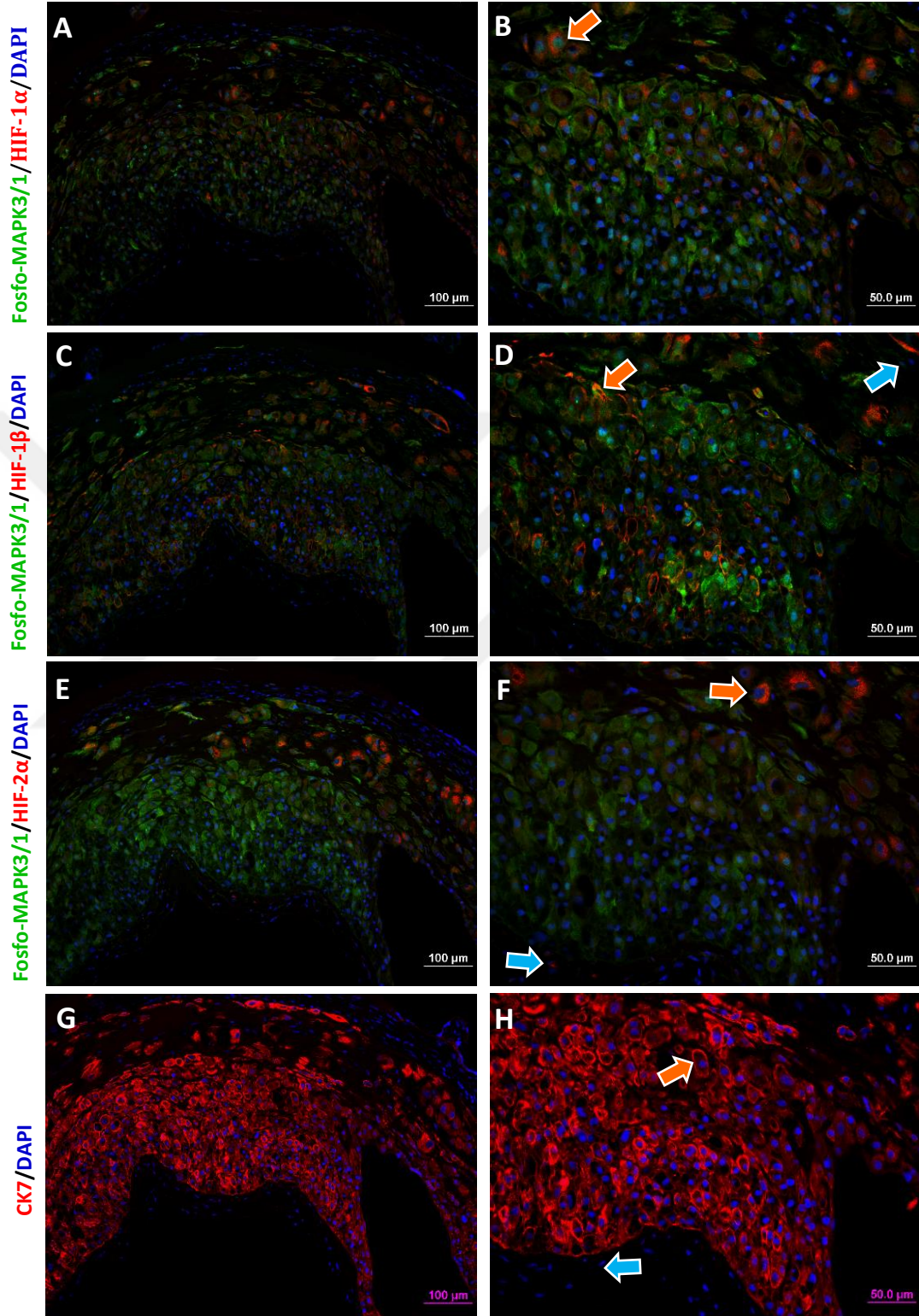
Şekil 4.24. Kontrol ve PE plasentaların desidualarında fosfo-MAPK3/1 immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik.

Fosfo-MAPK3/1'in koryondaki immünoflorasan boyanması, koryonik plak sitotrofoblastlarında daha fazla bulundu. Hem nüklear hem de sitoplazmik fosfo-MAPK3/1 ekspresyonu vardı (Şekiller 4.25. ve 4.26.).

Şekiller 4.25. ve 4.26.'da kontrol ve PE plasentaların koryonik plaklarındaki sitotrofoblastlarda (turuncu oklar), fosfo-MAPK3/1 ve sırasıyla HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α 'un birlikte ekspresyonu gözlemlendi.

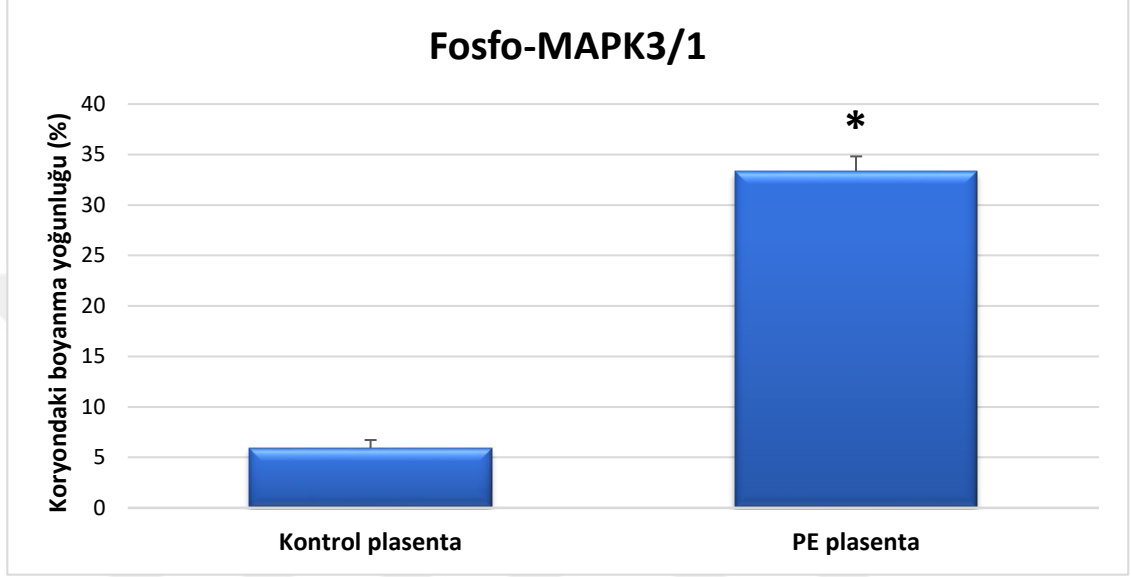


Şekil 4.25. Kontrol plasentaların koryonlarında fosfo-MAPK3/1 ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-1 α , C ve D: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-1 β , E ve F: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). Koryonik plaktaki sitotroblastlar (turuncu oklar), koryonik mezenşimal hücreler (mavi oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40



Şekil 4.26. PE plasentaların koryonlarında fosfo-MAPK3/1 ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-1 α , C ve D: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-1 β , E ve F: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). Koryonik plaktaki sitotrofoblastlar (turuncu oklar), koryonik mezenşimal hücreler (mavi oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.

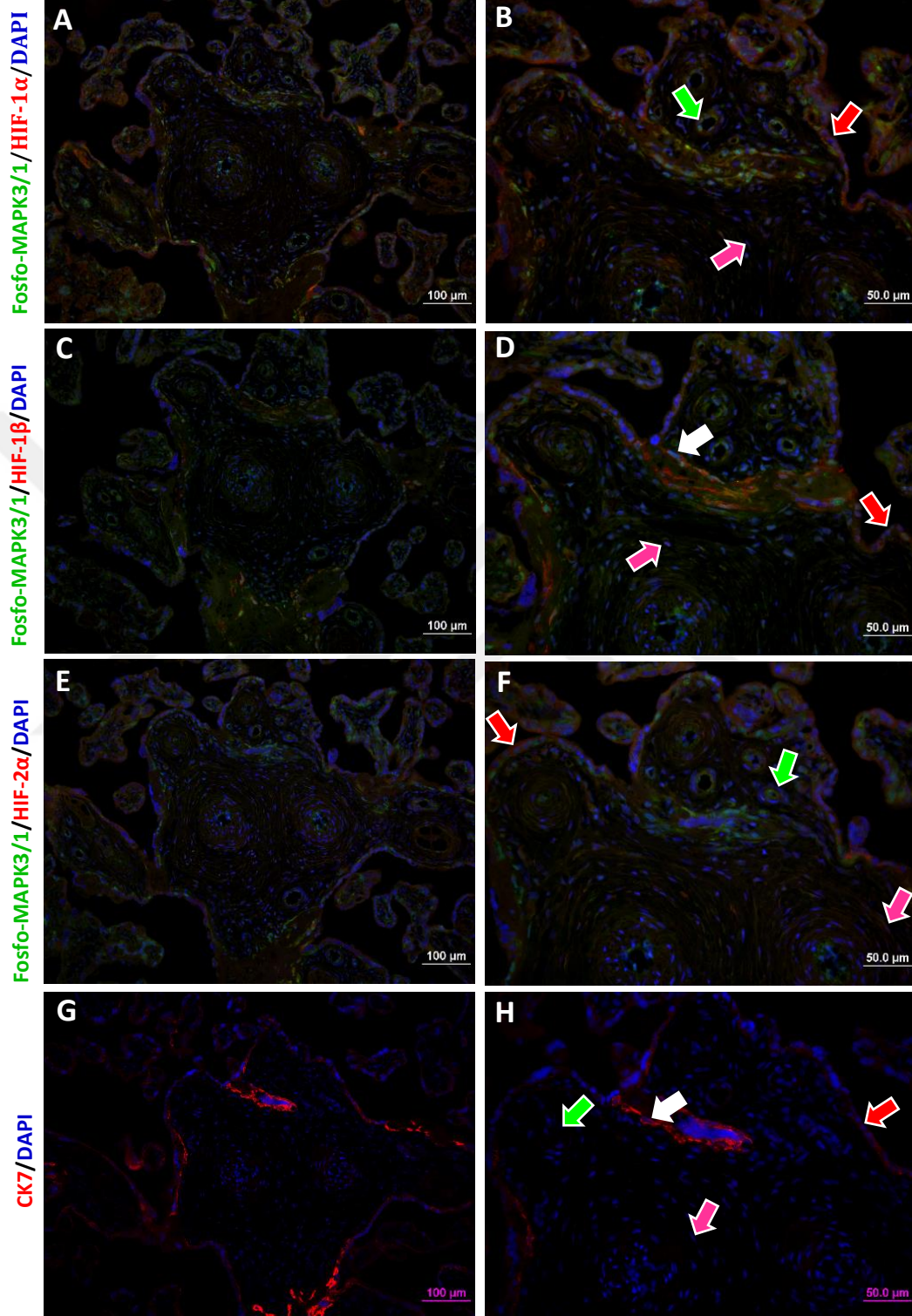
Kontrol ve PE plasentaların koryonlarındaki fosfo-MAPK3/1 immünoflorasan boyanma yoğunluğu kıyaslandığında, PE grubundaki ekspresyonun anlamlı şekilde arttığı ($p<0,001$) tespit edildi (Şekil 4.27.).



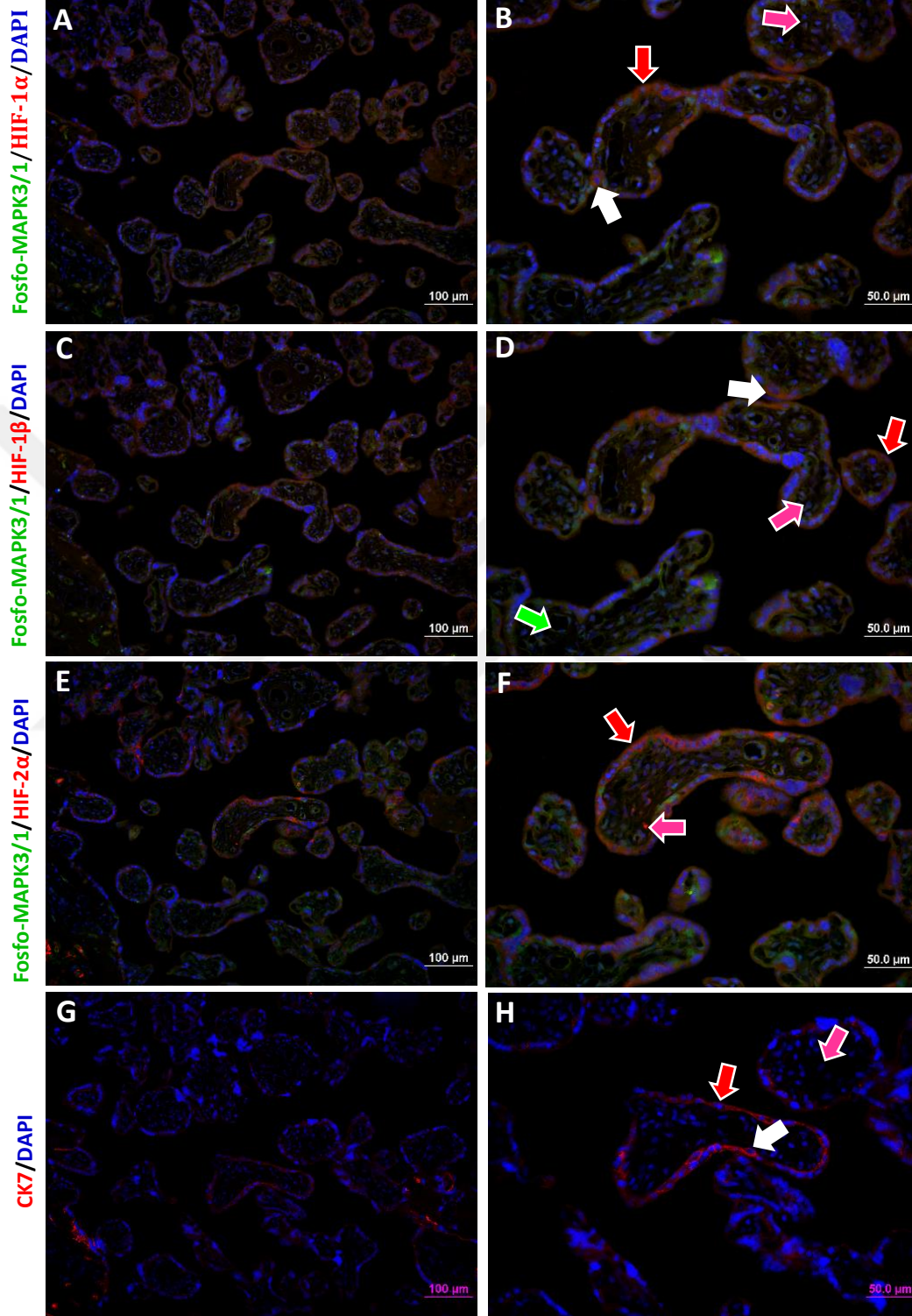
Şekil 4.27. Kontrol ve PE plasentaların koryonlarında fosfo-MAPK3/1 immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik. * işareti $p<0,001$ göstermektedir.

Villuslardaki fosfo-MAPK3/1 immünoflorasan boyanması tüm hücre tiplerinde vardı. Ancak özellikle villöz sitotroblastlar ve sinsisyotroblast tabakasında daha yoğun gözlendi (Şekil 4.28.).

Kontrol ve PE plasentalarda villöz sitotroblastlar (beyaz oklar) ve sinsisyotroblastta (kırmızı oklar), fosfo-MAPK3/1 ve sırasıyla HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α 'un birlikte ekspresyonu vardı (Şekil 4.28. ve 4.29.).

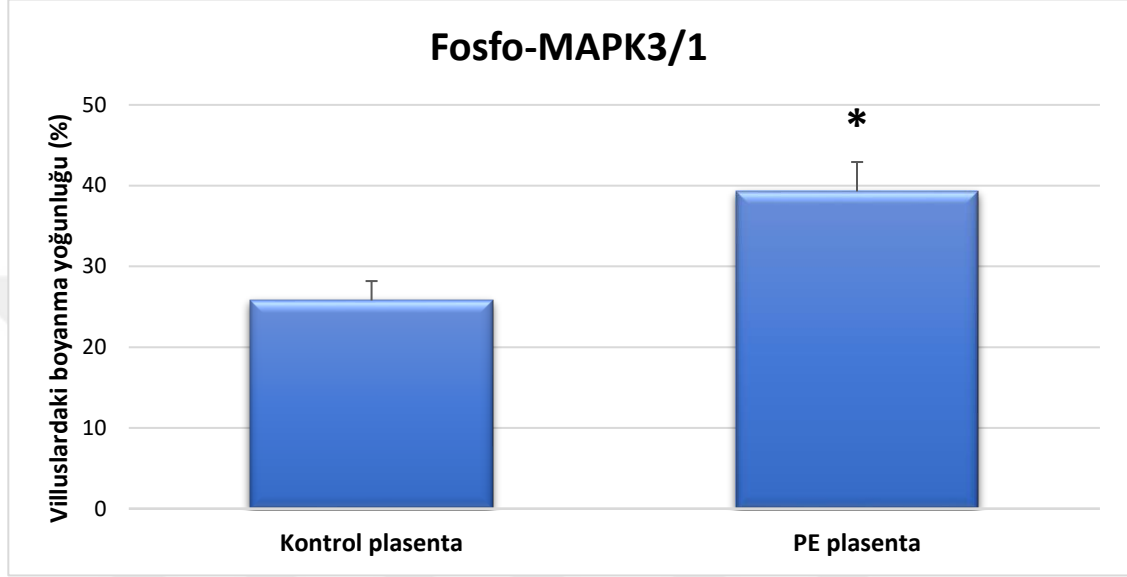


Şekil 4.28. Kontrol plasentaların villuslarında fosfo-MAPK3/1 ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-1 α , C ve D: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-1 β , E ve F: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). Villöz sitotrofolblastlar (beyaz oklar), sinsisyotrofolblast (kırmızı oklar), fetal endotel hücreleri (yeşil oklar), villöz stromal hücreler (pembe oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.



Şekil 4.29. PE plasentaların villuslarında fosfo-MAPK3/1 ve HIF proteinlerinin çiftli immünoflorasan boyanmaları. A ve B: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-1 α , C ve D: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-1 β , E ve F: Fosfo-MAPK3/1 ve HIF-2 α ikili immünoflorasan boyanmaları, G ve H: CK7 immünoflorasan boyanması. Nükleuslar: DAPI (mavi). Villöz sitotroblastlar (beyaz oklar), sinsisyotroblast (kırmızı oklar), fetal endotel hücreleri (yeşil oklar), villöz stromal hücreler (pembe oklar). A, C, E ve G: X20; B, D, F ve H: X40.

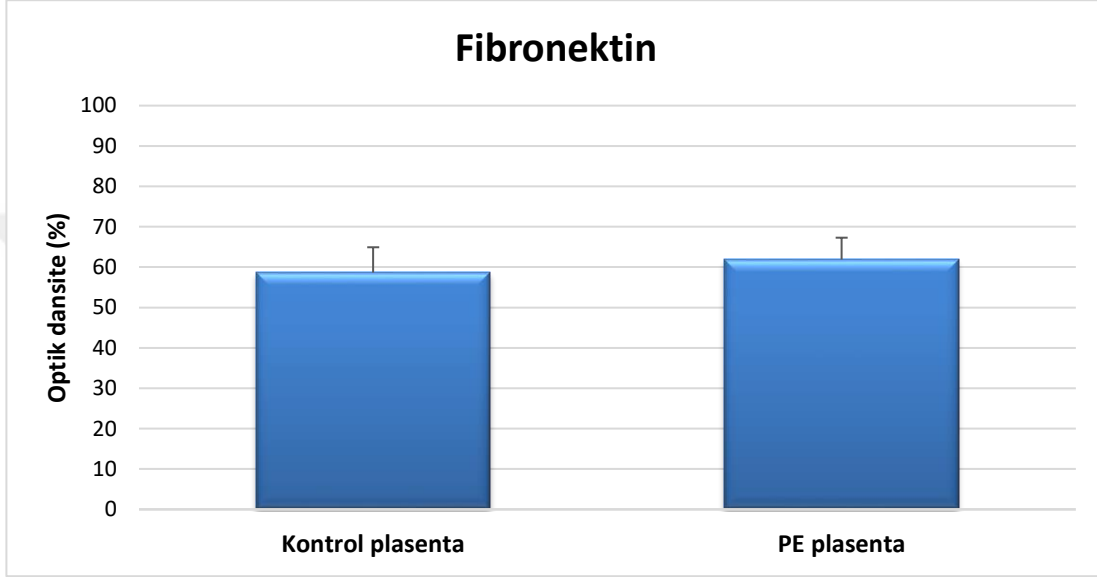
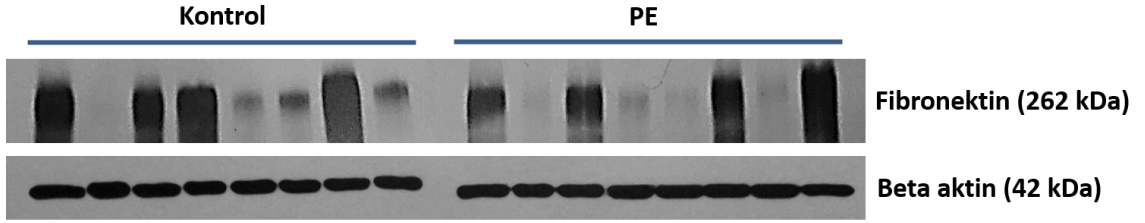
Villuslardaki fosfo-MAPK3/1 immünoflorasan boyanma yoğunluğu kıyaslandığında, koryondakine benzer şekilde PE grubundaki ekspresyonun anlamlı şekilde arttığı ($p < 0,001$) tespit edildi (Şekil 4.30.).



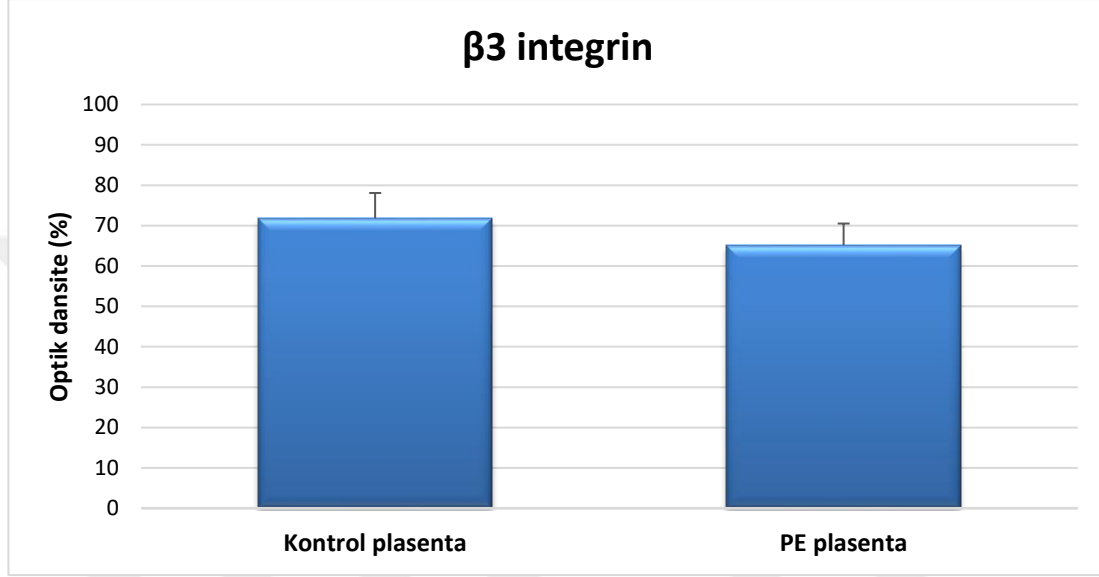
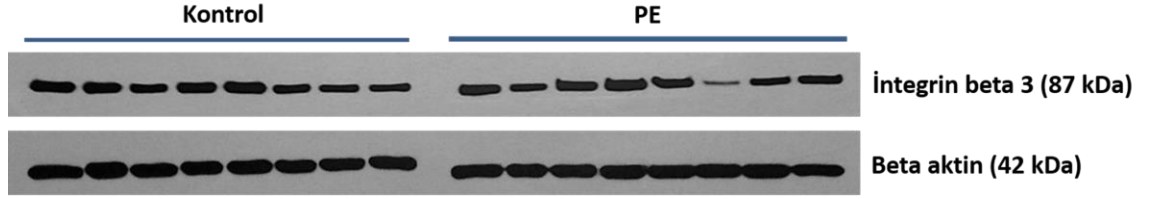
Şekil 4.30. Kontrol ve PE plasentaların villuslarında fosfo-MAPK3/1 immünoflorasan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik. * işareti $p < 0,001$ göstermektedir.

4.3. Western Blot Analizi Bulguları

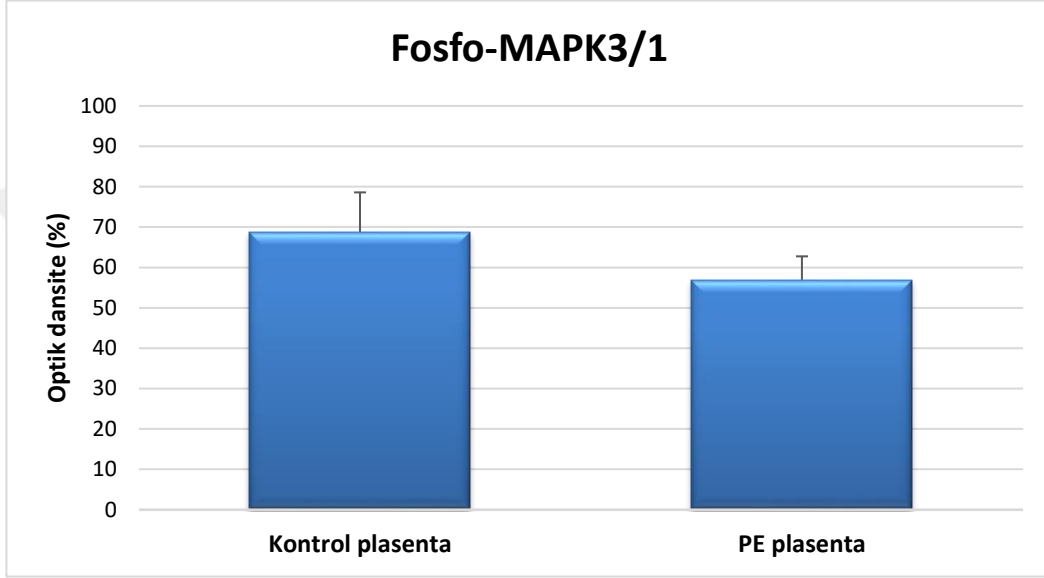
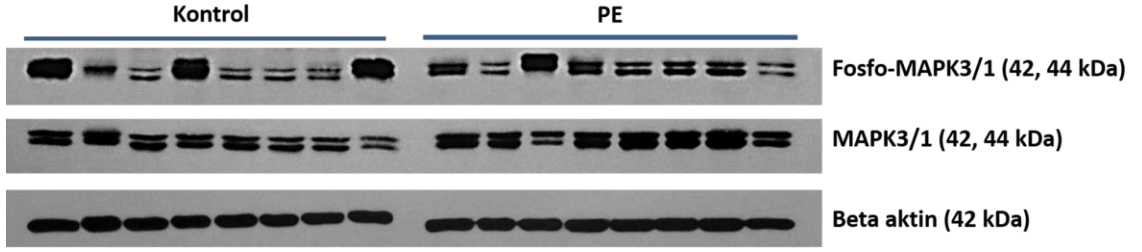
Kontrol ve PE plasentaların Western Blot analizi sonuçlarına göre fibronectin ve $\beta 3$ integrin ekspresyonları gruplar arasında benzer bir ekspresyon düzeyi göstermiştir (Şekiller 4.31. ve 4.32.). MAPK3/1 fosforilasyonu açısından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.33.). Bununla birlikte PE plasentalarda HIF (HIF-1 α , HIF-1 β ve HIF-2 α) protein ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı bir şekilde arttığı (Şekil 4.34., $p < 0,05$) tespit edilmiştir.



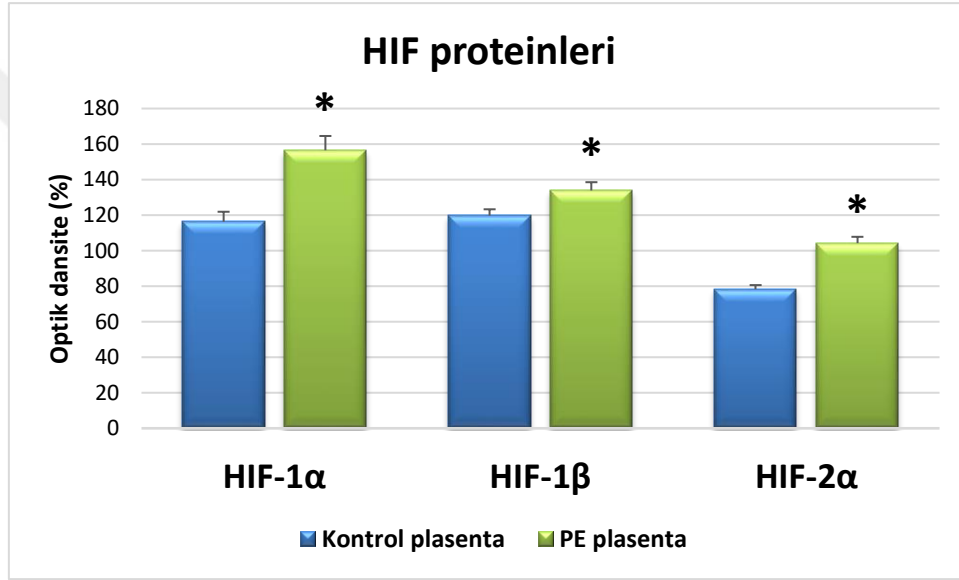
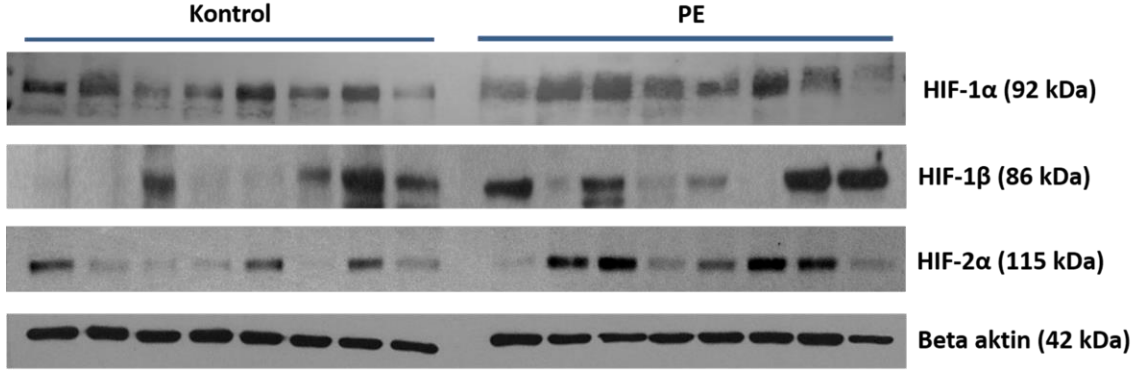
Şekil 4.31. Kontrol ve PE plasentalarda fibronektin proteini Western Blot analizi sonucu. Fibronektin ekspresyon düzeyi gruplar arasında benzerdir ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,576$).



Şekil 4.32. Kontrol ve PE plasentalarda β3 integrin proteini Western Blot analizi sonucu. Gruplar arasında β3 integrin ekspresyon düzeyi birbirine yakındır ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (p=0,287).



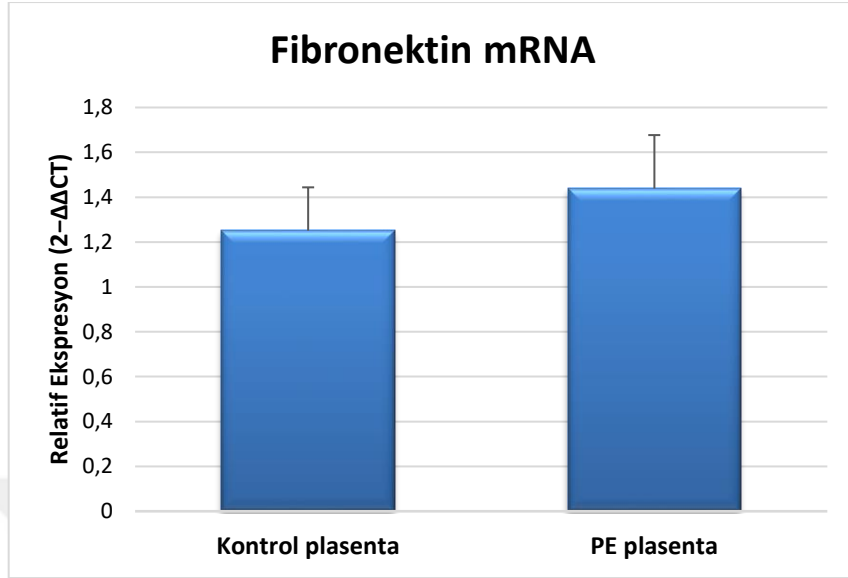
Şekil 4.33. Kontrol ve PE plasentalarda fosfo-MAPK3/1 ve MAPK3/1 proteinlerinin Western Blot analizi sonuçları. Grupların MAPK3/1 fosforilasyonlarında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,895$).



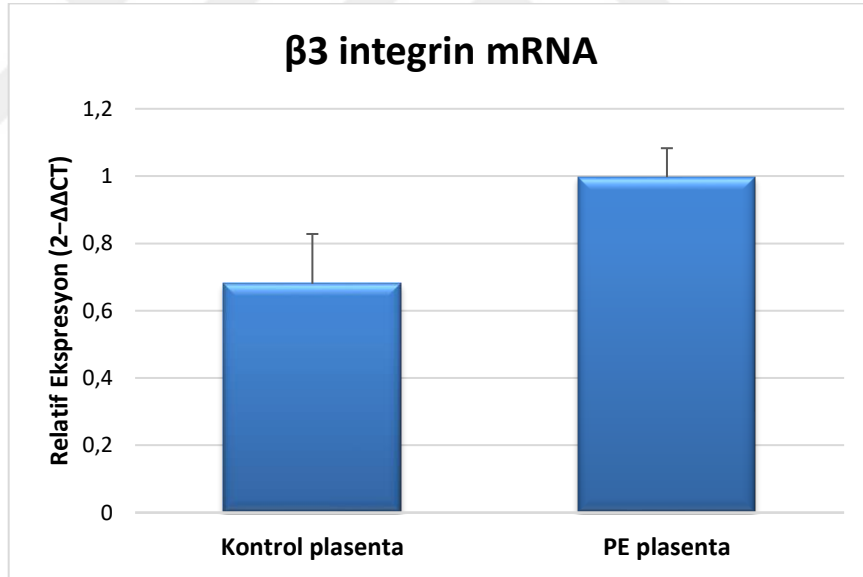
Şekil 4.34. Kontrol ve PE plasentalarda HIF proteinlerinin Western Blot analizi sonuçları. PE plasentalarda grubunda HIF proteinlerinin ekspresyonlarında anlamlı bir artış ($p \leq 0,05$) olduğu görülmektedir.

4.4. qRT-PCR Analizi Bulguları

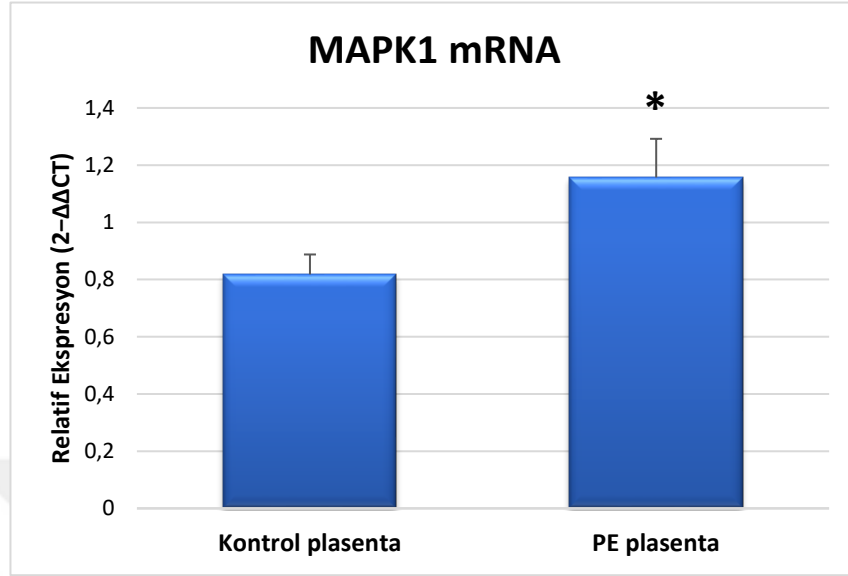
qRT-PCR analizi sonuçlarına göre kontrol ve PE plasentaların fibronektin ve $\beta 3$ integrin mRNA seviyeleri gruplar arasında anlamlı şekilde bir fark mevcut değildir (Şekiller 4.35. ve 4.36.). MAPK3 mRNA seviyesi açısından da gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p=0,376$) (Şekil 4.37.). Bunun yanı sıra PE plasentaların MAPK1 mRNA'larında anlamlı bir artış olduğu gözlenmektedir ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.38.). Ayrıca PE plasentalarda HIF (HIF-1 α , HIF-1 β ve HIF-2 α) mRNA seviyelerinin kontrole göre anlamlı bir şekilde arttığı (Şekil 4.39., $p \leq 0,05$) bulunmuştur.



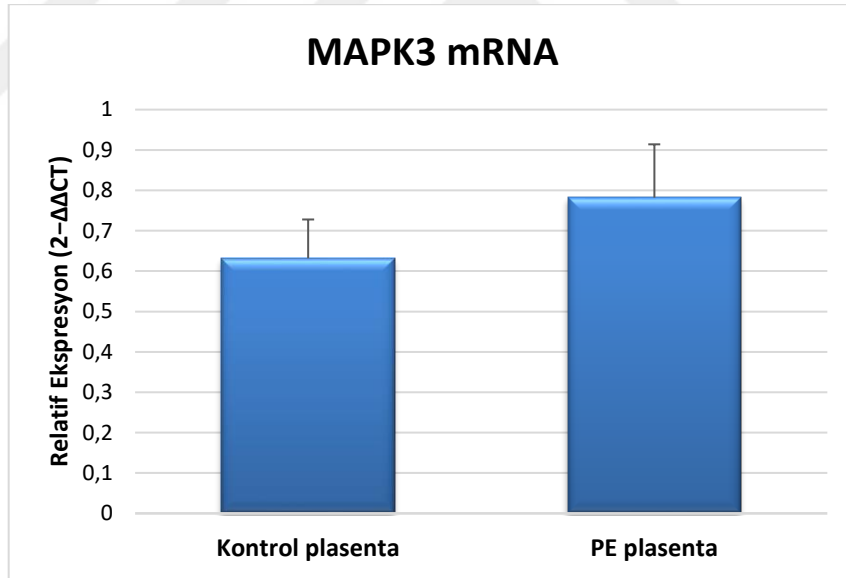
Şekil 4.35. Kontrol ve PE plasentaların fibronektin qRT-PCR analizi sonuçları. Grupların mRNA düzeyleri arasında anlamlı bir fark yoktur ($p=0,548$).



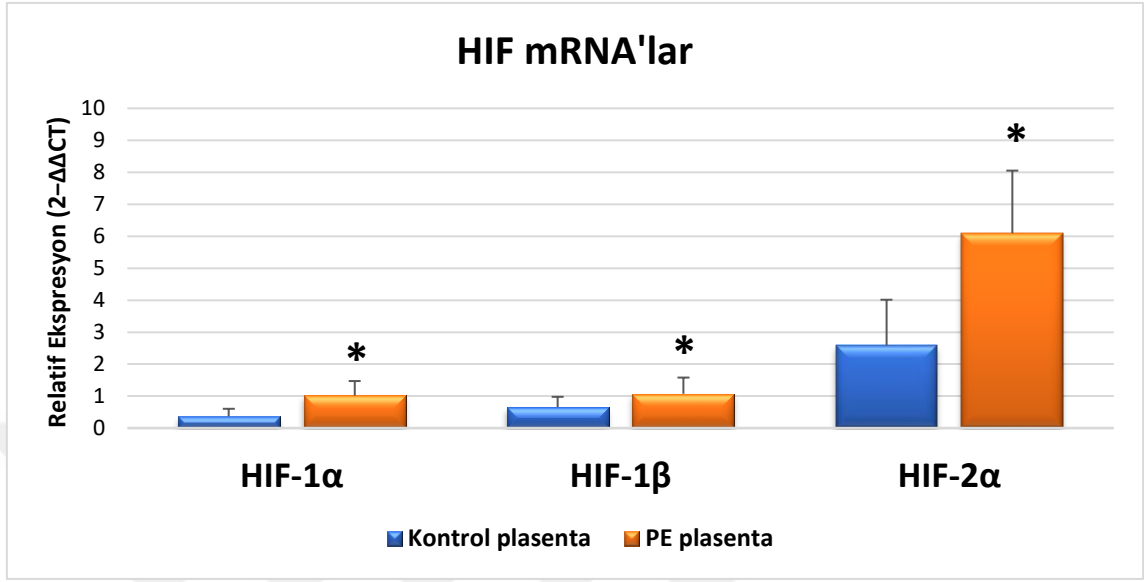
Şekil 4.36. Kontrol ve PE plasentaların $\beta 3$ integrin qRT-PCR analizi sonuçları. Grupların $\beta 3$ integrin mRNA düzeyleri arasında anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir ($p=0,089$).



Şekil 4.37. Kontrol ve PE plasentaların MAPK1 qRT-PCR analizi sonuçları. PE plasentaların MAPK1 mRNA'larında anlamlı bir artış olduğu gözlenmektedir ($p \leq 0,001$).



Şekil 4.38. Kontrol ve PE plasentaların MAPK3 qRT-PCR analizi sonuçları. Grupların MAPK3 mRNA seviyelerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,376$).



Şekil 4.39. Kontrol ve PE plasentaların HIF (HIF-1 α , HIF-1 β ve HIF-2 α) qRT-PCR analizi sonuçları. PE plasentalarda HIF mRNA seviyelerinde anlamlı bir artış ($p \leq 0,001$) olduğu görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Plasenta oluşumu, uterus ve maternal damarların trofoblastlarca istila edildiği benzersiz bir süreçtir. Trofoblastların maternal dokularla etkileşimlerinin nasıl olduğu, gebelik sonucunu hayati olarak belirler (Cartwright ve ark., 2010).

PE, önemli derecede morbidite ve mortaliteye neden olan karmaşık bir gebelik hastalığıdır (Sibai ve ark., 1997). Tüm gebeliklerin yaklaşık %5'inde gözlenen PE, plasenta kökenlidir (Chesley ve Cooper, 1986; Piering ve ark., 1993). PE'nin ESM yeniden modellenmesi, O₂ taşınımı, HIF fonksiyonundaki bozukluklar ve yetersiz trofoblast invazyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Estelles ve ark., 1989; Estelles ve ark., 1994; Genbacev ve ark., 1996; Graham ve McCrae, 1996; Genbacev ve ark., 1997; Caniggia, Winter, ve ark., 2000; Narumiya ve ark., 2001; Merchant ve Davidge, 2004; Myers ve ark., 2005; Redman ve Sargent, 2005; Rolfo ve ark., 2010).

Choi ve arkadaşlarının çalışması, ESM aracılığıyla $\beta 3$ integrin tarafından aktive olan fare TKH'lerin, MAPK sinyal yolağı ile etkileşiminin HIF'i aktive ettiğini göstermektedir (Choi ve ark., 2013). Çalışmamızda, Choi ve arkadaşlarının fare TKH kültürü kullanılarak elde ettikleri bu plasental yolağın, insan kontrol ve PE plasentalarında sınanması gerçekleştirildi.

Choi ve arkadaşlarının çalışmasında fare TKH'lerini kültüre ederken kullandıkları CELLstart'ta en bol bulunan ESM proteininin fibronektin olduğu tespit edilmiştir (Hughes ve ark., 2011). Bu yüzden, çalışmamızda ESM proteini olarak fibronektini kullandık. İnsan term plasentasının ESM içeriği incelenen bir çalışmada kollajenler I ve IV, fibronektin, fibrillin I ve laminin yoğun olmak üzere, sınırlı düzeyde de trombospondin I, tenascin C ve elastin içeriği bulunmuştur (C. P. Chen ve Aplin, 2003). 2001 yılında yapılan bir çalışmada insan plasentasındaki fibronektin, vimentin, laminin ve tip IV kollajen ekspresyonları gelişimin evrelerinde incelenmiştir. Bu çalışmada fibronektin ve lamininin plasental gelişimin tüm evrelerinde villus ekspresyonları bulunmuştur. Vimentin ve tip IV kollajen ise ilk ve ikinci trimesterde gözlenmezken sadece term villuslarında görülmüştür. Bu verilere göre, fibronektin ve

laminin villus yapısının temel proteinlerindedir (Papadopoulos ve ark., 2001). Çalışmamızda da paralel şekilde term plasentalarda yoğun fibronektin ekspresyonu gözlemlendi.

İlk trimester ve term insan plasentasıyla yapılan bir çalışmada, ilk trimesterde fibronektin trofoblastların bazal membranı, villöz stroma ve fetal damarlarda lokalize iken termde ise trofoblastlarda bulunmayıp sadece villöz stroma ve fetal damarlarda bulunmuştur (Yamada ve ark., 1987). Başka bir çalışmada ise ilk trimester insan plasentasının villus stroması, demirleyici hücre kolonlarının distal kısımları ve bazı EVT'lerde fibronektin ekspresyonu gözlenirken villöz trofoblastlarda bulunmamıştır (Earl ve ark., 1990). 2016 yılındaki bir çalışmada da benzer şekilde ilk trimester insan plasentasının villus stroması, fetal damarlar, EVT hücre kolonları ve fibrinoidlerde gözlenirken villöz sitotrofoblastlarda yoktur (Earl ve ark., 1990; Tossetta ve ark., 2016). Çalışmamızda ise term plasenta villuslarında fibronektin ekspresyonu villöz stromal hücrelerde yoğun şekilde olmak üzere trofoblastların bazal membranı da dahil tüm villus hücre tiplerinde gözlemlendi. Ayrıca önceki çalışmalara paralel şekilde desidual bölgede de EVT'ler ve fibrinoid birikimlerde bulundu.

Desidual alanlardaki fibrinoid birikimleri, invazif EVT'lerin salgı ürünleridir. Bu birikimlerin başlıca laminin, kolajen IV, heparan sülfat, fibronektin ve vitronektinden oluştuğu gösterilmiştir. Fibrinoid birikimlerin EVT hücre yüzeylerindeki integrinlerle etkileşime geçerek trofoblast invazyonunu düzenledikleri düşünülmektedir (Kaufmann ve ark., 1996). Çalışmamızda kontrol plasentaların desidual alanlarında fibronektinle fazla şekilde boyanan yoğun fibrinoid birikimi gözlemlendi. PE plasentaların desidualarında fibronektin boyanma şiddeti anlamlı olmasa da azaldı. Bu veriler PE plasentalardaki azalmış EVT invazyonunu açıklayabilir.

İlk trimester ve term plasental fibroblastların hipoksik ortamda kültüründe ürettikleri ESM proteinleri incelendiğinde, fibronektin ve kollajen IV'ün ekspresyonunun hipoksiyle arttığı ancak laminin, elastin, kollajen I, fibrillin I ve trombospondin I ekspresyonlarının değişmediği bulunmuştur (C. P. Chen ve Aplin, 2003). BeWo hücreleriyle yapılan başka bir çalışmada da hipoksik koşullarda fibronektin ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Iwaki ve ark., 2004). Benzer şekilde, insan term

plasentasından izole edilen plasental mezenşimal kök hücrelerde (MKH'ler) normoksik ve hipoksik (%2–2.5 O₂) ortamlarda kültüre edildiğinde hipoksik ortamda fibronektin ekspresyonunda artış bulunmuştur (Mathew ve ark., 2017). 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre PE term plasentalarda normale göre fibronektin ekspresyonu artmıştır (Gutierrez ve ark., 2017). Ancak başka bir çalışmada ise PE plasentaların fibronektin ekspresyonunun normale göre değişmediği bulunmuştur (Y. Zhou ve ark., 1993). Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya benzer şekilde immünoflorasan, Western blot ve PCR analizi sonuçlarımıza göre PE plasentaların fibronektin ekspresyonları normale göre değişmedi.

Çalışmamızda ESM indüklü MAPK-HIF yolağının indüklenmesi hipotezini incelerken adezyon molekülü olarak $\beta 3$ integrini kullandık. Fare trofoblastlarının fibronektin üzerine adezyon ve migrasyonunu $\alpha v\beta 3$ integrin ve $\alpha IIb\beta 3$ integrinin düzenlediği gösterilmiştir (Rout ve ark., 2004). $\alpha v\beta 3$ integrinin fare plasental gelişimi için elzem olduğu ve yokluğunun ölüme neden olduğu knockout çalışmalarıyla gösterilmiştir (Bader ve ark., 1998; Hodivala-Dilke ve ark., 1999). İnsan plasentasında EVT'lerin desiduayı invazyonu sırasında yüzeylerindeki integrin ekspresyonu değişime uğrayarak $\alpha v\beta 3$ integrin ekspresyonunda artış gerçekleştiği bulunmuştur (Damsky ve ark., 1992; Y. Zhou, Fisher, ve ark., 1997). $\alpha v\beta 3$ integrinin insan sitotrofoblast migrasyon ve invazyonunda önemli rol oynadığı in vitroda gösterilmiştir (Y. Zhou, Fisher, ve ark., 1997; Kabir-Salmani ve ark., 2003).

2009 yılındaki bir çalışmaya göre, insan plasentasında $\alpha v\beta 3$ integrin ekspresyonunun özellikle trofoblastların yüzeyinde lokalize olduğu gösterilmiştir (Xia ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda da aynı şekilde villuslardaki $\beta 3$ integrin ekspresyonu villöz sitotrofoblastlar ve sinsisyotrofoblastta belirgin şekilde gözlemlendi.

HIF içermeyen fare TKH'lerin $\alpha v\beta 3$ integrin ekspresyonunun azaldığı ve bununla bağlantılı olarak adezyon ve invazyon yeteneklerinin azaldığı bulunmuştur (Cowden Dahl, Robertson, ve ark., 2005). İnsan term plasentasından izole edilen plasental MKH'lerde de hipoksik ortamda $\beta 3$ integrin ekspresyonunda artış bulunmuştur (Mathew ve ark., 2017).

PE'de endovasküler EVT'lerin farklılaşmada başarısızlığa uğrayarak $\alpha\beta3$ integrin ekspresyonunu hücre yüzeylerinde upregüle edemedikleri gösterilmiştir (Y. Zhou, Damsky, ve ark., 1997). Son yıllarda yapılan bir çalışmada da $\beta3$ integrin ekspresyonunun PE plasentalarda kontrole göre azaldığı gösterilmiştir (C. P. Chen ve ark., 2018). Başka bir çalışmada ise PE villusların $\beta3$ integrin ekspresyonunun kontrole göre farklı olmadığı bulunmuştur (Xia ve ark., 2009). Çalışmamızın immünoflorasan sonuçlarına göre PE koryonlarında $\beta3$ integrin ekspresyonu kontrole göre artarken diğer plasental bölgelerde (villuslar ve desidua) ekspresyon değişmedi. Western blot ve PCR sonuçlarımıza göre de PE ve kontrol plasentalar arasında $\beta3$ integrin ekspresyonu anlamlı olarak değişmedi.

HIF-1 α (Caniggia ve Winter, 2002; Rajakumar ve ark., 2004; Sezer ve ark., 2013; Iriyama ve ark., 2015; Korkes ve ark., 2017; Ali ve ark., 2018) ve HIF-2 α (Rajakumar ve ark., 2001; W. Liu ve ark., 2014) ekspresyonlarının PE plasentalarda normale göre yüksek olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. PE gebelerin maternal plazmasındaki HIF-1 α ekspresyonunun da normal gebelerinkinden fazla olduğu bulunmuştur (Ashur-Fabian ve ark., 2012; Akhilesh ve ark., 2013; Rath ve ark., 2016). Yüksek rakımlarda (hipoksik ortam) yaşayan kadınlarda PE görülme riski 3-4 kat artmaktadır (Zamudio, 2007) ve bu kadınların plasentalarının HIF-1 α ekspresyonu normalden fazladır (Zamudio ve ark., 2007). Trofoblastların invazif yeteneklerini azaltan ve HIF-1 α alt yolağında bulunan TGF- $\beta3$ 'ün ekspresyonunun PE plasentalarda arttığı bulunmuştur (Caniggia ve Winter, 2002). HIF-1 α proteini aşırı ekspresyon gösteren gebe farelerde PE belirtileri (artmış kan basıncı ve proteinüri) gözlenmiştir (Tal ve ark., 2010). Yukarıdaki çalışmalara paralel olarak, çalışmamızda PE plasentaların HIF (HIF-1 α , HIF-1 β ve HIF-2 α) ekspresyonlarının hem mRNA hem de protein düzeyinde kontrolden fazla olduğunu tespit ettik.

2000 yılında yapılan bir çalışmada, HIF-1 α ve HIF-2 α immunoreaktivitelerinin villuslardaki tüm hücre tiplerinde (sinsisyotrofoblast, villöz sitotrofoblastlar, fetoplasental damarlar, villöz stromal hücreler) hem nükleer hem de sitoplazmik şekilde olduğu gösterilmiştir (Rajakumar ve Conrad, 2000). 2014 yılındaki başka bir çalışmada da özellikle sinsisyotrofoblast ve villöz sitotrofoblastlar olmak üzere villuslardaki hücre

tiplerinde HIF-1 α ve HIF-2 α ekspresyonları tespit edilmiştir (W. Liu ve ark., 2014). Çalışmamızın plasental HIF-1 α ve HIF-2 α immünoflorasan boyanmalarında da aynı sonucu bulduk.

HIF α proteinlerinin hipoksiyle düzenlenmenin yanında, normoksik koşullarda da reaktif oksijen türleri (Haddad ve Land, 2001), Anjiyotensin-II (Richard ve ark., 2000), TGF- β 1 (McMahon ve ark., 2006) gibi çeşitli uyaranlarca da aktive olabildikleri gösterilmiştir. Bu uyaranlar hücrede sinyal iletimi için çeşitli protein kinazlar kullanmaktadır (Dimova ve ark., 2009). Protein kinaz ailesinden MAP2K1 ve alt yolağında yer alan MAPK3/1'in farelerde plasentasyonun önemli düzenleyicileri olduğu bulunmuştur (Giroux ve ark., 1999; Hatano ve ark., 2003; Saba-El-Leil ve ark., 2003; Bissonauth ve ark., 2006). Hipoksiyle aktive olabildiği gösterilen MAPK yolağından (Muller ve ark., 1997; Conrad ve ark., 1999; Minet ve ark., 2000; Fujita ve ark., 2010) MAPK3/1 proteininin HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın direkt fosforilasyonunu gerçekleştirdiği in vitro ve in vivo da birçok çalışmada gösterilmiştir (Conrad ve ark., 1999; Minet ve ark., 2000; Sang ve ark., 2003; Mylonis ve ark., 2008). 2010 yılındaki bir çalışmada da insan trofoblast modeli olarak kullanılan BeWo hücreleri hipoksik ortamda (%1 oksijen) kültüre edildiğinde MAPK3/1 fosforilasyonunun arttığı gösterilmiştir. Ayrıca aynı hücrelerde MAPK3/1-HIF-1 α sinyal yolağının hipoksik ortamda VEGF ve endoglin ekspresyonlarını artırdığı bulunmuştur (Fujita ve ark., 2010). Bu çalışmaya paralel şekilde başka bir çalışmada ise izole edilen insan trofoblast hücreleri hipoksik ortamda kültüre edildiğinde MAPK3/1 fosforilasyonunda artış olduğu gözlenmiştir (Park ve ark., 2011). 2016 yılındaki bir çalışmada da aşırı HIF-2 α ekspresyonu gösteren insan plasental MKH'lerde MAPK yolağı proteinlerinin ekspresyonlarının normale göre arttığı bulunmuştur. İnsan plasental MKH'lere MAPK yolağı inhibitörü PD0325901 uygulandığında da HIF-2 α ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Zhu ve ark., 2016). Bu çalışmalara tezat olarak, 2019 yılında yapılan bir çalışmada fosfo-MAPK1 ekspresyonunun PE plasentalarda normal gebelere göre azaldığı tespit edilmiştir (Y. Wang ve ark., 2019). Yine benzer şekilde MAPK3/1 fosforilasyonunun da normal gebelere göre PE plasentalarda düştüğü bulunmuştur (Alese ve ark., 2019). Çalışmamızda ise PE plasentaların desidualarındaki fosfo-MAPK3/1 immünoflorasan boyanması gruplar arasında değişmemişken koryon ve villuslarındaki boyanma PE'de artmıştır. Western

Blot analizi sonuçlarımıza göre grupların MAPK3/1 fosforilasyonlarında anlamlı bir fark olmamıştır ancak PCR sonuçlarına göre PE plasentaların MAPK3 mRNA seviyeleri kontrole göre değişmemişken MAPK1 mRNA'larında anlamlı bir artış bulunmuştur. PE plasentaların MAPK1 ekspresyonunun mRNA düzeyinde kontrole göre daha fazla olmasına rağmen protein düzeyinde bu ekspresyon artışı gözlenmemesi post transkripsiyonel modifikasyonlarla açıklanabilir.

İnsan plasentasında MAPK3/1'in proteininin ekspresyonu ve lokalizasyonu hakkındaki bilgi sınırlıdır. 2013 yılında yapılan bir çalışmada total MAPK3/1'in insan plasentasının villöz sitotrofoblastlarında bulunup sinsisyotrofoblastta immünolokale olmadiğı gösterilmiştir. Fosfo-MAPK3/1'in ise sadece ilk trimesterde villöz sitotrofoblastlarda ekspresyonu bulunmuştur (Kita ve ark., 2003). Çalışmamızda ise villuslardaki fosfo-MAPK3/1 immünoflorasan boyanması özellikle villöz sitotrofoblastlar ve sinsisyotrofoblast tabakasında yoğun şekilde gözlendi. 2008 yılındaki başka bir çalışmada ise PE ve normal insan term plasental yatak biyopsileri incelendiğinde, MAPK3/1 ve fosfo-MAPK3/1 immün boyanması her iki gruptaki EVT'lerde de gözlenmiş fakat fosfo-MAPK3/1 ekspresyonu kontrole göre PE'de azaldığı tespit edilmiştir (Moon ve ark., 2008). Çalışmamızda da benzer şekilde iki grupta da fosfo-MAPK3/1 ekspresyonu EVT'lerde gözlendi. Ancak kontrol ve PE plasentaların desidualarındaki fosfo-MAPK3/1 immünoflorasan boyanma açısından anlamlı fark bulunmadı.

Çalışmamızın ikili immünoflorasan boyanma sonuçlarına göre hem kontrol hem de PE plasentaların çeşitli bölgelerinde fibronektin ile HIF proteinlerini, $\beta 3$ integrin ile HIF proteinlerini ve fosfo-MAPK3/1 ile HIF proteinlerini birlikte eksprese eden hücreler gözlendi. Bu durumda, daha önce fare TKH kültüründe gösterildiğı üzere (Choi ve ark., 2013), ESM proteini fibronektinin hücre adezyon molekülü $\beta 3$ integrini aktive ederek MAPK yolağını indüklemesi, böylece MAPK3/1'in fosforilasyonunu sağlaması ve oluşan fosfo-MAPK3/1'in HIF proteinlerini aktive etmesi gerçekleşmiş olabilir. Diğer bir değışle, plasentanın ESM içeriğinin HIF aktivasyonunu tetikleyebildiğine dair bir kanıttır. Ancak ikili immünoflorasan boyanma sonuçlarına göre bu mekanizma hem kontrol hem de PE plasentalarda mevcut olabileceğinden, PE'de bu sürecin

bozulmadığını düşünebiliriz. Bu durumda ESM indüklü MAPK-HIF yolağı hem kontrol hem de PE insan plasentalarında çalışıyor denebilir. PE plasentalardaki fibronektin ve $\beta 3$ integrinin mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonları kontrole göre anlamlı fark göstermemiştir. Öte yandan, PE’de HIF (HIF-1 α , HIF-1 β ve HIF-2 α) ekspresyonlarının hem mRNA hem de protein düzeyinde MAPK1’in ise mRNA düzeyinde kontrolden fazla olmasının ardında başka mekanizmalar yatmaktadır. Bu mekanizmalar PE oluşumunu indükleyen sebeplerden veya PE’nin doğurduğu sonuçlardan olabilir. 2001 yılındaki bir çalışmada incelenen ESM proteinlerinden sadece fibronektin ve lamininin insan plasental gelişiminin tüm evrelerinde villuslarda ekspresyonları tespit edilmiştir. Başka bir değışle, villus yapısının temel proteinleri fibronektin ve laminindir (Papadopoulos ve ark., 2001). Çalışmamızda PE plasentaların fibronektin ekspresyonları normale göre değışmediğinden, PE’de ESM indüklü MAPK-HIF ilişkisinin bozulup bozulmadığının incelenmesinde ESM proteini olarak fibronektin yerine lamininin görev alabileceğı düşünülebilir. Ayrıca HIF proteinlerindeki artış başka ESM proteinleriyle ilişkili olabileceğı gibi MMP’lar ile de ilişkili olabilir. Bunların anlaşılabilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır.

Fare TKH'lerin kültüre edildiğı ESM'nin MAPK sinyal iletim yolağı aracılığıyla HIF aktivasyonunu tetikleyebildiğine dair veriler mevcuttur. Çalışmamızla ilk kez bu mekanizmanın insan plasentasında sınanması gerçekleştirilmiş ve geçerli olabileceğine dair kanıtlar ortaya konmuştur. Ayrıca PE plasentalarda da bu yolağın işleyebileceğine dair veriler elde edilmiştir. Çalışmamızda PE plasentalarda da bu yolağın işleyebileceğine dair veriler elde edilmiştir. İnsan plasentasında ESM'nin MAPK sinyal iletim yolağı aracılığıyla HIF aktivasyonunu tetikleme yolağının varlığının kesinleşmesi ve bu yolağın plasental farklılaşmadaki fonksiyonunun anlaşılması için başka çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Böylece, trofoblastların HIF aktivasyonu yoluyla invazyon ve vasküler yeniden modellenme gerçekleştirirken uterus içindeki konumlarını nasıl belirledikleri anlaşılacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tezde, daha önce fare TKH kültürü kullanılarak gösterilen, ESM aracılığıyla $\beta 3$ integrin tarafından indüklenen MAPK'nin HIF'i aktive etmesi yolağını ilk kez insan normal ve PE plasentalarında araştırılmış olup aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir:

1. PE plasentalarda fibronektinin mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonları normale göre değişmemiştir.
2. PE ve normal plasentalar arasında $\beta 3$ integrinin mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonunda fark yoktur.
3. PE plasentaların HIF (HIF-1 α , HIF-1 β ve HIF-2 α) ekspresyonları hem mRNA hem de protein düzeyinde normale göre artmıştır.
4. PE plasentalarda MAPK1 ekspresyonu mRNA düzeyinde normalden fazla iken protein düzeyinde değişmemiştir. MAPK3'in ise mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonları PE ve normal plasentalar arasında aynı kalmıştır.
5. Normal ve PE plasentaların çeşitli bölgelerinde fibronektin ile HIF proteinlerini, $\beta 3$ integrin ile HIF proteinlerini ve fosfo-MAPK3/1 ile HIF proteinlerini beraber eksprese eden hücreler tespit edilmiştir. ESM indüklü MAPK-HIF yolağının hem normal hem de PE insan plasentalarında geçerli olabileceğine dair kanıtlar ilk kez ortaya konmuştur.
6. İnsan plasentasında ESM indüklü MAPK-HIF yolağının varlığının kesinleşmesi ve bu yolağın plasental hücrelerin farklılaşmasındaki rolünün anlaşılması için daha detaylı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Böylece, trofoblastların invazyon ve vasküler yeniden modellenmeyi gerçekleştirmek için, HIF aktivasyonu yoluyla uterus içindeki konumlarını nasıl belirledikleri açıklanabilecektir.

KAYNAKLAR

Acog. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstetrics and gynecology*. 2002; 99 (1): 159-167.

Adelman, D. M., Gertsenstein, M., Nagy, A., Simon, M. C., & Maltepe, E. Placental cell fates are regulated in vivo by hif-mediated hypoxia responses. *Genes & development*. 2000; 14 (24): 3191-3203.

Adelman, D. M., Maltepe, E., & Simon, M. C. Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic arnt activity. *Genes & development*. 1999; 13 (19): 2478-2483.

Akhilesh, M., Mahalingam, V., Nalliah, S., Ali, R. M., Ganesalingam, M., & Haleagrahara, N. Hypoxia-inducible factor-1alpha as a predictive marker in pre-eclampsia. *Biomedical reports*. 2013; 1 (2): 257-258.

Alese, M. O., Moodley, J., & Naicker, T. A. Signalling of erk1/2, p38mapk and p90rsk in hiv-associated pre-eclampsia. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*. 2019: 1-7.

Ali, L. E., Salih, M. M., Elhassan, E. M., Mohmmmed, A. A., & Adam, I. Placental growth factor, vascular endothelial growth factor, and hypoxia-inducible factor-1alpha in the placentas of women with pre-eclampsia. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2018: 1-5.

Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., & Juliano, R. L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacological reviews*. 1998; 50 (2): 197-263.

Aplin, J. D., Jones, C. J., & Harris, L. K. Adhesion molecules in human trophoblast - a review. I. Villous trophoblast. *Placenta*. 2009; 30 (4): 293-298.

Armant, D. R. Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. *Developmental biology*. 2005; 280 (2): 260-280.

Ashur-Fabian, O., Yerushalmi, G. M., Mazaki-Tovi, S., Steinberg, D. M., Goldshtein, I., Yackobovitch-Gavan, M., Rechavi, G. Cell free expression of hif1alpha and p21 in maternal peripheral blood as a marker for preeclampsia and fetal growth restriction. *PloS one*. 2012; 7 (5): e37273.

Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D., & Hynes, R. O. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell*. 1998; 95 (4): 507-519.

Baergen, R. N. Manual of benirschke and kaufmann's pathology of the human placenta (1st Ed.). New York: Springer; 2005, p:

Barczyk, M., Carracedo, S., & Gullberg, D. Integrins. *Cell and tissue research*. 2010; 339 (1): 269-280.

Benirschke, K. (1972). Implantation, placental development, uteroplacental blood flow. In D. E. Reid, K. J. Ryan, & K. Benirschke (Eds.), *Principles and management of human reproduction* (1st ed.). Philadelphia: WB Saunders.

Benirschke, K., Kaufmann, P., & Baergen, R. N. Pathology of the human placenta (5th ed.). New York: Springer; 2006, p:

Bissonauth, V., Roy, S., Gravel, M., Guillemette, S., & Charron, J. Requirement for map2k1 (mek1) in extra-embryonic ectoderm during placentogenesis. *Development*. 2006; 133 (17): 3429-3440.

Bowen, J. A., & Hunt, J. S. Expression of cell adhesion molecules in murine placentas and a placental cell line. *Biology of reproduction*. 1999; 60 (2): 428-434.

Bulmer, J. N. Immune aspects of pathology of the placental bed contributing to pregnancy pathology. *Bailliere's clinical obstetrics and gynaecology*. 1992; 6 (3): 461-488.

Burton, G. J. Oxygen, the janus gas; its effects on human placental development and function. *Journal of anatomy*. 2009; 215 (1): 27-35.

Burton, G. J., Kaufmann, P., & Huppertz, B. (2006). Anatomy and genesis of the placenta. In E. Knobil & J. D. Neil (Eds.), *Physiology of reproduction* (3rd ed.). New York: Elsevier.

Caniggia, I., Mostachfi, H., Winter, J., Gassmann, M., Lye, S. J., Kuliszewski, M., & Post, M. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through *tgfbeta(3)*. *The Journal of clinical investigation*. 2000; 105 (5): 577-587.

Caniggia, I., Winter, J., Lye, S. J., & Post, M. Oxygen and placental development during the first trimester: Implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta*. 2000; 21 Suppl A: S25-30.

Caniggia, I., & Winter, J. L. Adriana and luisa castellucci award lecture 2001. Hypoxia inducible factor-1: Oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic pregnancies--a review. *Placenta*. 2002; 23 Suppl A: S47-57.

Cao, T. C., Thirkill, T. L., Wells, M., Barakat, A. I., & Douglas, G. C. Trophoblasts and shear stress induce an asymmetric distribution of *icam-1* in uterine endothelial cells. *Am J Reprod Immunol*. 2008; 59 (2): 167-181.

Cartwright, J. E., Fraser, R., Leslie, K., Wallace, A. E., & James, J. L. Remodelling at the maternal-fetal interface: Relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction*. 2010; 140 (6): 803-813.

Castellucci, M., Kosanke, G., Verdenelli, F., Huppertz, B., & Kaufmann, P. Villous sprouting: Fundamental mechanisms of human placental development. *Human reproduction update*. 2000; 6 (5): 485-494.

Catt, J. W., & Henman, M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod.* 2000; 15 Suppl 2: 199-206.

Chauhan, M., Yallampalli, U., Dong, Y. L., Hankins, G. D., & Yallampalli, C. Expression of adrenomedullin 2 (adm2)/intermedin (imd) in human placenta: Role in trophoblast invasion and migration. *Biology of reproduction.* 2009; 81 (4): 777-783.

Chen, C. P., & Aplin, J. D. Placental extracellular matrix: Gene expression, deposition by placental fibroblasts and the effect of oxygen. *Placenta.* 2003; 24 (4): 316-325.

Chen, C. P., Chen, C. Y., & Wu, Y. H. Oxidative stress reduces trophoblast foxo1 and integrin beta3 expression that inhibits cell motility. *Free radical biology & medicine.* 2018; 124: 189-198.

Chen, C. P., Chen, C. Y., Yang, Y. C., Su, T. H., & Chen, H. Decreased placental gcm1 (glial cells missing) gene expression in pre-eclampsia. *Placenta.* 2004; 25 (5): 413-421.

Chen, L., Endler, A., & Shibasaki, F. Hypoxia and angiogenesis: Regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Experimental & molecular medicine.* 2009; 41 (12): 849-857.

Cheresh, D. A., & Harper, J. R. Arg-gly-asp recognition by a cell adhesion receptor requires its 130-kda alpha subunit. *The Journal of biological chemistry.* 1987; 262 (4): 1434-1437.

Chesley, L. C., & Cooper, D. W. Genetics of hypertension in pregnancy: Possible single gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. *British journal of obstetrics and gynaecology.* 1986; 93 (9): 898-908.

Choi, H. J., Sanders, T. A., Tormos, K. V., Ameri, K., Tsai, J. D., Park, A. M., . . . Maltepe, E. Ecm-dependent hif induction directs trophoblast stem cell fate via limk1-mediated cytoskeletal rearrangement. *PloS one.* 2013; 8 (2): e56949.

Christie, G. R., Williams, D. J., Macisaac, F., Dickinson, R. J., Rosewell, I., & Keyse, S. M. The dual-specificity protein phosphatase dusp9/mkp-4 is essential for placental

function but is not required for normal embryonic development. *Molecular and cellular biology*. 2005; 25 (18): 8323-8333.

Cockle, J. V., Gopichandran, N., Walker, J. J., Levene, M. I., & Orsi, N. M. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preterm perinatal complications. *Reprod Sci*. 2007; 14 (7): 629-645.

Cockman, M. E., Masson, N., Mole, D. R., Jaakkola, P., Chang, G. W., Clifford, S. C., Maxwell, P. H. Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von hippel-lindau tumor suppressor protein. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275 (33): 25733-25741.

Conrad, P. W., Freeman, T. L., Beitner-Johnson, D., & Millhorn, D. E. Epas1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 mapk. *The Journal of biological chemistry*. 1999; 274 (47): 33709-33713.

Cowden Dahl, K. D., Fryer, B. H., Mack, F. A., Compennolle, V., Maltepe, E., Adelman, D. M., Simon, M. C. Hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α regulate trophoblast differentiation. *Molecular and cellular biology*. 2005; 25 (23): 10479-10491.

Cowden Dahl, K. D., Robertson, S. E., Weaver, V. M., & Simon, M. C. Hypoxia-inducible factor regulates α v β 3 integrin cell surface expression. *Molecular biology of the cell*. 2005; 16 (4): 1901-1912.

Crocker, I. P., Wareing, M., Ferris, G. R., Jones, C. J., Cartwright, J. E., Baker, P. N., & Aplin, J. D. The effect of vascular origin, oxygen, and tumour necrosis factor α on trophoblast invasion of maternal arteries in vitro. *The Journal of pathology*. 2005; 206 (4): 476-485.

Cunningham, F. G., Mac Donald, P. C., & Gant, N. F. (1994). The placenta and fetal membranes. In *Williams obstetrics* (19th ed.). Philadelphia: Norwalk, Appleton & Lange.

Damsky, C. H., Fitzgerald, M. L., & Fisher, S. J. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first

trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 1992; 89 (1): 210-222.

Das, R., Jahr, H., van Osch, G. J., & Farrell, E. The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue engineering. Part B, Reviews*. 2010; 16 (2): 159-168.

De Filippis, L., & Delia, D. Hypoxia in the regulation of neural stem cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011; 68 (17): 2831-2844.

De Wolf, F., De Wolf-Peeters, C., Brosens, I., & Robertson, W. B. The human placental bed: Electron microscopic study of trophoblastic invasion of spiral arteries. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1980; 137 (1): 58-70.

Dennis, E. J., Mc Farland, K. F., & Hester, L. L. *Obstetrics and gynecology* (4th ed.). Philadelphia: Harper and Row; 1982, p:

DiFederico, E., Genbacev, O., & Fisher, S. J. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *The American journal of pathology*. 1999; 155 (1): 293-301.

Dimova, E. Y., Michiels, C., & Kietzmann, T. Kinases as upstream regulators of the hif system: Their emerging potential as anti-cancer drug targets. *Current pharmaceutical design*. 2009; 15 (33): 3867-3877.

Du, X., & Ginsberg, M. H. Integrin alpha iib beta 3 and platelet function. *Thrombosis and haemostasis*. 1997; 78 (1): 96-100.

Dunwoodie, S. L. The role of hypoxia in development of the mammalian embryo. *Developmental cell*. 2009; 17 (6): 755-773.

Earl, U., Estlin, C., & Bulmer, J. N. Fibronectin and laminin in the early human placenta. *Placenta*. 1990; 11 (3): 223-231.

Eliceiri, B. P. Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circulation research*. 2001; 89 (12): 1104-1110.

Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., & Fujii-Kuriyama, Y. A novel bhlh-pas factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the vegf expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94 (9): 4273-4278.

Enders, A. C., & King, B. F. Early stages of trophoblastic invasion of the maternal vascular system during implantation in the macaque and baboon. *The American journal of anatomy*. 1991; 192 (4): 329-346.

Eshghi, S., Vogelesang, M. G., Hynes, R. O., Griffith, L. G., & Lodish, H. F. Alpha4beta1 integrin and erythropoietin mediate temporally distinct steps in erythropoiesis: Integrins in red cell development. *The Journal of cell biology*. 2007; 177 (5): 871-880.

Estelles, A., Gilabert, J., Aznar, J., Loskutoff, D. J., & Schleef, R. R. Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood*. 1989; 74 (4): 1332-1338.

Estelles, A., Gilabert, J., Keeton, M., Eguchi, Y., Aznar, J., Grancha, S., Schleef, R. R. Altered expression of plasminogen activator inhibitor type 1 in placentas from pregnant women with preeclampsia and/or intrauterine fetal growth retardation. *Blood*. 1994; 84 (1): 143-150.

Felding-Habermann, B., & Cheresh, D. A. Vitronectin and its receptors. *Current opinion in cell biology*. 1993; 5 (5): 864-868.

Fischer, B., & Bavister, B. D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of reproduction and fertility*. 1993; 99 (2): 673-679.

Fisher, S. J., Leitch, M. S., Kantor, M. S., Basbaum, C. B., & Kramer, R. H. Degradation of extracellular matrix by the trophoblastic cells of first-trimester human placentas. *Journal of cellular biochemistry*. 1985; 27 (1): 31-41.

Fitzgerald, J. S., Germeyer, A., Huppertz, B., Jeschke, U., Knofler, M., Moser, G., Markert, U. R. Governing the invasive trophoblast: Current aspects on intra- and extracellular regulation. *Am J Reprod Immunol*. 2010; 63 (6): 492-505.

Fox, H. (1995). General pathology of the placenta In *Haines and Taylor's obstetrical and gynecological pathology* (4th ed.). New York: Churchill Livingstone.

Fox, H., Wells, M., Taylor, C. W., & Haines, M. *Obstetrical and gynaecological pathology* (5th ed.). Edinburgh: Livingstone; 2003, p:

Fujita, D., Tanabe, A., Sekijima, T., Soen, H., Narahara, K., Yamashita, Y., Ohmichi, M. Role of extracellular signal-regulated kinase and akt cascades in regulating hypoxia-induced angiogenic factors produced by a trophoblast-derived cell line. *The Journal of endocrinology*. 2010; 206 (1): 131-140.

Genbacev, O., Joslin, R., Damsky, C. H., Polliotti, B. M., & Fisher, S. J. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *The Journal of clinical investigation*. 1996; 97 (2): 540-550.

Genbacev, O., Krtolica, A., Kaelin, W., & Fisher, S. J. Human cytotrophoblast expression of the von hippel-lindau protein is downregulated during uterine invasion in situ and upregulated by hypoxia in vitro. *Developmental biology*. 2001; 233 (2): 526-536.

Genbacev, O., Zhou, Y., Ludlow, J. W., & Fisher, S. J. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*. 1997; 277 (5332): 1669-1672.

Gerretsen, G., Huisjes, H. J., & Elema, J. D. Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1981; 88 (9): 876-881.

Giancotti, F. G., & Tarone, G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annual review of cell and developmental biology*. 2003; 19: 173-206.

Giroux, S., Tremblay, M., Bernard, D., Cardin-Girard, J. F., Aubry, S., Larouche, L., Charron, J. Embryonic death of mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Current biology : CB*. 1999; 9 (7): 369-372.

Gnarra, J. R., Ward, J. M., Porter, F. D., Wagner, J. R., Devor, D. E., Grinberg, A., Linehan, W. M. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in vhl-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94 (17): 9102-9107.

Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D., & Romero, R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008; 371 (9606): 75-84.

Graham, C. H., & McCrae, K. R. Altered expression of gelatinase and surface-associated plasminogen activator activity by trophoblast cells isolated from placentas of preeclamptic patients. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1996; 175 (3 Pt 1): 555-562.

Greer, S. N., Metcalf, J. L., Wang, Y., & Ohh, M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *The EMBO journal*. 2012; 31 (11): 2448-2460.

Gu, Y. Z., Hogenesch, J. B., & Bradfield, C. A. The pas superfamily: Sensors of environmental and developmental signals. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2000; 40: 519-561.

Guilak, F., Cohen, D. M., Estes, B. T., Gimble, J. M., Liedtke, W., & Chen, C. S. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell stem cell*. 2009; 5 (1): 17-26.

Guillemot, F., Caspary, T., Tilghman, S. M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Nagy, A. Genomic imprinting of *mash2*, a mouse gene required for trophoblast development. *Nature genetics*. 1995; 9 (3): 235-242.

Guillemot, F., Nagy, A., Auerbach, A., Rossant, J., & Joyner, A. L. Essential role of *mash-2* in extraembryonic development. *Nature*. 1994; 371 (6495): 333-336.

Guller, S. Role of the syncytium in placenta-mediated complications of preeclampsia. *Thrombosis research*. 2009; 124 (4): 389-392.

Gutierrez, J., Aedo, A., Mora, J., Maldonado, J., Salsoso, R., Toledo, F., Sobrevia, L. Preeclampsia associates with *reck*-dependent decrease in human trophoblasts migration and invasion. *Placenta*. 2017; 59: 19-29.

Haddad, J. J., & Land, S. C. A non-hypoxic, *ros*-sensitive pathway mediates *tnf*- α -dependent regulation of *hif-1* α . *FEBS letters*. 2001; 505 (2): 269-274.

Harburger, D. S., & Calderwood, D. A. Integrin signalling at a glance. *Journal of cell science*. 2009; 122 (Pt 2): 159-163.

Harris, L. K., Jones, C. J., & Aplin, J. D. Adhesion molecules in human trophoblast - a review. ii. Extravillous trophoblast. *Placenta*. 2009; 30 (4): 299-304.

Hatano, N., Mori, Y., Oh-hora, M., Kosugi, A., Fujikawa, T., Nakai, N., Ogata, M. Essential role for *erk2* mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2003; 8 (11): 847-856.

Hodivala-Dilke, K. M., McHugh, K. P., Tsakiris, D. A., Rayburn, H., Crowley, D., Ullman-Cullere, M., Hynes, R. O. *Beta3*-integrin-deficient mice are a model for glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *The Journal of clinical investigation*. 1999; 103 (2): 229-238.

Hsu, J. C., & Perrimon, N. A temperature-sensitive *mek* mutation demonstrates the conservation of the signaling pathways activated by receptor tyrosine kinases. *Genes & development*. 1994; 8 (18): 2176-2187.

Huang, Q., Li, J., Wang, F., Oliver, M. T., Tipton, T., Gao, Y., & Jiang, S. W. Syncytin-1 modulates placental trophoblast cell proliferation by promoting g1/s transition. *Cellular signalling*. 2013; 25 (4): 1027-1035.

Hughes, C. S., Radan, L., Betts, D., Postovit, L. M., & Lajoie, G. A. Proteomic analysis of extracellular matrices used in stem cell culture. *Proteomics*. 2011; 11 (20): 3983-3991.

Huppertz, B. The anatomy of the normal placenta. *Journal of clinical pathology*. 2008; 61 (12): 1296-1302.

Huppertz, B., Kertschanska, S., Demir, A. Y., Frank, H. G., & Kaufmann, P. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (mmp), their substrates, and their inhibitors (timp) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell and tissue research*. 1998; 291 (1): 133-148.

Hurskainen, T., Hoyhtya, M., Tuuttila, A., Oikarinen, A., & Autio-Harminen, H. Mrna expressions of timp-1, -2, and -3 and 92-kd type iv collagenase in early human placenta and decidual membrane as studied by in situ hybridization. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1996; 44 (12): 1379-1388.

Hynes, R. O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002; 110 (6): 673-687.

Iriyama, T., Wang, W., Parchim, N. F., Song, A., Blackwell, S. C., Sibai, B. M., Xia, Y. Hypoxia-independent upregulation of placental hypoxia inducible factor-1alpha gene expression contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Hypertension*. 2015; 65 (6): 1307-1315.

Isaka, K., Usuda, S., Ito, H., Sagawa, Y., Nakamura, H., Nishi, H., Takayama, M. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta*. 2003; 24 (1): 53-64.

Ishihara, N., Matsuo, H., Murakoshi, H., Laoag-Fernandez, J. B., Samoto, T., & Maruo, T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2002; 186 (1): 158-166.

Iwaki, T., Yamamoto, K., Matsuura, T., Sugimura, M., Kobayashi, T., & Kanayama, N. Alteration of integrins under hypoxic stress in early placenta and choriocarcinoma cell line bewo. *Gynecologic and obstetric investigation*. 2004; 57 (4): 196-203.

Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Semenza, G. L. Cellular and developmental control of o₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes & development*. 1998; 12 (2): 149-162.

James, J. L., Stone, P. R., & Chamley, L. W. The effects of oxygen concentration and gestational age on extravillous trophoblast outgrowth in a human first trimester villous explant model. *Hum Reprod*. 2006; 21 (10): 2699-2705.

Janatpour, M. J., McMaster, M. T., Genbacev, O., Zhou, Y., Dong, J., Cross, J. C., Fisher, S. J. Id-2 regulates critical aspects of human cytotrophoblast differentiation, invasion and migration. *Development*. 2000; 127 (3): 549-558.

Janatpour, M. J., Utset, M. F., Cross, J. C., Rossant, J., Dong, J., Israel, M. A., & Fisher, S. J. A repertoire of differentially expressed transcription factors that offers insight into mechanisms of human cytotrophoblast differentiation. *Developmental genetics*. 1999; 25 (2): 146-157.

Jeyabalan, A., Kerchner, L. J., Fisher, M. C., McGuane, J. T., Doty, K. D., & Conrad, K. P. Matrix metalloproteinase-2 activity, protein, mrna, and tissue inhibitors in small arteries from pregnant and relaxin-treated nonpregnant rats. *J Appl Physiol* (1985). 2006; 100 (6): 1955-1963.

Jeyabalan, A., Novak, J., Doty, K. D., Matthews, J., Fisher, M. C., Kerchner, L. J., & Conrad, K. P. Vascular matrix metalloproteinase-9 mediates the inhibition of myogenic

reactivity in small arteries isolated from rats after short-term administration of relaxin. *Endocrinology*. 2007; 148 (1): 189-197.

Jim, B., & Karumanchi, S. A. Preeclampsia: Pathogenesis, prevention, and long-term complications. *Seminars in nephrology*. 2017; 37 (4): 386-397.

Kabir-Salmani, M., Shiokawa, S., Akimoto, Y., Sakai, K., Nagamatsu, S., Nakamura, Y., Iwashita, M. Alphavbeta3 integrin signaling pathway is involved in insulin-like growth factor i-stimulated human extravillous trophoblast cell migration. *Endocrinology*. 2003; 144 (4): 1620-1630.

Kanasaki, K., Palmsten, K., Sugimoto, H., Ahmad, S., Hamano, Y., Xie, L., Kalluri, R. Deficiency in catechol-o-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature*. 2008; 453 (7198): 1117-1121.

Kaufmann, P., Huppertz, B., & Frank, H. G. The fibrinoids of the human placenta: Origin, composition and functional relevance. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*. 1996; 178 (6): 485-501.

Khong, T. Y., De Wolf, F., Robertson, W. B., & Brosens, I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1986; 93 (10): 1049-1059.

Kim, S. H., Turnbull, J., & Guimond, S. Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *The Journal of endocrinology*. 2011; 209 (2): 139-151.

Kinbara, K., Goldfinger, L. E., Hansen, M., Chou, F. L., & Ginsberg, M. H. Ras gtpases: Integrins' friends or foes? *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2003; 4 (10): 767-776.

Kingdom, J. C., & Kaufmann, P. Oxygen and placental vascular development. *Advances in experimental medicine and biology*. 1999; 474: 259-275.

Kita, N., Mitsushita, J., Ohira, S., Takagi, Y., Ashida, T., Kanai, M., Konishi, I. Expression and activation of map kinases, erk1/2, in the human villous trophoblasts. *Placenta*. 2003; 24 (2-3): 164-172.

Kolben, M., Lopens, A., Blaser, J., Ulm, K., Schmitt, M., Schneider, K. T., & Tschesche, H. Proteases and their inhibitors are indicative in gestational disease. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 1996; 68 (1-2): 59-65.

Kolch, W. Meaningful relationships: The regulation of the ras/raf/mek/erk pathway by protein interactions. *The Biochemical journal*. 2000; 351 Pt 2: 289-305.

Korkes, H. A., De Oliveira, L., Sass, N., Salahuddin, S., Karumanchi, S. A., & Rajakumar, A. Relationship between hypoxia and downstream pathogenic pathways in preeclampsia. *Hypertension in pregnancy*. 2017; 36 (2): 145-150.

Kornblihtt, A. R., Umezawa, K., Vibe-Pedersen, K., & Baralle, F. E. Primary structure of human fibronectin: Differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *The EMBO journal*. 1985; 4 (7): 1755-1759.

Kornfeld, K., Guan, K. L., & Horvitz, H. R. The *caenorhabditis elegans* gene mek-2 is required for vulval induction and encodes a protein similar to the protein kinase mek. *Genes & development*. 1995; 9 (6): 756-768.

Kozak, K. R., Abbott, B., & Hankinson, O. Arnt-deficient mice and placental differentiation. *Developmental biology*. 1997; 191 (2): 297-305.

Kudo, Y., Boyd, C. A., Sargent, I. L., & Redman, C. W. Hypoxia alters expression and function of syncytin and its receptor during trophoblast cell fusion of human placental bewo cells: Implications for impaired trophoblast syncytialisation in pre-eclampsia. *Biochimica et biophysica acta*. 2003; 1638 (1): 63-71.

Kuo, V. S., Koumantakis, G., & Gallery, E. D. Proteinuria and its assessment in normal and hypertensive pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1992; 167 (3): 723-728.

Lee, J. T., Jr., & McCubrey, J. A. The raf/mek/erk signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia*. 2002; 16 (4): 486-507.

Lei, T., Hohn, H. P., Behr, R., & Denker, H. W. Influences of extracellular matrix and of conditioned media on differentiation and invasiveness of trophoblast stem cells. *Placenta*. 2007; 28 (1): 14-21.

Li, M., Yee, D., Magnuson, T. R., Smithies, O., & Caron, K. M. Reduced maternal expression of adrenomedullin disrupts fertility, placentation, and fetal growth in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2006; 116 (10): 2653-2662.

Liem, A. A., Chamberlain, M. P., Wolf, C. R., & Thompson, A. M. The role of signal transduction in cancer treatment and drug resistance. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2002; 28 (6): 679-684.

Lim, H. J., & Wang, H. Uterine disorders and pregnancy complications: Insights from mouse models. *The Journal of clinical investigation*. 2010; 120 (4): 1004-1015.

Lim, K. H., Zhou, Y., Janatpour, M., McMaster, M., Bass, K., Chun, S. H., & Fisher, S. J. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *The American journal of pathology*. 1997; 151 (6): 1809-1818.

Liu, W., Wang, S. J., & Lin, Q. D. Study on the expressions of phd and hif in placentas from normal pregnant women and patients with preeclampsia. *International journal of biological sciences*. 2014; 10 (3): 278-284.

Liu, Y., Lagowski, J., Sundholm, A., Sundberg, A., & Kulesz-Martin, M. Microtubule disruption and tumor suppression by mitogen-activated protein kinase phosphatase 4. *Cancer research*. 2007; 67 (22): 10711-10719.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951; 193 (1): 265-275.

Mabjeesh, N. J., Escuin, D., LaVallee, T. M., Pribluda, V. S., Swartz, G. M., Johnson, M. S., Giannakakou, P. 2me2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating hif. *Cancer cell*. 2003; 3 (4): 363-375.

Malassine, A., Frenedo, J. L., Blaise, S., Handschuh, K., Gerbaud, P., Tsatsaris, V., Evain-Brion, D. Human endogenous retrovirus-frd envelope protein (syncytin 2) expression in normal and trisomy 21-affected placenta. *Retrovirology*. 2008; 5: 6.

Maltepe, E., Bakardjiev, A. I., & Fisher, S. J. The placenta: Transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *The Journal of clinical investigation*. 2010; 120 (4): 1016-1025.

Maltepe, E., Krampitz, G. W., Okazaki, K. M., Red-Horse, K., Mak, W., Simon, M. C., & Fisher, S. J. Hypoxia-inducible factor-dependent histone deacetylase activity determines stem cell fate in the placenta. *Development*. 2005; 132 (15): 3393-3403.

Maltepe, E., Schmidt, J. V., Baunoch, D., Bradfield, C. A., & Simon, M. C. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein arnt. *Nature*. 1997; 386 (6623): 403-407.

Mathew, S. A., Chandravanshi, B., & Bhonde, R. Hypoxia primed placental mesenchymal stem cells for wound healing. *Life sciences*. 2017; 182: 85-92.

Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Ratcliffe, P. J. The tumour suppressor protein vhl targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999; 399 (6733): 271-275.

Mayhew, T. M., & Simpson, R. A. Quantitative evidence for the spatial dispersal of trophoblast nuclei in human placental villi during gestation. *Placenta*. 1994; 15 (8): 837-844.

Maynard, S., Epstein, F. H., & Karumanchi, S. A. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annual review of medicine*. 2008; 59: 61-78.

Maynard, S. E., Min, J. Y., Merchan, J., Lim, K. H., Li, J., Mondal, S., Karumanchi, S. A. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sflt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of clinical investigation*. 2003; 111 (5): 649-658.

McCaig, D., & Lyall, F. Hypoxia upregulates *gcml* in human placenta explants. *Hypertension in pregnancy*. 2009; 28 (4): 457-472.

McMahon, S., Charbonneau, M., Grandmont, S., Richard, D. E., & Dubois, C. M. Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of *phd2* expression. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281 (34): 24171-24181.

Meighan, C. M., & Schwarzbauer, J. E. Temporal and spatial regulation of integrins during development. *Current opinion in cell biology*. 2008; 20 (5): 520-524.

Merchant, S. J., & Davidge, S. T. The role of matrix metalloproteinases in vascular function: Implications for normal pregnancy and pre-eclampsia. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2004; 111 (9): 931-939.

Merchant, S. J., Narumiya, H., Zhang, Y., Guilbert, L. J., & Davidge, S. T. The effects of preeclampsia and oxygen environment on endothelial release of matrix metalloproteinase-2. *Hypertension in pregnancy*. 2004; 23 (1): 47-60.

Meziani, F., Tesse, A., David, E., Martinez, M. C., Wangesteen, R., Schneider, F., & Andriantsitohaina, R. Shed membrane particles from preeclamptic women generate vascular wall inflammation and blunt vascular contractility. *The American journal of pathology*. 2006; 169 (4): 1473-1483.

Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., Michiels, C. Erk activation upon hypoxia: Involvement in *hif-1* activation. *FEBS letters*. 2000; 468 (1): 53-58.

Miyamoto, S., Katz, B. Z., Lafrenie, R. M., & Yamada, K. M. Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998; 857: 119-129.

Mohyeldin, A., Garzon-Muvdi, T., & Quinones-Hinojosa, A. Oxygen in stem cell biology: A critical component of the stem cell niche. *Cell stem cell*. 2010; 7 (2): 150-161.

Moon, K. C., Park, J. S., Norwitz, E. R., Kim, D. I., Oh, K. J., Park, C. W., Syn, H. C. Expression of extracellular signal-regulated kinase1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the invasive trophoblasts at the human placental bed. *Placenta*. 2008; 29 (5): 391-395.

Moran, P., Lindheimer, M. D., & Davison, J. M. The renal response to preeclampsia. *Seminars in nephrology*. 2004; 24 (6): 588-595.

Morgan, M., Kniss, D., & McDonnell, S. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in human trophoblast continuous cell lines. *Experimental cell research*. 1998; 242 (1): 18-26.

Mosher, D. F., & Johnson, R. B. In vitro formation of disulfide-bonded fibronectin multimers. *The Journal of biological chemistry*. 1983; 258 (10): 6595-6601.

Muller, J. M., Krauss, B., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A., & Rupec, R. A. Hypoxia induces c-fos transcription via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1997; 272 (37): 23435-23439.

Myatt, L., & Webster, R. P. Vascular biology of preeclampsia. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009; 7 (3): 375-384.

Myers, J. E., Merchant, S. J., Macleod, M., Mires, G. J., Baker, P. N., & Davidge, S. T. Mmp-2 levels are elevated in the plasma of women who subsequently develop preeclampsia. *Hypertension in pregnancy*. 2005; 24 (2): 103-115.

Mylonis, I., Chachami, G., Paraskeva, E., & Simos, G. Atypical crm1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by mapk. *The Journal of biological chemistry*. 2008; 283 (41): 27620-27627.

Nadeau, V., Guillemette, S., Belanger, L. F., Jacob, O., Roy, S., & Charron, J. Map2k1 and map2k2 genes contribute to the normal development of syncytiotrophoblasts during placentation. *Development*. 2009; 136 (8): 1363-1374.

Narumiya, H., Zhang, Y., Fernandez-Patron, C., Guilbert, L. J., & Davidge, S. T. Matrix metalloproteinase-2 is elevated in the plasma of women with preeclampsia. *Hypertension in pregnancy*. 2001; 20 (2): 185-194.

Nauta, T. D., van Hinsbergh, V. W., & Koolwijk, P. Hypoxic signaling during tissue repair and regenerative medicine. *International journal of molecular sciences*. 2014; 15 (11): 19791-19815.

Nevo, O., Soleymanlou, N., Wu, Y., Xu, J., Kingdom, J., Many, A., Caniggia, I. Increased expression of sflt-1 in in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by hif-1. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2006; 291 (4): R1085-1093.

Nilsson, E., Salonen Ros, H., Cnattingius, S., & Lichtenstein, P. The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: A family study. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2004; 111 (3): 200-206.

Papadopoulos, N., Simopoulos, C., Polihronidis, A., Sivridis, E., Anastasiadis, P., Karamanidis, D., Tamiolakis, D. Expression of fibrillar proteins and vimentin in developing chorionic villi is related to fetal maturation. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*. 2001; 28 (3): 171-172.

Papageorghiou, A. T., Yu, C. K., Bindra, R., Pandis, G., & Nicolaides, K. H. Multicenter screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by transvaginal uterine artery doppler at 23 weeks of gestation. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official*

journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. 2001; 18 (5): 441-449.

Parast, M. M., Aeder, S., & Sutherland, A. E. Trophoblast giant-cell differentiation involves changes in cytoskeleton and cell motility. *Developmental biology*. 2001; 230 (1): 43-60.

Park, M. H., Galan, H. L., & Arroyo, J. A. Effect of hypoxia on endothelial nitric oxide synthase, no production, intracellular survival signaling (p-erk1/2 and p-akt) and apoptosis in human term trophoblast. *Am J Reprod Immunol*. 2011; 65 (4): 407-414.

Patel, J., Landers, K., Mortimer, R. H., & Richard, K. Regulation of hypoxia inducible factors (hif) in hypoxia and normoxia during placental development. *Placenta*. 2010; 31 (11): 951-957.

Phillips, P. G., Birnby, L. M., & Narendran, A. Hypoxia induces capillary network formation in cultured bovine pulmonary microvessel endothelial cells. *The American journal of physiology*. 1995; 268 (5 Pt 1): L789-800.

Piering, W. F., Garancis, J. G., Becker, C. G., Beres, J. A., & Lemann, J., Jr. Preeclampsia related to a functioning extrauterine placenta: Report of a case and 25-year follow-up. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1993; 21 (3): 310-313.

Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., & Smith, J. W. Ligand binding to integrins. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275 (29): 21785-21788.

Pringle, K. G., Kind, K. L., Sferruzzi-Perri, A. N., Thompson, J. G., & Roberts, C. T. Beyond oxygen: Complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. *Human reproduction update*. 2010; 16 (4): 415-431.

Pritchard, J. A., Mac Donald, P. C., & Gant, N. F. *Williams obstetrics* (19th ed.). Norwalk, Appleton & Lange; 1994, p:

Rajakumar, A., Brandon, H. M., Daftary, A., Ness, R., & Conrad, K. P. Evidence for the functional activity of hypoxia-inducible transcription factors overexpressed in preeclamptic placentae. *Placenta*. 2004; 25 (10): 763-769.

Rajakumar, A., & Conrad, K. P. Expression, ontogeny, and regulation of hypoxia-inducible transcription factors in the human placenta. *Biology of reproduction*. 2000; 63 (2): 559-569.

Rajakumar, A., Whitelock, K. A., Weissfeld, L. A., Daftary, A. R., Markovic, N., & Conrad, K. P. Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, hif-2alpha, in placentas from women with preeclampsia. *Biology of reproduction*. 2001; 64 (2): 499-506.

Ramos, J. W. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (erk) in mammalian cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008; 40 (12): 2707-2719.

Rath, G., Aggarwal, R., Jawanjal, P., Tripathi, R., & Batra, A. Hif-1 alpha and placental growth factor in pregnancies complicated with preeclampsia: A qualitative and quantitative analysis. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2016; 30 (1): 75-83.

Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Prakobphol, A., Foulk, R., McMaster, M., & Fisher, S. J. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *The Journal of clinical investigation*. 2004; 114 (6): 744-754.

Redman, C. W. Immunological aspects of pre-eclampsia. *Bailliere's clinical obstetrics and gynaecology*. 1992; 6 (3): 601-615.

Redman, C. W., & Sargent, I. L. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005; 308 (5728): 1592-1594.

Redman, C. W., & Sargent, I. L. Circulating microparticles in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta*. 2008; 29 Suppl A: S73-77.

Reilly, G. C., & Engler, A. J. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *Journal of biomechanics*. 2010; 43 (1): 55-62.

Richard, D. E., Berra, E., & Pouyssegur, J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275 (35): 26765-26771.

Roberts, J. M., & Lain, K. Y. Recent insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta*. 2002; 23 (5): 359-372.

Roberts, J. M., Taylor, R. N., Musci, T. J., Rodgers, G. M., Hubel, C. A., & McLaughlin, M. K. Preeclampsia: An endothelial cell disorder. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1989; 161 (5): 1200-1204.

Rocha, S. Gene regulation under low oxygen: Holding your breath for transcription. *Trends in biochemical sciences*. 2007; 32 (8): 389-397.

Rolfo, A., Many, A., Racano, A., Tal, R., Tagliaferro, A., Ietta, F., Caniggia, I. Abnormalities in oxygen sensing define early and late onset preeclampsia as distinct pathologies. *PloS one*. 2010; 5 (10): e13288.

Rossant, J., & Tam, P. P. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development*. 2009; 136 (5): 701-713.

Rout, U. K., Wang, J., Paria, B. C., & Armant, D. R. Alpha5beta1, alphavbeta3 and the platelet-associated integrin alphaIIb beta3 coordinately regulate adhesion and migration of differentiating mouse trophoblast cells. *Developmental biology*. 2004; 268 (1): 135-151.

Ruoslahti, E. Fibronectin and its receptors. *Annual review of biochemistry*. 1988; 57: 375-413.

Ryan, H. E., Lo, J., & Johnson, R. S. Hif-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *The EMBO journal*. 1998; 17 (11): 3005-3015.

Saba-El-Leil, M. K., Vella, F. D., Vernay, B., Voisin, L., Chen, L., Labrecque, N., Meloche, S. An essential function of the mitogen-activated protein kinase erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep.* 2003; 4 (10): 964-968.

Sadler, T. W. *Langman's medical embryology* (9th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2004, p:

Safran, M., & Kaelin, W. G., Jr. Hif hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *The Journal of clinical investigation.* 2003; 111 (6): 779-783.

Sang, N., Stiehl, D. P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V., & Caro, J. Mapk signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *The Journal of biological chemistry.* 2003; 278 (16): 14013-14019.

Seeho, S. K., Park, J. H., Rowe, J., Morris, J. M., & Gallery, E. D. Villous explant culture using early gestation tissue from ongoing pregnancies with known normal outcomes: The effect of oxygen on trophoblast outgrowth and migration. *Hum Reprod.* 2008; 23 (5): 1170-1179.

Semenza, G. L. Hypoxia, clonal selection, and the role of hif-1 in tumor progression. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology.* 2000; 35 (2): 71-103.

Seval, Y., Akkoyunlu, G., Demir, R., & Asar, M. Distribution patterns of matrix metalloproteinase (mmp)-2 and -9 and their inhibitors (timp-1 and timp-2) in the human decidua during early pregnancy. *Acta histochemica.* 2004; 106 (5): 353-362.

Sezer, S. D., Kucuk, M., Doger, F. K., Yuksel, H., Odabasi, A. R., Turkmen, M. K., Kinas, M. G. Vegf, pigf and hif-1alpha in placentas of early- and late-onset preeclamptic patients. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology.* 2013; 29 (8): 797-800.

Sibai, B. M., Ewell, M., Levine, R. J., Klebanoff, M. A., Esterlitz, J., Catalano, P. M., Joffe, G. Risk factors associated with preeclampsia in healthy nulliparous women. The calcium for preeclampsia prevention (cpep) study group. *American journal of obstetrics and gynecology.* 1997; 177 (5): 1003-1010.

Singh, H., & Aplin, J. D. Adhesion molecules in endometrial epithelium: Tissue integrity and embryo implantation. *Journal of anatomy*. 2009; 215 (1): 3-13.

Soghomonians, A., Barakat, A. I., Thirkill, T. L., & Douglas, G. C. Trophoblast migration under flow is regulated by endothelial cells. *Biology of reproduction*. 2005; 73 (1): 14-19.

Soleymanlou, N., Jurisica, I., Nevo, O., Ietta, F., Zhang, X., Zamudio, S., Caniggia, I. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005; 90 (7): 4299-4308.

Soung, Y. H., Clifford, J. L., & Chung, J. Crosstalk between integrin and receptor tyrosine kinase signaling in breast carcinoma progression. *BMB reports*. 2010; 43 (5): 311-318.

Stevens, M. M., & George, J. H. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*. 2005; 310 (5751): 1135-1138.

Suda, T., Takubo, K., & Semenza, G. L. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell stem cell*. 2011; 9 (4): 298-310.

Sutherland, A. Mechanisms of implantation in the mouse: Differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behavior. *Developmental biology*. 2003; 258 (2): 241-251.

Takeda, K., Ho, V. C., Takeda, H., Duan, L. J., Nagy, A., & Fong, G. H. Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Molecular and cellular biology*. 2006; 26 (22): 8336-8346.

Tal, R., Shaish, A., Barshack, I., Polak-Charcon, S., Afek, A., Volkov, A., Harats, D. Effects of hypoxia-inducible factor-1alpha overexpression in pregnant mice: Possible implications for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *The American journal of pathology*. 2010; 177 (6): 2950-2962.

Tarone, G., Hirsch, E., Brancaccio, M., De Acetis, M., Barberis, L., Balzac, F., Silengo, L. Integrin function and regulation in development. *The International journal of developmental biology*. 2000; 44 (6): 725-731.

Tian, H., McKnight, S. L., & Russell, D. W. Endothelial pas domain protein 1 (epas1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & development*. 1997; 11 (1): 72-82.

Tossetta, G., Avellini, C., Licini, C., Giannubilo, S. R., Castellucci, M., & Marzioni, D. High temperature requirement a1 and fibronectin: Two possible players in placental tissue remodelling. *European journal of histochemistry : EJH*. 2016; 60 (4): 2724.

Umbhauer, M., Marshall, C. J., Mason, C. S., Old, R. W., & Smith, J. C. Mesoderm induction in xenopus caused by activation of map kinase. *Nature*. 1995; 376 (6535): 58-62.

Uzun, H., Konukoglu, D., Albayrak, M., Benian, A., Madazli, R., Aydin, S., Uludag, S. Increased maternal serum and cord blood fibronectin concentrations in preeclampsia are associated with higher placental hyaluronic acid and hydroxyproline content. *Hypertension in pregnancy*. 2010; 29 (2): 153-162.

Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y. M., Karumanchi, S. A. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature medicine*. 2006; 12 (6): 642-649.

Votteler, M., Kluger, P. J., Walles, H., & Schenke-Layland, K. Stem cell microenvironments--unveiling the secret of how stem cell fate is defined. *Macromolecular bioscience*. 2010; 10 (11): 1302-1315.

Waldenstrom, U., Engstrom, A. B., Hellberg, D., & Nilsson, S. Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertility and sterility*. 2009; 91 (6): 2461-2465.

Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-pas heterodimer regulated by cellular o2 tension. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995; 92 (12): 5510-5514.

Wang, H., Li, Q., Shao, L., & Zhu, C. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, -14, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, -2, -3 in the endometrium and placenta of rhesus monkey (*macaca mulatta*) during early pregnancy. *Biology of reproduction*. 2001; 65 (1): 31-40.

Wang, H., Wen, Y., Mooney, S., Li, H., Behr, B., & Polan, M. L. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression in human preimplantation embryos. *Fertility and sterility*. 2003; 80 Suppl 2: 736-742.

Wang, Y., Cheng, K., Zhou, W., Liu, H., Yang, T., Hou, P., & Li, X. Mir-141-5p regulate atf2 via effecting mapk1/erk2 signaling to promote preeclampsia. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2019; 115: 108953.

Wartiovaara, J., Leivo, I., & Vaheri, A. Expression of the cell surface-associated glycoprotein, fibronectin, in the early mouse embryo. *Developmental biology*. 1979; 69 (1): 247-257.

Watt, F. M., & Driskell, R. R. The therapeutic potential of stem cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 2010; 365 (1537): 155-163.

Wewer, U. M., Faber, M., Liotta, L. A., & Albrechtsen, R. Immunochemical and ultrastructural assessment of the nature of the pericellular basement membrane of human decidual cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1985; 53 (6): 624-633.

Wilson, C., Nikitenko, L. L., Sargent, I. L., & Rees, M. C. Adrenomedullin: Multiple functions in human pregnancy. *Angiogenesis*. 2004; 7 (3): 203-212.

Wu, Y., Han, M., & Guan, K. L. Mek-2, a *caenorhabditis elegans* map kinase kinase, functions in ras-mediated vulval induction and other developmental events. *Genes & development*. 1995; 9 (6): 742-755.

Xia, J., Qiao, F., Su, F., & Liu, H. Implication of expression of osteopontin and its receptor integrin $\alpha 3 \beta 1$ in the placenta in the development of preeclampsia. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Huazhong keji daxue xuebao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban.* 2009; 29 (6): 755-760.

Xu, P., Wang, Y. L., Zhu, S. J., Luo, S. Y., Piao, Y. S., & Zhuang, L. Z. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14, tissue inhibitors of metalloproteinase-1, and matrix proteins in human placenta during the first trimester. *Biology of reproduction.* 2000; 62 (4): 988-994.

Yamada, T., Isemura, M., Yamaguchi, Y., Munakata, H., Hayashi, N., & Kyogoku, M. Immunohistochemical localization of fibronectin in the human placentas at their different stages of maturation. *Histochemistry.* 1987; 86 (6): 579-584.

Zamudio, S. High-altitude hypoxia and preeclampsia. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 2007; 12: 2967-2977.

Zamudio, S., Wu, Y., Ietta, F., Rolfo, A., Cross, A., Wheeler, T., Caniggia, I. Human placental hypoxia-inducible factor-1 α expression correlates with clinical outcomes in chronic hypoxia in vivo. *The American journal of pathology.* 2007; 170 (6): 2171-2179.

Zhang, X., Green, K. E., Yallampalli, C., & Dong, Y. L. Adrenomedullin enhances invasion by trophoblast cell lines. *Biology of reproduction.* 2005; 73 (4): 619-626.

Zhou, S., Xie, Y., Puscheck, E. E., & Rappolee, D. A. Oxygen levels that optimize tsc culture are identified by maximizing growth rates and minimizing stress. *Placenta.* 2011; 32 (6): 475-481.

Zhou, Y., Damsky, C. H., Chiu, K., Roberts, J. M., & Fisher, S. J. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *The Journal of clinical investigation.* 1993; 91 (3): 950-960.

Zhou, Y., Damsky, C. H., & Fisher, S. J. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *The Journal of clinical investigation*. 1997; 99 (9): 2152-2164.

Zhou, Y., Fisher, S. J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M., & Damsky, C. H. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *The Journal of clinical investigation*. 1997; 99 (9): 2139-2151.

Zhou, Y., McMaster, M., Woo, K., Janatpour, M., Perry, J., Karpanen, T., Fisher, S. J. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *The American journal of pathology*. 2002; 160 (4): 1405-1423.

Zhou, Y., Yuge, A., Rajah, A. M., Unek, G., Rinaudo, P. F., & Maltepe, E. Limk1 regulates human trophoblast invasion/differentiation and is down-regulated in preeclampsia. *The American journal of pathology*. 2014; 184 (12): 3321-3331.

Zhu, C., Yu, J., Pan, Q., Yang, J., Hao, G., Wang, Y., Cao, H. Hypoxia-inducible factor-2 alpha promotes the proliferation of human placenta-derived mesenchymal stem cells through the mapk/erk signaling pathway. *Scientific reports*. 2016; 6: 35489.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gözde	Uyruğu	T.C.
Soyadı	ÜNEK	Tel no	05327441181
Doğum tarihi	11.11.1982	e-posta	gozdeunek@yahoo.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Özel Mahmut Celal Ünal Fen Lisesi, Antalya	2000
Lisans (hazırlık)	İstanbul Teknik Üniversitesi – İngilizce hazırlık	2001
Lisans	İstanbul Teknik Üniversitesi – Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2006
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi – Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Üreme Biyolojisi Programı	2010
Doktora	Akdeniz Üniversitesi – Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora	2019

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2010-2016

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	ÜDS	85

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Sıçanlarda fokal serebral iskemik hasarların trofoblast kök hücreleri ile onarımı	TÜBİTAK 1001 Projesi, Proje no:114S547	01.02.2015-01.02.2018
Plasentada ekstrasellüler matriks kompozisyonu tarafından HIF'in aktivasyonu	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP), Proje No: 2013.03.0122.005	08.10.2013-08.10.2016
Gebelik esnasında Glukokortikoid kullanımının plasental ve embriyonal anjiogenez	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP), Proje No: 2009.01.0103.004	30.04.2009-12.07.2013

mekanizmalarına etkisi.		
Normal ve patolojik plasentalarda hücre siklusu proteinlerinden PCNA, Ki67, siklin D3, p27 ve p57 nin immunohistokimyasal dağılımı.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP), Proje No: 2008.02.0122.008	28.10.2009-28.10.2010

Burslar-Ödüller:

1. 2214-A TÜBİTAK-BİDEB Yurt Dışı Doktora Araştırma Bursu, 2013.
2. Avrupa Komisyonu Eğitim ve Staj (European Commission Education & Training) hareketliliği, ERASMUS (European Community Action Scheme for the Mobility of University Students) bursu, Temmuz- Eylül 2012.

Yayınlar ve Bildiriler:

Yayınlar:

1. Cetinkaya B, **Unek G**, Kipmen-Korgun D, Koksoy S, Korgun ET. Effects of Human Placental Amnion Derived Mesenchymal Stem Cells on Proliferation and Apoptosis Mechanisms in Chronic Kidney Disease in the Rat. Int J Stem Cells. 2019 Mar 30;12(1):151-161. doi: 10.15283/ijsc18067. PubMed PMID: 30595007; PubMed Central PMCID: PMC6457703.
2. Ozmen A, **Unek G**, Korgun ET. Effect of glucocorticoids on mechanisms of placental angiogenesis. Placenta. 2017 Apr;52:41-48. doi: 10.1016/j.placenta.2017.02.015. Epub 2017 Feb 17. Review. PubMed PMID: 28454696.
3. **Unek G**, Ozmen A, Isenlik BS, Korgun ET. The proliferation mechanism of normal and pathological human placentas. Histol Histopathol. 2017 Apr;32(4):339-349. doi: 10.14670/HH-11-832. Epub 2016 Sep 26. Review. PubMed PMID: 27665761.
4. Ozmen A, **Unek G**, Kipmen-Korgun D, Mendilcioglu I, Sanhal C, Sakıncı M, Korgun ET. Glucocorticoid effects on angiogenesis are associated with mTOR pathway activity. Biotech Histochem. 2016;91(4):296-306. doi: 10.3109/10520295.2016.1161234. Epub 2016 Mar 23. PubMed PMID: 27007885.
5. Ozmen A, **Unek G**, Kipmen-Korgun D, Cetinkaya B, Avcil Z, Korgun ET. Glucocorticoid exposure altered angiogenic factor expression via Akt/mTOR

- pathway in rat placenta. *Ann Anat.* 2015 Mar;198:34-40. doi: 10.1016/j.aanat.2014.10.007. Epub 2014 Nov 12. PubMed PMID: 25479925
6. Zhou Y, Yuge A, Rajah AM, **Unek G**, Rinaudo PF, Maltepe E. LIMK1 regulates human trophoblast invasion/differentiation and is down-regulated in preeclampsia. *Am J Pathol.* 2014 Dec;184(12):3321-31. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.08.013. Epub 2014 Oct 13. PubMed PMID: 25307528; PubMed Central PMCID: PMC4258498.
 7. **Unek G**, Ozmen A, Mendilcioglu I, Simsek M, Korgun ET. The expression of cell cycle related proteins PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and preeclamptic human placentas. *Tissue Cell.* 2014 Jun;46(3):198-205. doi: 10.1016/j.tice.2014.04.003. Epub 2014 Apr 26. PubMed PMID: 24852133.
 8. Ozmen A, **Unek G**, Kipmen-Korgun D, Korgun ET. The PI3K/Akt and MAPK-ERK1/2 pathways are altered in STZ induced diabetic rat placentas. *Histol Histopathol.* 2014 Jun;29(6):743-56. doi: 10.14670/HH-29.743. Epub 2013 Dec 18. PubMed PMID: 24346807.
 9. **Unek G**, Ozmen A, Ozekinci M, Sakinci M, Korgun ET. Immunolocalization of cell cycle proteins (p57, p27, cyclin D3, PCNA and Ki67) in intrauterine growth retardation (IUGR) and normal human term placentas. *Acta Histochem.* 2014 Apr;116(3):493-502. doi: 10.1016/j.acthis.2013.10.007. Epub 2013 Nov 16. PubMed PMID: 24252562.
 10. **Unek G**, Ozmen A, Mendilcioglu I, Simsek M, Korgun ET. Immunohistochemical distribution of cell cycle proteins p27, p57, cyclin D3, PCNA and Ki67 in normal and diabetic human placentas. *J Mol Histol.* 2014 Feb;45(1):21-34. doi: 10.1007/s10735-013-9534-3. Epub 2013 Aug 21. PubMed PMID: 23963898.
 11. Kipmen-Korgun D, Ozmen A, **Unek G**, Simsek M, Demir R, Korgun ET. Triamcinolone up-regulates GLUT 1 and GLUT 3 expression in cultured human placental endothelial cells. *Cell Biochem Funct.* 2012 Jan;30(1):47-53. doi: 10.1002/cbf.1817. Epub 2011 Oct 10. PubMed PMID: 21987433.
 12. **Unek G**, Ozmen A, Kipmen-Korgun D, Korgun ET. Immunolocalization of PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and dexamethasone-induced intrauterine growth restriction placental development in rat. *Acta Histochem.* 2012 Jan;114(1):31-40. doi: 10.1016/j.acthis.2011.02.002. Epub 2011 Mar 2. PubMed PMID: 21371741.

13. Korgun ET, **Unek G**, Herrera E, Jones CJ, Wadsack C, Kipmen-Korgun D, Desoye G. Mapping of CIP/KIP inhibitors, G1 cyclins D1, D3, E and p53 proteins in the rat term placenta. *Histochem Cell Biol.* 2011 Sep;136(3):267-78. doi: 10.1007/s00418-011-0841-z. Epub 2011 Jul 26. PubMed PMID: 21789682.
14. Korgun ET, Acar N, Sati L, Kipmen-Korgun D, Ozen A, **Unek G**, Ustunel I, Demir R. Expression of glucocorticoid receptor and glucose transporter-1 during placental development in the diabetic rat. *Folia Histochem Cytobiol.* 2011;49(2):325-34. PubMed PMID: 21744335.
15. Ozmen A, **Unek G**, Kipmen-Korgun D, Korgun ET. The expression of Akt and ERK1/2 proteins decreased in dexamethasone-induced intrauterine growth restricted rat placental development. *J Mol Histol.* 2011 Jun;42(3):237-49. doi: 10.1007/s10735-011-9328-4. Epub 2011 Apr 23. PubMed PMID: 21512721.
16. Sati L, Seval-Celik Y, **Unek G**, Korgun ET, Demir R. The presence of kinesin superfamily motor proteins KIFC1 and KIF17 in normal and pathological human placenta. *Placenta.* 2009 Oct;30(10):848-54. doi: 10.1016/j.placenta.2009.07.005. Epub 2009 Aug 12. PubMed PMID: 19679349.

Kitap Yayınları:

Korgun ET, Ozmen A, **Unek G**, Mendilcioglu I. (2012). The effects of glucocorticoids on fetal and placental development. pp. 305-336. In Xiaoxiao Qian (editor), *Glucocorticoids - New Recognition of Our Familiar Friend*. Intech, Croatia, ISBN 980-953-307-128-7.

Bildiriler:

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings)

Basılan Bildiriler:

1. Kipmen-Korgun D, **Unek G**, Cetinkaya B, Dogru S, Dogum K, Molbay M. Glucose transporter proteins in the human amnion derived mesenchymal stem cells. *The Febs Journal* 283, 301-301, 2016.
2. Dogru S, **Unek G**, Koksoy S, Kipmen-Korgun D, Korgun ET. Proliferation in the human amnion derived mesenchymal stem cells under hyperglycemic conditions. *The Febs Journal* 283, 305-305, 2016.

3. Cetinkaya B, Ozmen A, **Unek G**, Bulbul G, Korgun ET. Expressions of VEGF, VEGFR1, VEGFR2 and Akt in pregestational diabetic human placentas. *Placenta* 9 (35), A31, 2014.
4. Kipmen-Korgun D, Erdogan A, Avcil Z, **Unek G**, Ozmen A, Korgun ET. The role of adiponectin in dexamethasone induced intrauterin growth restricted rat placental development. *The Febs Journal* 281, 180, 2014.
5. Korgun ET, Ozmen A, **Unek G**, Kipmen-Korgun D, Avcil Z, Mendilcioglu I. Adverse glucocorticoid effect on angiogenesis is associated with Akt/mTOR pathway in vitro. *The Febs Journal* 281, 317, 2014.
6. Ozmen A, Cetinkaya B, **Unek G**, Sanhal C, Mendilcioglu I, Korgun ET. Hyperglycemia affects angiogenesis by means of mTOR pathway. *Placenta* 9 (35), A17, 2014.
7. **Unek G**, Ozmen A, Mendilcioglu I, Simsek M, Korgun E. Expression and immunohistochemical distribution of mitogen-activated protein kinases in normal and pathological placental tissues. *The Febs Journal* 280 (1), 2013.
8. Korgun E, Ozmen A, **Unek G**, Sati L, Demir R. Expression of Sox2 and Oct4 in normal and diabetic human term placentas. *The Febs Journal* 280 (1), 2013.
9. **Unek G**, Ozmen A, Simsek M, Mendilcioglu I, Korgun ET. Immunohistochemical distribution of cell cycle proteins PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and preeclamptic placentas. *Placenta* Vol. 32(9):A82, 2011.
10. Korgun ET, **Unek G**, Ozmen A, Kipmen-Korgun D. Immunolocalization of PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and dexamethasone-induced intrauterine growth restriction placental development in rat. *FEBS Journal* Vol. 278(1):SI, 2011.
11. Ozmen A, **Unek G**, Kipmen-Korgun D, Korgun ET. The expression of Akt and Erk1/2 proteins decreased in intrauterine growth restricted rat placental development. *Placenta* Vol. 32(9):A99, 2011.
12. Kipmen-Korgun D, Ozmen A, **Unek G**, Simsek M, Korgun ET. Effects of high-glucose conditions in angiogenesis of human placental endothelial cells. *FEBS Journal* Vol. 181(1):SI, 2011.

13. Korgun ET, Kipmen-Korgun D, Ozen A, **Ünek G**, Simsek M, Demir R. The effect of glucocorticoid on glucose transporters in human placental endothelial cells. Placenta Vol. 29(8):A70, 2008.

Ulusal Bildiriler:

1. Özmen A, Çetinkaya B, Katırcı E, **Ünek G**, Molbay M, Korgun DK, Korgun ET. Gebelik Sürecinde Diyabetik Sıçan Plasentalarında mTOR Sinyal Yolağının Anjiyogenez Mekanizmasına Etkisi. Uluslararası Katılımlı XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan- 3 Mayıs 2016, İzmir, Türkiye.
2. **Ünek G**, Özmen A, Mendilcioğlu İ, Şimşek M, Korgun ET. Normal ve Preeklampitik Plasentalarda Hücre Siklusu Proteinlerinin immünohistokimyasal Dağılımı. XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 16-19 Mayıs 2012, Denizli, Türkiye.
3. Özmen A, **Ünek G**, Korgun DK, Avcil Z, Erdoğan A, Mendilcioğlu İ, Korgun ET. Glukokortikoidlerin plasentada anjiogenez mekanizmasına etkisi. XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 16-19 Mayıs 2012, Denizli, Türkiye.
4. Özmen A, **Ünek G**, Korgun DK, Korgun ET. Normal ve diyabetik sıçan plasenta gelişiminde Akt ve ERK1/2 proteinlerinin rolü. XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 16-19 Mayıs 2012, Denizli, Türkiye.
5. **Ünek G**, Özmen A. Normal ve patolojik plasentalarda hücre siklusu proteinlerinden PCNA, Ki67, p27 ve p57'nin immünohistokimyasal dağılımı. X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 17-20 Mayıs 2010, İzmir, Türkiye.
6. Özmen A, **Ünek G**, Korgun ET. Normal ve intrauterin büyüme geriliği oluşturulmuş sıçanların plasental gelişiminde PCNA, Ki67, Siklin D3, p27 ve p57 proteinlerinin immünohistokimyasal lokalizasyonları. IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 20-23 Mayıs 2008, Adana, Türkiye.