

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**NORMAL VE DEKSAMETAZON VERİLEN SIÇAN
PLASENTASINDA HÜCRE SIKLUSU
PROTEİNLERİNDEN SİKLİN-E, PCNA VE P27' NİN
DAĞILIMI**

Hakan ER

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2007

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**NORMAL VE DEKSAMETAZON VERİLEN SIÇAN
PLASENTASINDA HÜCRE SİKLUSU
PROTEİNLERİNDEN SİKLİN-E, PCNA VE P27' NİN
DAĞILIMI**

Hakan ER

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Mevlüt ASAR**

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2005.02.0122.003)

“ Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir.”

Antalya, 2007

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.
...../...../.....

Tez danışmanı: Prof. Dr. Mevlüt ASAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Ramazan DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. İnanç MENDİLCİOğLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Emin Türkay KORGUN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye: Yrd. Doç. Dr. Çiler ÇELİK-ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

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

Prof. Dr. Nurettin OğUZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Prenatal devrede fetüsün gelişmesinde, özellikle hücrel olgunlaşma ve differensiyasyon olaylarında, glukokortikoidler oldukça önemlidir. Günümüzde glukokortikoidlerin antiproliferatif etkileriyle de IUGR' ne neden olduğu bilinmektedir. Ancak bu etkilerini G1 fazı üzerinden yapıp yapmadıkları hakkında henüz bir çalışma yoktur.

Bu çalışmada, bir glukokortikoid olan deksametazonun plasental gelişmede G1 fazı proteinleri olan siklin-E, PCNA ve inhibitör özellikli p27 üzerindeki etkilerini immunohistokimyasal ve TEM teknikleriyle, ayrıca bir apoptoz belirteci olan TUNEL metodu ile belirlemeye çalıştık. Bunun için gebe sıçanlardan kontrol (8 dişi) ve deney (8 dişi) olmak üzere iki grup oluşturduk.

Sıçanlarda deksametazonla IUGR oluşturulmasında gebeliğin 13.gününde deney grubundan her hayvana 100µg, 14–19. günler arasında 200µg/kg deksametazon asetat, kontrol hayvanlarına ise 13–19. günler arasında serum fizyolojik subkutan olarak verildi. Gebeliğin 20. gününde eter anestezisi altında kontrol ve deney hayvanlarından glukokortikoid ölçümü için kan örnekleri alındı. Bunu takiben, hayvanlar dişeke edilerek toplanan plasentaları ve fetüsleri tartıldı. Kontrol ve deney hayvanı plasentalarından ışık mikroskopi için alınan örnekler Holland fiksatifinde, transmisyon elektron mikroskopi için alınan örnekler %4' lük glutraldehitte ve %1' lik OsO₄' te tesbit edildi ve rutin histolojik takip işlemlerinden geçirildi. Hazırlanan bloklardan alınan kesitlerde siklin-E, PCNA ve p27 antikorlarının immünboyanma yoğunluklarına, ayrıca pozitif hücre sıklığı HSCORE değerlerine bakıldı, TUNEL pozitif hücreler belirlendi. TEM' de ince yapı değişiklikleri belirlenmeye çalışıldı.

Deksametazonun sıçan plasentasında ve embriyosunda önemlilik düzeyinde ağırlık kaybına neden olduğu görüldü (p<0,005). PCNA immünboyanma yoğunlukları labirent kısmında ve bağlantı zonununda azalmıştı. Trofoblast dev hücrelerinde PCNA boyanması azdı. PCNA' nın aksine bütün hücrelerde p27 boyanma yoğunluğu artmıştı. Ancak siklin-E immünboyanması gerçekleştirilemedi. TEM' de de apoptotik hücreler gözlemlendi.

Sonuçta, bir glukokortikoid olan deksametazonun sıçan plasentasında G1 fazı proteinlerinden PCNA' nın dağılımını azalttığı, p27 dağılımını ise artırdığı ve bu yolla hücre siklusu üzerinde antiproliferatif bir etkide bulunduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: IUGR, plasenta, sıçan, siklin-E, PCNA, p27, immunohistokimya, TUNEL, TEM

ABSTRACT

During the growth of fetus in prenatal life glucocorticoids are very important, especially in cell maturation and differentiation events. Today it is known that glucocorticoids lead to IUGR by antiproliferative effects. However, there is not any study that determined whether glucocorticoids do these effects during G1 phase.

In this project, we aimed to define the effects of dexamethasone -a glucocorticoid- on G1 phase proteins such as cyclin-E, PCNA and p27 during placental development by immunohistochemical, TUNEL techniques and transmission electron microscopy. We composed two groups of pregnant rats; control (8 female) and experiment (8 female).

In order to compose IUGR on rats via dexamethasone, every pregnant rat in experiment group was injected 100µg of dexamethasone acetate subcutaneously on the 13th day of pregnancy and 200µg between 14th-19th days of gestation. Between the 13th-19th days of gestation vehicle was applied to control rats. On the 20th day of gestation blood samples were taken from rats under ether anesthesia in order to measure plasma glucocorticoid levels. Then dissected placentas and fetuses were weighed. Placentas which were obtained for light microscopy were fixed in Holland fixative. Electron microscopic samples were fixed in 4% glutaraldehyde and following in 1% O_3O_4 . Additionally rutin histological tissue preparing processes were applied to the samples.

On sections obtained from prepared blocks immunostaining densities of cyclin-E, PCNA, p27 antibodies and positive stained cell frequency - HSCORE levels- were examined. TUNEL positive cells were determined. Besides ultrastructural changes were tried to be determined by electron microscope.

It was determined that dexamethasone leads to statistically significant weight loss on rat placenta and fetus ($p < 0,005$). Immunostaining density of PCNA decreased in labyrinth and junctional zone. There was a decrease in PCNA staining of trophoblast giant cells. In contrary to PCNA, p27 staining increased in all of the cells. However cyclin-E immunostaining could not carried out. Also apoptotic cells were observed by TEM.

In conclusion, dexamethasone has decreased the expression of PCNA but increased p27 expression on rat placenta. Thus it creates an antiproliferative effect on cell cycle.

Key words: IUGR, placenta, rat, cyclin-E, PCNA, p27, immunohistochemistry, TUNEL, TEM

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması, projelendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde önemli katkıları bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Mevlüt ASAR' a,

Tezimin gerçekleşmesi için her türlü imkân ve desteği sağlayan hocam sayın Prof. Dr. Ramazan DEMİR'e,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her aşamada bana destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Doç. Dr. Emin T. KORGUN' a, Yrd. Doç. Dr. Çiler ÇELİK-ÖZENCİ' ye, Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL' e, araştırma görevlileri ve çalışanlarına,

TEMGA Ünitesi bünyesinde yapılan çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen TEMGA Ünitesi Başkanı Doç.Dr. Necdet DEMİR'e ve Arife DEMİRTOP' a,

Katkılarından dolayı Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı' ndan Doç. Dr. İnanç MENDİLCİOĞLU' na,

Deney hayvanları laboratuvarındaki çalışmalarımda bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen laboratuvarın bütün çalışanlarına,

Yardımları ile her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli elemanlarına,

Son olarak bu çalışmanın gerçekleştirilmesi esnasında her zaman yanımda olan sevgili eşim Songül'e, oğlum Mehmet Efe' ye, sevgili anneme, sevgili babama –eminim tezimi görseydi çok mutlu olacaktı-, ağabeyime, kardeşlerime, bütün aileme ve dostlarıma, en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	Sayfa
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi

GİRİŞ ve AMAÇ

1.1.	Hipotezin Temeli ve Amaç	1
------	--------------------------	---

GENEL BİLGİLER

2.1.	Plasenta	4
2.2.	Plasenta Çeşitleri	4
2.3.	Sıçan Embriyosunun Gelişmesi ve Koryoallantoik Plasenta	6
2.3.1.	Sıçan Embriyolojisi	6
2.3.2.	İmplantasyon	7
2.3.3.	Plasentalar	8
2.3.3.1.	Koryoallantoik Plasenta	8
2.3.3.2.	Yolk Sak Plasenta	10
2.4.	Kemirgen Plasentasının Gelişmesi ve Yapısı İnsaninkine Çok Benzer	13
2.4.1.	Plasental Hücreler	13
2.4.2.	İnsan Fetal Plasentası ve Kemirgen Labirenti	14
2.4.3.	İnsan ve Farede Definitif Plasentanın Hemotrofik Değişiminin Başlaması	14
2.4.4.	İnsan Bazal Plağı Ve Kemirgen Bağlantı Zonu	15
2.4.5.	İnsan Plasental Yatağı ve Kemirgen Desidua Bazalisi	15
2.4.6.	Fare ve İnsanda Trofoblast Dev Hücreleri	16
2.5.	Hücre Döngüsü ve Siklinler	17
2.5.1.	Hücre Döngüsü Kontrol Sistemi	18
2.5.2.	Hücre Döngüsü Konrol Sisteminde Siklik Proteoliz	21
2.5.3.	Hücre Döngüsü Olaylarının İntraselüler Kontrolü	23
2.6.	Siklin-E, PCNA ve p27 Üç Önemli Hücre Siklusu Regülatör Proteinidir	25
2.6.1.	Siklin-E	25

2.6.2.	PCNA	26
2.6.3.	p27	26
2.7.	Glukokortikoidler	27
2.8.	Intrauterin Büyüme Geriliği ve Apoptoz	31

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.	Denekler	33
3.2.	IUGR Modelinin Oluşturulması	33
3.3.	Doku Temini ve Hazırlanması	33
3.4.	Işık Mikroskopu Çalışma Protokolü	33
3.5.	İmmunohistokimyasal Protokol	34
3.6.	TUNEL protokolü	35
3.7.	TEM Çalışma Protokolü	35

BULGULAR

4.1.	Glukokortikoid konsantrasyonu ölçümü, plasenta ve embriyo ağırlıkları ile fetüs sayısı	36
4.2.	Işık Mikroskopik Bulgular	38
4.3.	İmmunohistokimyasal Bulgular	41
4.3.1.	PCNA İmmünboyanması	41
4.3.2.	P27 İmmünboyanması	43
4.4.	TUNEL Boyanması	45
4.5.	TEM Bulguları	47

TARTIŞMA	48
-----------------	-----------

SONUÇLAR	52
-----------------	-----------

KAYNAKLAR	53
------------------	-----------

ÖZGEÇMİŞ	64
-----------------	-----------

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACTH	:	Adreno kortikotropik hormon
AEC	:	Amino etil karbozol kromojeni
AGA	:	Gebelik yaşına göre normal
APC	:	Anafaz ilerletici kompleks
BZ	:	Bağlantı zonu
CAK	:	Siklin bağımlı kinaz aktive edici kinaz
Cdc	:	Fosfataz
CDK	:	Siklin bağımlı kinaz
CKI	:	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
CIP/KIP	:	Siklin bağımlı kinaz inhibitör ailesi
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
E2F	:	Gen düzenleyici
Gadd45	:	Büyüme durması ve DNA hasarı ile ilgili bir protein
GC	:	Glukokortikoid
GR	:	Glukokortikoid reseptörü
G0	:	Hücre siklusunun G0 fazı
G1	:	Hücre siklusunun G1 fazı
G2	:	Hücre siklusunun G2 fazı
GLUT1	:	Glikoz taşıyıcı molekül 1
GLUT3	:	Glikoz taşıyıcı molekül 3
GTPaz	:	GTP' yi GDP' ye dönüştüren molekül
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
HRP	:	Bir çeşit peroksidaz enzimi
HSCORE	:	Histolojik skorlama
IGF	:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IUGR	:	İntrauterin büyüme geriliği
ITP	:	İmmün idyopatik trombositopenik purpura
kDa	:	Kilo dalton
LAB	:	Labirent
LGA	:	Gebelik yaşına göre büyük

LSAB	:	Streptavidin biyotin işaretli
M	:	Hücre siklusunun mitoz safhası
MD	:	Maternal desidua
MMP	:	Matriks metallo proteinaz
MR	:	Mineralokortikoid reseptörü
MyD118	:	Negatif büyümede rolü olan bir protein
NLS	:	Nükleer lokalizasyon sinyali
ORC	:	Orijin tanıma kompleksi
O₂	:	Oksijen
CO₂	:	Karbondioksit
PBS	:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCNA	:	Prolifere olan hücre nükleer antijeni
pH	:	Asit/bazlık derecesi
pRb	:	Retinablastoma proteini
p53	:	Hücre döngüsü inhibitörü
P57	:	Hücre döngüsü inhibitörü
P21	:	Hücre döngüsü inhibitörü
P27	:	Hücre döngüsü inhibitörü
RhoA	:	Küçük GTPaz' ların bir üyesi
S	:	Hücre siklusunun sentez fazı
SGA	:	Gebelik yaşına göre küçük
SF	:	Serum fizyolojik
Siklin-E	:	Hücre döngüsü proliferasyon belirteci
Sp	:	Transkripsiyon faktörü
TEM	:	Transmisyon elektron mikroskobu
TUNEL	:	Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling (Apoptoz belirleme tekniği)
uNK	:	Uterus doğal öldürücü hücreleri
VEGF	:	Damar endotel büyüme faktörü
Wee1	:	M-Cdk inhibitörü
11 beta HSD-1:	:	11 beta hidroksisteroid dehidrogenaz-1
11 beta HSD-2:	:	11 beta hidroksisteroid dehidrogenaz-2

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.2.1.	Hemomonokoryal ve hemotrikoryal tip plasentalar	5
2.3.1.1.	Sıçan plasenta gelişiminin erken safhaları	7
2.3.3.1.1.	Sıçan plasentasının gelişimi	9
2.3.3.1.2.	Sıçanda plasental gelişim	10
2.3.3.2.1.	Termde sıçan plasentasının genel görünümü	12
2.3.3.2.2.	Gebeliğin geç dönemlerinde sıçan uteroplasental yapısı	12
2.3.3.2.3.	Labirent trofoblast hücreleri	13
2.4.6.1.	İnsan ve sıçan plasentalarının karşılaştırması	17
2.5.1.	Hücre döngüsü	18
2.5.2.	Hücre döngüsü kontrolü	18
2.5.1.1.	Hücre döngüsü kontrol sistemi	19
2.5.1.2.	Hücre döngüsü kontrol sistemi	19
2.5.1.3.	Cdk aktivasyonunu	21
2.5.1.4.	Cdk aktivitesinin baskılanması	21
2.5.2.1.	Siklin-Cdk kompleksinin bir CKI tarafından inhibisyonu	22
2.5.2.2.	Hücre döngüsü boyunca proteolizin kontrolü	22
2.5.3.1.	M-Cdk aktivasyonunu	24
4.1.1.	Kontrol grubu hayvanlarının plazma glukokortikoid konsantrasyonu değişimi	36
4.1.2.	Deney grubu hayvanlarının plazma glukokortikoid konsantrasyonu değişimi	37
4.1.3.	Kontrol ve deney grubuna ait ortalama sıçan plasentasısı ağırlıkları	37
4.1.4.	Kontrol ve deney grubuna ait ortalama sıçan embriyosu ağırlıkları	37
4.1.5.	Kontrol ve deney grubuna ait ortalama sıçan fetüsü sayısı	38
4.2.1.	Kontrol ve deney grubu plasentalarının bütün görünümü	39

4.2.2.	Kontrol ve deney grubu plasentalarının bağlantı ve labirent zonunun Hematoksilen Eozin boyanması	40
4.3.1.1.	Kontrol ve deney grubu plasentalarının PCNA immünboyanmaları	42
4.3.1.2.	Kontrol ve deney grubu plasentalarında PCNA pozitif hücre sıklığı HSCORE değerleri	43
4.3.2.1.	Kontrol ve deney grubu plasentalarının p27 immünboyanmaları	44
4.3.2.2.	Kontrol ve deney grubu plasentalarında PCNA pozitif hücre sıklığı HSCORE değerleri	44
4.4.1.	Kontrol ve deney grubu plasentalarının TUNEL boyanmaları	46
4.4.2.	Kontrol ve deney grubu plasentalarında TUNEL pozitif hücre yüzdesi HSCORE değerleri	46
4.5.1.	Kontrol ve deney grubu plasentalarının bağlantı zonu (bz) ve labirent kısımlarının (lab) elektron mikrografları.	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo		Sayfa
2.5.1.1.	Omurgalı ve maya hücre siklusu evrelerinde aktivite gösteren siklin-cdk kompleksleri	20
4.1.	Kontrol ve deney grubu sıçan plasentasında PCNA ve p27 immünboyanmalarının hücresel dağılımı	45
4.2.	Kontrol ve deney grubu sıçan plasentasında PCNA ve p27 pozitif hücre sıklığı HSCORE değerleri	45

GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

İntrauterin büyüme geriliği (IUGR) çalışmaları, klinisyenlerin doğum ağırlığı ve hamilelik dönemine göre fetüsleri gebelik yaşına göre küçük, normal ve büyük (sırasıyla SGA, AGA ve LGA) olarak sınıflandırmalarıyla başlar. Her doğum ağırlığı-hamilelik dönemi arasında da hastalıklar ve ölüm oranları bakımından farklar vardır[1]. Gebelik yaşı küçük (SGA) fetüslerde, yüksek ölüm oranına ek olarak hipoglisemi, hipotermi, polisitemi ve nöral gelişim eksiklikleri gözlenir[2]. Prenatal tanı ile doğumda IUGR gösteren fetüslerde normale göre daha farklı bir gelişim mekanizmasının olabileceği düşünülmektedir. Örneğin bunlarda, normale göre fetal büyüme %10 daha azdır. Genetik anomali gösteren ya da özellikle ilk trimesterde enfeksiyonlarla karşı karşıya kalan fetüslerin büyümesi yavaştır. Bu fetüslerin pek çoğu hamilelik devam ettiği devrede IUGR gösterirler. Normal gelişmekte olan fetüslerde 3. trimesterde maternal ve plasental besin transportu yetersizliğinde normalden daha az gelişme gösterirler. Bu fetüslerin boylarından ya da kafa çevrelerinden ziyade kiloları normale göre daha azdır. Bu nedenlerle doğumda gözlenen küçük boy ve az kilo, artık günümüzde iç ya da dış faktörlere bağlı olarak oluşan fetal IUGR olarak kabul edilmektedir.

Chard'a [2] göre; konjenital enfeksiyon, preeklampsi, ileri derecede maternal eksik beslenme ve eksik plasental gelişme IUGR' ne neden olabilmektedir. Bununla beraber Chard [3], IUGR özellikle patolojiye bağlı olarak geliştiğinde bunun da normal fetal büyüme geriliği olarak tanımlanabileceğini ifade etmiştir.

IUGR her ne kadar fetal, neonatal ve postnatal gelişme dönemlerinde negatif sonuçlar doğursa da bu şekildeki adaptasyon şekliyle fizyolojik bir olay olarak kabul edildiğinden gebe kadınlarda IUGR' nin belirlenmesi klinik açıdan oldukça önemlidir. Chard ve ark.[3], normalden daha küçük olan fetüslerden pek çoğunun oldukça normal ve sağlıklı olduğuna işaret eden çalışmalarıyla IUGR üzerindeki tartışmaya odaklanmıştır. Bu nedenle gelecekteki görüntüleme, teşhis ve tedavi çalışmaları fetüslerin boyutlarından ziyade patofizyolojilerinin tanımlanmasına yönelik olacaktır.

Fetüsün gelişmesinde, özellikle hücresel olgunlaşma ve differensiyasyon olaylarında glukokortikoidler oldukça önemlidir. Prenatal hayatta fetüs glukokortikoid gereksinimi için anneye bağımlıdır. Maternal plazma glukokortikoid miktarına göre, fetal plazma glukokortikoid miktarı 20 kat daha düşüktür. Bunun nedeni, plasentada mevcut olan materno-fetal glukokortikoid konsantrasyon gradiyentidir. Materno-fetal glukokortikoid konsantrasyon gradiyenti, öncelikle 11beta-HSD-2 tarafından düzenlenir. 11beta-HSD-2, maternal glukokortikoidleri inaktive eder. Bu şekilde fetüsün aşırı miktarda glukokortikoid ile karşı karşıya gelmesi önlenmiş olur[4].

Prenatal hayatta aşırı miktarda glukokortikoid ile yüklenen fetüslerde intrauterin büyüme geriliği(IUGR), postnatal yaşamlarında hipertansiyon [5] ve diabetes mellitus [6] gibi birçok komplikasyonlar görülür[7-9].

Günümüzde kortikosteroidler; immün idiyopatik trombositopenik purpurada (ITP), eritrosit parçalanması sonucu karaciğer enzimlerinin yükselmesi ve trombosit sayısının düşmesi ile karakterize HELLP sendromunda, bronşiyal astımda ve perinatal hayatta fetal akciğer gelişmesi eksikliğinde tedavi amaçlı olarak oldukça yaygın kullanılmaktadır. ITP'li gebelerde, erken doğum ve buna bağlı büyüme geriliği hatta fetal ölümler görülür [8, 9]. HELLP, gebelikte genellikle ağır pre-eklampsinin uzantısı olarak gelişir ve ağır preeklampsili gebelerin %10'unda, eklampsili gebelerin %30-50'sinde ortaya çıkar. Preeklampside olduğu gibi HELLP sendromunda da fetüslerde büyüme geriliği görülür[7]. Astımlı hastaların da, kortikosteroid tedavisi uygulandığından fetal stres, preeklamsi ve IUGR ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir[10]. In vivo uygulanan kortikosteroidlerin insan fetüsü üzerindeki etkileri hakkında henüz yeterince bilgi bulunmamaktadır.

Diğer taraftan glukokortikoidler iskelet kası, yağ dokusu ve endotel hücrelerinde glikoz transportunu inhibe etmektedirler [11-13]. Gebelikte glukokortikoid verilen sıçanların plasentalarında küçülme, fetüslerinde de IUGR belirlenmiştir[14, 15]. Glukokortikoid tedavisi uygulanan gebe kadınların fetüslerinde IUGR gelişmekte[16], fetal kandaki kortizol miktarı da artmaktadır[17].

Adrenal glukokortikoid hormonları (kortizol), tüm organların hücrel fonksiyonunda, özellikle differansiyasyon, olgunlaşma ve homeostazis olaylarında rol alırlar. Glukokortikoidlerin bu fonksiyonları, gebelik esnasında annenin metabolik adaptasyonunda ve fetal organların olgunlaşmasında hayati önem taşımaktadır [18, 19]. Glukokortikoidler hücrede, glukokortikoid reseptörü (GR) ve 11beta- hydroxysteroid dehydrogenaz izoformları (11beta-HSD-1, 11beta-HSD-2) tarafından regüle edilirler[20]. Hedef hücrede glukokortikoidler, sitoplazmada bulunan glukokortikoid reseptörlerine bağlanırlar ve oluşturdukları hormon- reseptör kompleksi ile çekirdeğe geçerek gen aktivasyonunu başlatırlar [19].

Glukokortikoidlerin aktif formuna kortizol, inaktif formuna ise kortizon denir. 11beta-HSD-2 enzimi kortizolü kortizona, 11beta-HSD-1 enzimi de kortizonu kortizola dönüştürebilmektedir [20].

Bilindiği gibi sıçanlarda ovositler fertilizasyondan 3-4 gün sonra blastosist olarak uterusu ulaşırlar ve 5. günde implante olurlar. Başlangıçta blastosist tek tabakalı bir trofoblast tabakasıyla çevrilidir. 8. günde plasental diskin olduğu implantasyon bölgesinde trofoblastik hücrelerin proliferasyonu ile ektoplasental koni gelişir. Bu yapının periferinde ise desidua ile kaynaşan ve fagositik aktiviteye sahip giant (dev) trofoblastik hücreler belirir. Bu olay, plasental labirenti oluşturacak olan allantoik damarlar ve hücrelerin gelişimi ile devam eder. Sonuç olarak sıçan plasentalarında yapısal yönden farklı 3

bölge gelişir; labirent, trofospongiyum ve desidua ile iç içe yerleşik giant(dev) hücre tabakası [21]. Sıçan plasentasında yer alan bu 3 bölge birbirinden morfolojik ve fonksiyonel açıdan farklılıklar gösterir. Labirent zon, trofoblast hücreleri ve maternal ve fetal damarlardan oluşur. Feto-maternal alışverişin esas bölgesidir. Bu bölge insan plasentasındaki feto-maternal bölgenin fetal kısmının yaptığı görevi yapar. Oysa bazal kısımda yer alan trofospongiyum ve trofoblastik hücre tabakası plasental hormon üretiminde esas bölgedir. Bu bölgede trofoblastlar ve maternal damarlar bulunur, fakat fetal damarlar bulunmaz [22].

Plasental gelişim esas olarak trofoblast proliferasyonu ve diferensiyasyonunun koordinasyonuna bağlıdır. Bu olaylarda mitotik regülatörlerin rolü hakkında çok az bilgi vardır. İnsan veya başka memelilerde normal plasentalarda yerleşik olan sitotrofoblast proliferasyonunun diferensiyasyon ile nasıl koordine edildiği, bu koordinasyonun IUGR' den nasıl etkilendiği henüz anlaşılmaş değildir. Günümüzde, glukokortikoid indükeli olarak gelişen fetal IUGR mekanizması hakkındaki bilgiler oldukça azdır. Bugün, glukokortikoidlerin hücre siklusunda; 1. Hücre siklusunun G1 fazında rol alan proteinleri etkilediği, 2. Antiproliferatif etkileriyle de IUGR' ne neden olduğu bilinmektedir. Ancak literatürden glukokortikoidlerin IUGR' ne yönelik bu etkilerini G1 fazı üzerinden yapıp yapmadıkları hakkında henüz bir çalışma yoktur. Bu konuda, sıçan plasentasında hücre siklusu proteinlerinin immunohistokimyasal olarak gösterilmesi ile transmisyon elektron mikroskopu (TEM) düzeyinde yapılabilecek çalışmalar son derece yararlı bilgiler kazandırabilir.

Bu çalışmada, bir glukokortikoid olan deksametazonun prenatal devrede fetal büyüme geriliğine olan etkilerini hücre siklusunun G1 fazındaki proteinler üzerinden yapıp yapmadığı araştırıldı. Bunun için plasental gelişmede deksametazonun G1 fazı proteinleri olan siklin-E, PCNA ve inhibitör özellikli p27 üzerindeki etkileri immunohistokimyasal ve TEM teknikleriyle keza bir apoptoz belirteci olan TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) metodu ile belirlenmeye çalışıldı. Elde edilen sonuçlar kontrollerle karşılaştırılarak, deksametazonun proliferasyon ve apoptoz [23] mekanizmaları üzerindeki etkileri açıklanmaya çalışıldı.

GENEL BİLGİLER

2.1. Plasenta

Sadece memeli hayvanlar ve insanda bulunan bu organ bir taraftan uterus içinde gelişmekte olan embriyoyu en iyi şekilde korurken, diğer taraftan da anneden embriyo için gerekli besin ve antikorlar gibi koruyucu maddelerin alınmasını sağlar. Başka bir deyimle uterus ile embriyo arasındaki metabolizma olaylarının gerçekleşmesi için gerekli bağlantıyı sağlayan organdır. Yani plasenta, anneden besin maddelerinin alınmasını, embriyonun metabolizma artıklarının geri verilmesi ile O₂ ve CO₂ in değiştirilmesini gerçekleştiren ve aynı zamanda gebelik için gerekli hormonları yapıp salgılayan geçici endokrin bir organdır [24, 25]. Embriyo ve anneye ait kısımlar plasenta yapısına aynı oranda katkıda bulunur. Ancak bu kadar sıkı ilişkiye rağmen anne ve yavruya ait kanlar hiçbir şekilde birbiriyle karışmaz. Organ bir bariyer ödevini görerek anne kanından sadece belirli moleküllerin geçmesine izin verir. En basit bir plasentada anne ile embriyo arasındaki madde alışverişi şu tabakalar aracılığı ile olur:

1. Annenin(uterus) kan damarı endoteli
2. Endometriyum bağ dokusu
3. Uterus epiteli
4. İntervillöz aralık
5. Koryon villusları(sinsisyotrofoblast ve sitotrofoblast hücreleri)
6. Koryon villusları bağ dokusu
7. Embriyoya/fetüse ait damar [26, 27]

Olgun plasentada; koryon villuslarına ait olanlar aynı kaldığı halde anneye ait olanlar değişir. Aynı zamanda bu tabakalar plasenta bariyerini de oluşturur.

2.2. Plasenta Çeşitleri

Plasentalar dış görünüş ve morfolojilerine ayrıca koryon villuslarının uterus mukozasıyla ilişkisine göre sınıflandırılır:

1. Domuz, at, eşek, balina gibi türlerde diffüz (epiteliyokoriyal) plasenta görülür.
2. Koyun, keçi, sığır gibi geviş getiren memelilerde sindesmokoriyal plasenta bulunur.

Epiteliyokoriyal ve sindesmokoriyal plasentalarda endometriyumda büyük değişiklik görülmez ve desidua gelişmez. Koryon villusları endometriyuma sadece yatar durumdadır. Doğumda plasenta endometriyumdan yara oluşturmadan ayrılır. Epiteliyokoriyal plasentada villuslar koryonun her tarafına dağılmıştır ve uterus epiteliyle temastadır. Sindesmokoriyal plasenta tipinde koryon villusları uterus epitelini geçer ve

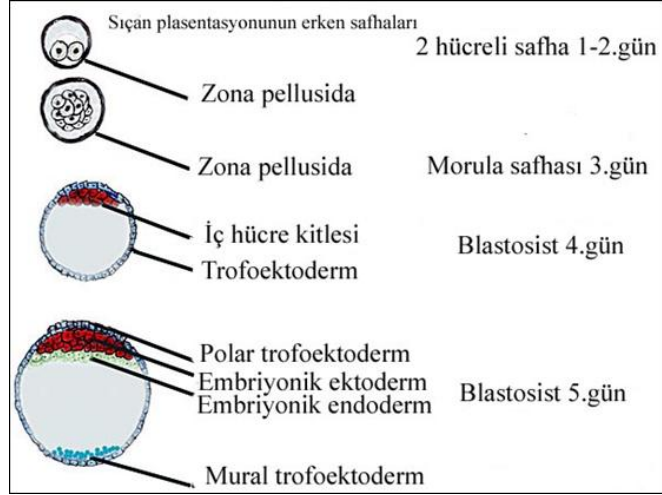
2.3. Sıçan Embriyosunun Gelişmesi ve Koryoallantoik Plasenta

2.3.1. Sıçan Embriyolojisi

Fertilizasyondan kısa süre sonra zigot korona radiatayı oluşturan foliküler hücreleri kaybeder ve sadece zona pelusida kalır. Fertilizasyondan 24 saat sonra embriyo yarıklanır ve iki hücreli olur. 74 saat süreyle yarıklanma (mitoz) zona pelusida içinde ve sitoplazmada artış olmaksızın daha küçük hücrelere (blastomerlere) bölünerek devam eder. Yarıklanma ovüle olan tüm yumurtalarda senkronize değildir, yarıklanma oranları değişkendir. Fertilizasyondan 96 saat sonra embriyo 12–16 hücreli morulayı oluşturur. Bu devrede ovidukt-uterus geçişinde bulunur. Embriyolar yaklaşık 96.saatte uterusu girmeye başlar. Giriş yaklaşık 12 saat sürer. Kısa süre morula uterus boşluğunda serbestçe yüzer ve blastosiste farklılaşmasını tamamlar. Memeli blastosistinin oluşmasında iç blastosist hücreleri arasındaki sıvı birikiminin önemli olduğu söylenir. Bu sıvının kaynağını ovidukt ve uterus salgılarının oluşturduğu sanılır. Sıvının blastosist içinde kalması dış hücreler arasında bağlantı komplekslerinin oluşmasıyla sağlanır. Morulanın blastosiste dönüşmesinde embriyonun ürettiği steroidler etkili olabilir [31].

Yarıklanma boyunca ve morula safhasına kadar blastomerler totipotenttir. Morulada bir hücrenin kaderi bulunduğu yere göre belirlenir. Dıştaki hücreler trofoblastı ya da trofektodermi (gelecekte plasentayı) ve içteki hücreler iç hücre kitlesini (gelecekte embriyoyu) oluşturur. Trofektoderm iç hücre kitlesi üzerinde polar ve blastösöl çevresinde de mural trofoblastlara farklılaşır [32]. Bu eşit olmayan farklılaşma morulanın dış tabakasındaki hücreler arasında zonular sıkı bağlantıların oluşmasıyla da uyumludur. Bu sıkı bağlantılar oluşan iç hücre kitlesini maternal çevreden etkili bir şekilde izole eder (Şekil 2.3.1.1).

Zona pellusida gebeliğin 5. gününde blastosistten kaybolmaya başlar (fertilizasyondan 96–120 saat sonra). Blastosistin zona pellusidadan nasıl ayrıldığı henüz bilinmemektedir. Trofoblastın ya da uterusun liziniyle zonanın lizize gittiği sanılmaktadır [31].



Şekil 2.3.1.1. Sıçan plasentasyonunun erken safhaları [32].

2.3.2 İmplantasyon

İmplantasyon, embriyonik trofoblast ile maternal uterus dokusu arasında doğrudan bir etkileşmedir. İmplantasyon, uterusun hormonal koşullarına bağlıdır. Uterus gebeliğin 4–5. günleri arasında 12 saat kabul durumundadır. Bu zamandan önce ve sonra blastosist implante olamaz. Kabul edilmesi için endometriyumun minimum 48 saat progesterona maruz kalması gerekir. Bu periyodun sonunda da östrojen olmalıdır.

İmplantasyon, zona pellusidasız blastosistin desidual kriptaya yerleşmesiyle ya da ödemli endometriyuma ilişmesiyle başlar. Bu genellikle 5. günün ilerleyen saatlerinde gerçekleşir. Kriptalar, uterusun antimezometriyal kısmında sığ çukurlardır. Uterus stromasında desidualizasyon fibroblastların desidua hücrelerine dönüşmesiyle başlar. Sıçanda ovüle olan ortalama yumurta sayısı 12,2 ve implante olan ortalama yumurta sayısı da 10,9'dur. İmplantasyonun yaklaşık %93'ü doğuma gidebilir. Blastosist implante olurken iç hücre kitlesi maternal dokuyla yüz yüze gelecek şekilde düzenlenir. E4,5. günde polar trofektoderm proliferer olurken mural trofektoderm implantasyonu başlatır. Bunun trofoblast içinde iç hücre kitlesinin hareket kabiliyetine bağlı olduğu sanılır. Blastosist desidual kriptaya ilk yerleştiğinde blastosist ile maternal epitel arasında hiçbir bağlantı yoktur. Blastosist 24 saat sonra implantasyon odasının bir tarafında uterus epiteline tutunur. Adezyon için en erken bulgu iki epitelde de mikrovillusların görülmesidir. Embriyonal 7. günde uterus epiteli kaybolur ve trofoblast ilk kontağını uterus stroması ile yapar. İç hücre kitlesi yani embriyonun bir kısmı yolk sak içine invagine olur ve ektodermin dış tarafında endodermle sarılı yumurta silindrine dönüştürülür. Daha sonra, trofoblast uterus epitelinin bazal laminasını geçerek uterus stromasına girer. Trofoblastın lizozomal enzimler içerdiği, endositoz ve fagositoz yeteneğine sahip olduğuna dair kanıtlar vardır. İmplantasyon genellikle başladıktan 2 gün sonra tamamlanır.

İmplantasyonda ve gebelik boyunca iki farklı bireyin dokusu çok yakın ilişki içindedir. Organizmada genetik olarak farklı dokular arasındaki yakın

kontakt yabancı dokunun reddedilmesiyle sonuçlanır. Uterus bu olaylara immunolojik olarak da hazırdır.

2.3.3. Plasentalar

Sıçanda görev yapan 2 plasenta vardır: 1. Diskoidal koryoallantoik plasenta, 2. Villuslu yüksek damarlı yolk sak plasenta. İkisi de gebeliğin büyük bölümünde mevcuttur.

2.3.3.1. Koryoallantoik Plasenta

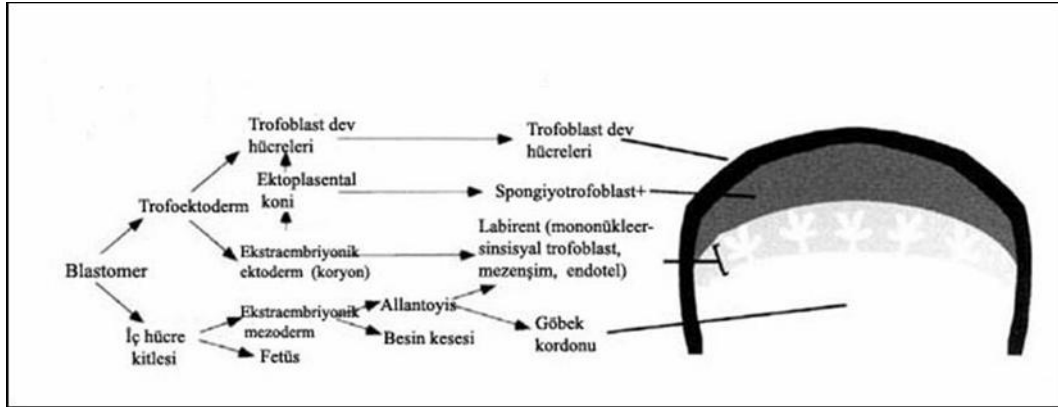
Sıçan koryoallantoik plasentasının fetal bölümü 2 kısımdan oluşur: 1. Ektoplasental koni, 2. Allantois dokusu

İmplantasyondan kısa süre sonra iç hücre kitlesi üzerindeki trofoblastın (polar trofoblast) proliferasyonundan ektoplasental koni ve ekstraembriyonik ektoderm oluşur. Bu yapılardan koryoallantoik plasenta gelişir (Şekil 2.3.3.1.1). Ektoplasental koninin oluştuğu zamanda iç hücre kitlesi altında bir endoderm tabakası oluşur ve trofoblastın iç yüzeyi boyunca yayılır. İç hücre kitlesi hücreleri, proliferasyon ile iç hücre kitlesini uzatarak ektoplasental koninin aksi yönünde endoderm örtüsü içine doğru büyümesini sağlar. Böylece germ tabakalarının inversiyonu sonucu dış taraftan endodermal hücrelerle örtülü, iç tarafta ektodermal hücreli blastösöl içine uzanan bir yumurta silindiri oluşturulur. Sonuçta yumurta silindiri ektodermi içinde üç boşluk oluşur. Bunların en altında ektodermle döşeli amniyotik boşluk bulunur. Ortada ekstraembriyonik mezodermle döşeli ekstraembriyonik boşluk (ekzosölom) ve en üstte de ektoplasental koniye yakın olan ektoplasental boşluk vardır. Bu sonuncusu ekstraembriyonik ektodermle döşelidir. Ektoplasental boşluktan ekzosölomu ayıran membrana koryon, ekzosölom ile amniyon boşluğu arasındaki membrana da amniyon denir. Her iki membranda da iki tabaka vardır; biri mezoderm, diğeri ektodermdir. Fertilizasyondan 9–10 gün sonra allantois, embriyonun posteriyör bölgesinin dışa doğru bir çıkıntısı gibi görülür ve ekzosölom içine doğru büyür. Ektoplasental boşluk bir yarık halini alır ve sonunda koryon dokusu ektoplasental koni bazıyla birleşirken kapanır. Daha sonra allantoisin vasküler mezodermi koryon mezodermiyle birleşir ve allantoik (umbilikal) kapillerler böylece gelişen fetal plasentaya (ektoplasental koniye) sokulurlar. 12. güne kadar, plasenta, laterali dışında, allantoik damarlarla iyice damarlanır. Allantoik damarlar trofoblastlarla sarılı maternal kan sinuslarından yapılmıştır (Şekil 2.3.3.1.2).

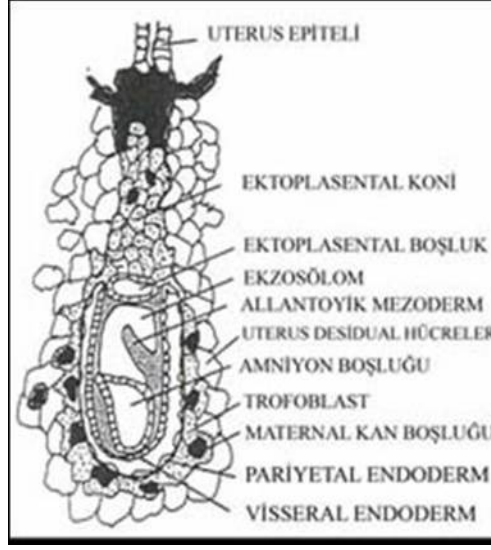
Mezometriyal uterusun dışa doğru büyümesi ile uterus lümeni kapanır ve implante embriyoyu kapsül gibi sarar. Bu kapsülü oluşturan uterus dokusu ektoplasental koni altında uzanır ve definitif plasentanın maternal kısmını yani desidua bazalisi oluşturur. 14. günde uterus boşluğu, implantasyon tarafı üzerinde desidua kapsüllaris denen bir desidua kapsülü oluşturarak embriyonun ventralinde tekrar kurulur. Uterusun kalan bütün kısmına desidua pariyetalis denir.

Ektoplasental trofoblast, maternal dokuyu, bezlerini ve kan damarlarını aşındırarak uterus mukozasına girer. Maternal sekresyonlar, kan ve doku artıkları embriyoyu besler. Bu çeşit beslenmeye embriyotrof beslenme denir. Gelişen plasenta, lateraline yayılarak şekilce diskoidal olur. Trofoblast tabakasında oluşan lakünalar maternal kanla dolu bir labirent oluştururlar. E9. günde maternal plasenta sirkülasyonu kurulur. E12–13. güne kadar koryoallantoik plasenta maternal kanda yüzen, anastomozlaşan kordonlardan ya da trofoblast kordonlarından bir iç zon oluşturur. Labirent, maternal kan sinüsleri bulunan bir trofoblast tabakasıyla (spongiyotrofoblast, bazal zon) örtülüdür. Bu trofoblastik tabakanın dışında maternal desiduayla kontak halinde dev trofoblastik hücreler vardır. Bunlar, aralıkları maternal kanla dolu olan gevşek bir retikulum halinde düzenlenirler. Dev hücre retikulumu implantasyon vezikülünü kılıflar ve pariyetal yolk sak üzerinde Reichert membranı ile kontak halindedir. Dev hücrelerin göç ettiği, fagositoz yaptığı, steroid hormonlar salgıladığı bildirilmiştir. Bunların sınırlı bir yaşam ömürleri vardır.

Labirentin zon üzerindeki ince yapı çalışmaları bütün gebelik boyunca plasental bariyerin embriyonik kapiller endoteli ile trilaminar bir trofoblast tabakasından oluştuğunu ortaya koymuştur. Trofoblast dış tabakası (maternal kanda yüzer) hüreseldir, orta ve iç tabakalar sinsisyaldir. Geç gebelikte trofoblast dış tabakasında ve kapiller endotelinde fenestrasyonlar vardır. Sıçan koryoallantoik plasentası diskoidal, labirentin ve hemokoryaldır.



Şekil 2.3.3.1.1. Sıçan plasentasının gelişimi [33].



Şekil 2.3.3.1.2. Sıçanda plasental gelişim [34].

2.3.3.2. Yolk Sak Plasenta

Yolk sak plasenta, E7,5. günde mural ve polar trofektodermin katılmasıyla birlikte oluşturdukları bir yapıdır. Germ tabakalarının inversiyonu, eski adı blastosöl olan yolk sak boşluğuna uzanan bir yumurta silindirin oluşmasıyla sonuçlanır. Yolk sak boşluğu embriyonik ve ekstraembriyonik ektoderm üzerinde bulunan tek tabakalı kübik ve prizmatik endodermal hücrelerle döşelidir. Yolk sakın viseral tabakasını oluşturan endoderm tabakası, yolk sak boşluğunu tamamen saran yassı endodermal hücreli pariyetal tabaka gibi, koryoallantoik plasenta bazından trofoblast tabakasının iç tarafı üzerinde yayılır. Pariyetal endodermal hücrelerle trofoblast tabakası arasında Reichert membranı denen homojen bir membran bulunur. Reichert membranı koryoallantoik plasentanın lateral kenarına tutunur ve yolk sak boşluğunu sarar. Bu membran bazal membranın bütün morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine sahiptir. Çok sayıda dev hücrelerin ve maternal kan sinüslerinin bulunduğu trofoblast tabakasının dışında desidua kapsüllaris bulunur. Desidua kapsüllaristeki maternal kan damarlarından ya da uterus lümeninden yolk sak boşluğuna giren materyal desidua kapsüllaris dokusunu, trofoblast tabakasını, Reichert membranını ve pariyetal endoderm hücrelerini geçmek zorundadır. E12. günde viseral endodermal hücreler yolk sak boşluğuna uzanan mezenşimal özünde vitellin damarlarının dalları bulunan basit prizmatik epitelli villuslar oluşturur.

Embriyonun büyümesi devam ederken desidua kapsüllarisin bulunduğu yolk sakın pariyetal duvarı incilir. E15 ya da 16. güne kadar duvar yırtılır ve viseral endodermal hücreler uterus lümeni içerikleriyle karşı karşıya gelir.

Yolk sak epitelinin fizyolojik olarak bir plasenta görevinde bulunduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle sıçan, gebelik esnasında 2 fonksiyonel plasentaya sahiptir. Organogenez periyodu esnasında maternal-embriyo transportunda iki plasentanın önemi açıkça tanımlanamamıştır. Yolk sak iyon transport yolu,

koryoallantoik plasenta kalsiyum transport yoludur. Yolk sak anneden fetüse pasif immünite transfer yoludur. Proteinlerin koryoallantoik plasentayı geçmediği sanılıyor. Fakat bu moleküller yolk sakın pariyetal duvarını geçebilir ve yolk sak viseral duvarının endodermal hücrelerine ulaşabilir. Böylece viseral endodermin altındaki mezenşimde bulunan vitellin venlerinin dallarıyla embriyoya geçebilir.

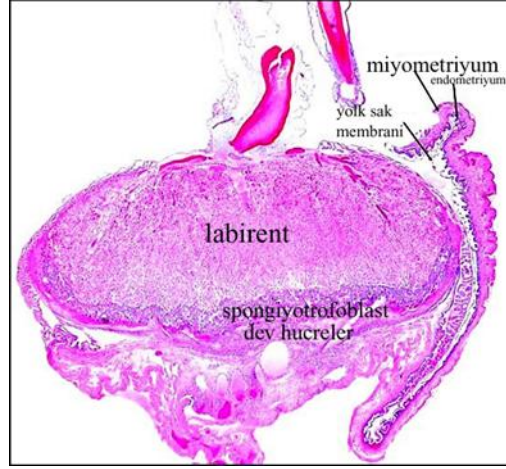
Viseral yolk sak endodermal hücreleri protein absorbe eden hücrelerin bütün özelliklerine sahiptir. Üstelik invitroda da bu özellikleri doğrulanmıştır. Koryoallantoik plasenta, E11–12. güne kadar allantoik damarlanma olmadığından yolk sak kritik erken embriyogenez devresinde anne ve embriyo arasında tek büyük transport yoludur. Protein viseral yolk sak hücreleri tarafından alınabilir ve hücre içinde sindirilebilir. Yıkım ürünleri de bu hücrelerden salgılanabilir. Bu tür sindirim olayının koryoallantoik plasentanın kurulmasından sonra da yolk sak epitelinde devam ettiği bildirilmiştir. Plasentaların rolünün gebelik ilerlerken değiştiği sanılıyor. Çünkü terme yakın yolk sak sikülasyonunun bozulması fetal yaşamı etkilemediği halde, koryoallantoik sirkülasyonun bozulması fetüs için ölümcül olmaktadır. Keza bazı maddelerin alımında azalma, bazılarında da artışlar olmaktadır.

Gebeliğin 12. gününde gelişmesini tamamlayan sıçan plasentası şu kısımlardan oluşur:

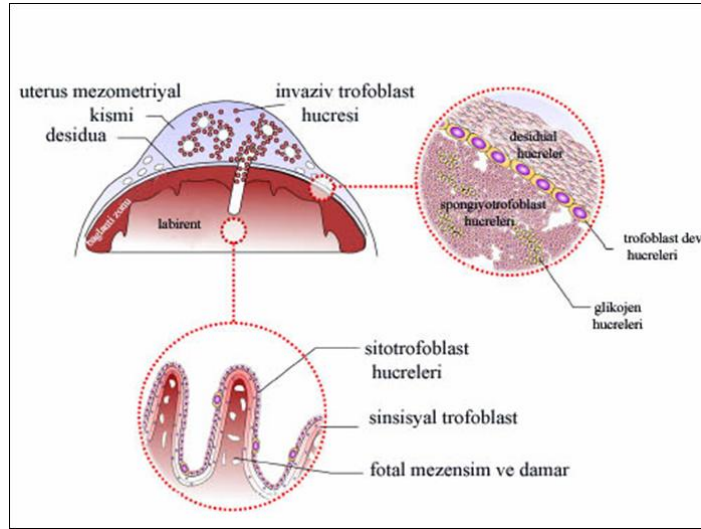
1. Labirent; fetal ve maternal kısımlar arasında besin ve gaz değişiminin yapıldığı yerdir. Trofoblast hücreleri anne kanı ile temas eden anastomozlaşan kordonlar halindedir. Gebeliğin sonuna doğru fetal damar endoteli anne kanı ile temas eder [35, 36].
2. Spongiyotrofoblast Tabakası; ektoplasental koniden farklılaşan bu hücreler bazı hormonları (plasental laktojen vb.), anjiyogenik faktörleri (VEGF vb.) [37] keza MMP' leri [38] salgırlar. Burada sadece anneye ait damarlar bulunur. Bu tabakada açık renkli glikojen trofoblast hücreleri vardır. E13. günde görülürler [39]. Gebeliğin ilerlemesiyle sayıları azalır. Sitoplazmaları vakuolden zengindir. Bu hücrelerin spongiyotrofoblastlardan farklılaştıkları sanılır [36, 40].
3. Trofoblast Dev Hücre Tabakası; ektoplasental koniden farklılaşan sekonder dev trofoblastik hücreler olarak da bilinirler (primer trofoblast dev hücreleri mural trofoblast türevidir ve definitif plasenta yapısına katılmazlar). İnvaziv özellikli hücrelerdir. Diploid çekirdeklidirler. Gebeliğin devamı için önemlidirler [41]. Adezyon molekülleri ($\alpha 1\beta 1$ integrin vb.) [42], MMP' ler (MMP9 vb.), bazı sitokinler ve hormonlar keza büyüme faktörleri (stra13 vb.) ekspre ederler [43].

Spongiyotrofoblastlar, glikojen trofoblast hücreleri ve dev trofoblast hücreleri birlikte bağlantı zonunu oluştururlar.

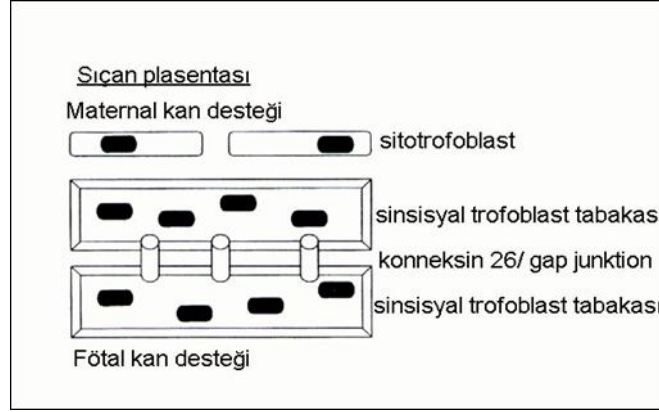
4. Maternal desidua katman, gebeliğin erken dönemlerinde desidua hücrelerinden oluşur. Gebeliğin sonuna doğru atrofiye gider.



Şekil 2.3.3.2.1. Termde sıçan plasentası genel görünümü [32].



Şekil 2.3.3.2.2. Gebeliğin geç dönemlerinde sıçan uteroplasental yapısının şematik görünümü [44].



Şekil 2.3.3.2.3. Labirent trofoblast hücrelerinin üç sıra halinde dizilimi [29].

2.4. Kemirgen Plasentasının Gelişmesi ve Yapısı İnsanıninkine Çok Benzer

2.4.1. Plasental Hücreler

İnsan ve kemirgen plasentasının önemli özelliklerinden biri hem zigot kökenli hem de maternal kökenli hücreler içermeleridir. Farelerde hücre soy çalışmaları zigot kökenli hücrelere polar trofektoderm türevli trofoblastların, fetal kan damarlarının, fetal kan ve mezenşim hücrelerinin (allantoik) dahil olduğunu göstermiştir. Fare plasentas ekstreembriyonik bir organdır, ancak zigot kökenli hücreleri embriyonik ve ekstreembriyonik orijindir. Kemirgen plasentasının maternal hücrelerine uterus hücreleri ile maternal kandan orijin alanlar dahildir [45].

İnsanda ve farede plasenta, fizyolojik ve anatomik olarak 3 bölgeye ayrılır: 1.bölge, kemirgende labirent, insanda fetal plasenta olarak bilinir. Her iki türde de fetal ve maternal kan damarları bulunur. Damarlar zigot kökenli hücrelerle döşelidir [46]. 2.bölge, fetal plasenta labirent yapısının maternal yüzeyini sınırlar: Bu insanda bazal plak, farede bağlantı zonu olarak isimlendirilir. Bu bölgede fetal kan damarları yoktur. Maternal kan damarları zigot türevli trofoblast hücreleriyle döşelidir [24, 47]. İnsanda bazal plağa implantasyon bölgesi [48], sitotroblastik kabuk da denir. Farede bağlantı zonuna spongiyotroblast (trofospongiyum) bölgesi denir [49]. Kemirgen bağlantı zonununun maternal yüzeyini, sürekliliği olmayan zigot kökenli trofoblast dev hücreleri sınırlar. Bunlara sekonder dev hücreler de denir, polar trofektodermden köken alırlar. Dev hücrelerinininkine analog bir zonun insanda olup olmadığı tartışmalıdır. Primer trofoblast dev hücreleri ise mural trofektodermden köken alırlar ve definitif plasenta yapısına katılmazlar [49]. 3. bölge, kemirgen trofoblast dev hücre bölgesinin ya da insan bazal plağının maternal tarafını sınırlayan maternal uterus dokusudur. Bu bölgede insanda ve kemirgenlerde çok sayıda zigot kökenli trofoblast vardır. Her iki türde de buradaki uterus dokusu desidua bazalisten ve desidua bazalise komşu miyometriyum kısmından ibarettir [49].

İnsan desidua bazalisi ve altındaki miyometriyumu plasental yatak olarak bilinir [50]. İnsanda trofoblast invazyonu miyometriyumun 1/3' üne kadar uzanırken [50], kemirgenlerde desidua bazaliste kalır. Sığıçanda miyometriyuma geçtiği sanılır [39]. İnsan plasenta yatağı ve kemirgen desidua bazalisi maternal arter ve ven içerir [49]. Sonuçta, insan plasental yatağı kemirgen desidua bazalisine analog olabilir [46].

2.4.2. İnsan Fetal Plasentası ve Kemirgen Labirenti

İnsan fetal plasentası kemirgen labirentine fonksiyonel olarak analogtur. Çünkü burası fetal ve maternal kanın fizyolojik değişim için yakın ilişki içinde olduğu yerdir. İki türde de bu bölge fetal yüzü koryon plağı olarak bilinen, ekstraselüler matriksle desteklenen bir trofoblast tabakasının fetal yüzüyle sınırlıdır. İçine göbek bağı girer, fetal arterler ve venler dallanır. Koryon plağının zıt yüzeyinde villuslar vardır [39, 49]. İnsanda villuslar çok dallandıkları için plasenta villöz tiptedir. Kemirgenlerde ise koryonik çıkıntılar bir labirent oluşturur. Her iki türde de plasentanın koryoallantoyik tipte hemokoryal bir ara yüze sahip olduğu düşünülür [39, 51].

Koryon plağının ana uzantılarının dallarında farklılıklar vardır. İnsan plasentası villözdür. Ağaç gibi dallanmasını sürdürür ve kör uçlu uzantılarla son bulur. Murin labirentinin ana koryonik uzantılarının dalları çok daha fazla bağlantılar yapar ve karmaşık bir yapı oluşturur. Bu nedenle insandaki intervillöz aralıklar kemirgen labirentininkinden daha açıktır [39, 51].

Farede labirent ultrastrüktürü insandakinden biraz farklıdır. İnsandaki tek tabakalı sinsisyotrofoblastın aksine faredeki trofoblastik ara yüzey bölgesi üç tabakalıdır. Bu anlamda insan plasentasına monokoryal, fare plasentasına trikoryal denir [39, 51]. Maternal kan aralığına bakan murin trofoblast tabakası insandaki gibi sinsisyum değildir. Mikrovillus yoktur. Ortada olan ve 3. tabaka sinsisyotrofoblastiktir. Kemirgenlerde 2. ve 3. sinsisyal tabakalar birbirlerine gap-bağlantıları ile bağlanmış durumdadır. Orta tabakanın maternal yüzeyi tabaka-1' e gevşek bağlanır. Kendisi ile 1. tabaka arasında boşluklu invaginasyonlar vardır [28]. Daha önemlisi tabaka-1 maternal kan damarlarıyla direk ilişkili olan tek tabaka değildir. Sinsisyotrofoblast 2 tabakası da maternal kanla temas eder. Bu, tabaka-1' de pencereyi yapı varlığıyla ve hidrofilik izleyicilerle kanıtlanmıştır [28, 39]. Diğer taraftan farede tabaka-3 ile fetal endotel arasında tek bazal membran bulunduğu halde insanda hem sinsisyotrofoblastın hem de fetal endotelin kendine ait bazal membranı vardır [28, 51]. Kemirgen bazal membranının hem fetal endotel hem de sinsisyotrofoblast-1 tabakasının katkısıyla olduğu bilinmemektedir [52].

2.4.3. İnsan ve Farede Definitif Plasentanın Hemotrofik Değişiminin Başlaması

İnsanda sinsisyotrofoblastlar implantasyondan kısa süre sonra yüzeyel endometriyum kapillerlerini bozarak maternal endometriyal venlere dahil olurlar [53]. Son çalışmalar insanda etkili bir arteriyel dolaşımın gebeliğin birinci trimesterinin sonuna kadar olduğunu göstermiştir [54, 55]. Feto-

plasental gelişimin birinci trimester boyunca düşük oksijenli ortamda gerçekleştiği sanılır. Birinci trimester boyunca uterus bezlerinin sekresyonlarını intervillöz boşluğa salgılamaları alternatif bir besin kaynağı oluşturur [56]. Farede de uteroplasental dolaşım benzer zamanlamada oluşur. Labirentte E10,5' da kan olursa da, yoğun kan kapillerleri E12,5' da görülür [49]. Bu bulgular fare definitif plasentasının orta gebelikten hemen sonra fakat E12,5' dan önce fonksiyonel olduğunu gösterir. İnsanda organogenez E12. haftada büyük oranda tamamlanır [57]. İnsanda birinci trimesterin sonu farede yaklaşık orta gebeliğe karşılık gelir [46].

2.4.4. İnsan Bazal Plağı ve Kemirgen Bağlantı Zonu

İnsan bazal plağı ve bunun kemirgen homoloğu olan bağlantı zonu fetal plaseenta/labirent oluşumunun maternal yüzünü oluşturur. Bu yapılarda fetal kan ve kan damarları yoktur. İki türde de bu bölgede sitotrofoblastlar vardır [24, 49, 50].

Farelerde bağlantı zonunda iki tip sitotrofoblast vardır: Spongiyotrofoblast ve trofoblast glikojen hücreleri. Glikojen hücrelerinin sitoplazmaları açıktır. Kümeler teşkil ederler. Glikojen içeren çok sayıda vakuoller vardır. Spongiyotrofoblastlar bağlantı zonunu oluşturduktan sonra E13. günde bu zonda görülürler [58, 59]. Glikojen hücrelerinin sayıları E15,5' da artar ve E15,5-E18,5 arasında kaybolurlar [58, 59]. Fonksiyonları tam olarak bilinmez. Spongiyotrofoblastlar gibi bağlantı zonunun maternal venöz sinüslerini döşerler. IGF2 gibi hormon sentezlerler [59, 60].

İnsan bazal plağında, erken gebelikte, kemirgen bağlantı zonundaki gibi glikojen içeriği yönünden benzer olan iki tip sitotrofoblast tespit edilmiştir. İnsanda bazal zondaki damar duvarı lümenleri endovasküler trofoblastlar ile döşelidir.

2.4.5. İnsan Plasental Yatağı ve Kemirgen Desidua Bazalisi

İnsan plasental yatağı bazal plak damarlarıyla süreklilik gösteren maternal spiral arterler ve venler içerir. Bazal arterler de bulunur. Bazal arterler miyometriyumu ve dış desidua bazalisi besleyen maternal arterlerdir. Bunlar bazal plağı ve intervillöz aralıkları beslemezler [50, 61]. Benzer durum kemirgen desidua bazalisinde vardır [49]. İnsanda ekstravillöz trofoblastlar iki farklı yolla plasental yatağına invaze olurlar; intersitisiyel ve endovasküler yollarla. İntersitisiyel invazyon 7-9. haftalarda tamamlanır. İntersitisiyel invazyonu endovasküler invazyon takip eder [62]. Terme kadar desidua bazaliste bulunan spiral arterlerin %100' ü, miyometriyumun 1/3 iç tarafında bulunanların da %75' i invazyona uğrar [63]. Bu şekilde vasküler endotel endovasküler trofoblast ile yer değiştirir [50, 62, 64]. Ekstravillöz intersitisiyel trofoblastın arteriyel müküler medya ile ilgili olduğu sanılır. İnsanda bu değişiklikler 12. haftadan önce tamamlanır.

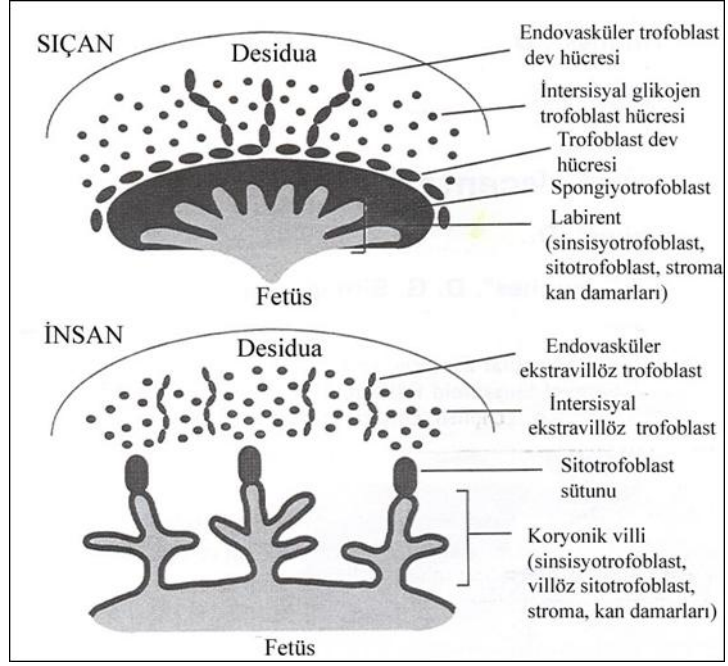
Kemirgenlerde, özellikle farede, bağlantı zonu kökenli glikojen hücreleri E13' te desidua bazalise invaze olmaya başlar ve E15,5-E18,5. günlerde tamamlanır. Miyometriyuma ulaşmaz [58, 59, 65]. İnvazyon merkezi

maternal arterin lümenini döşeyen endotelde değil desidua bazalisin stromasında gerçekleşir (intersitisiyel invazyon) [58, 59]. Kemirgen desidua bazalisinde glikojen trofoblast hücreleri tek glikojen içeren hücreler değildir. Uterus doğal öldürücü (uNK) hücreleri de maternaldir ve glikojen içerirler. Bu nedenle kemirgen glikojen hücreleri miyometriyuma invaze olan insan intersitisiyel trofoblastlarının analoğu olabilir, desidua bazalisin değil [46].

2.4.6. Fare ve İnsanda Trofoblast Dev Hücreleri

Kemirgen trofoblast dev hücrelerinin insan plasentasında analoğu olup olmadığı bilinmiyor. Dev trofoblast hücrelerinin insan plasental yatağında bulunduğu kabul edilmekle birlikte faredekinden morfolojik olarak farklıdır. İnsandaki iki ya da daha fazla çekirdekli ve mononükleer ekstravillöz trofoblastların [66] birleşmesiyle ya da sitoplazmik bölünme olmaksızın çekirdek bölünmesiyle oluştuğu sanılır [67]. Kemirgen sekonder dev trofoblastları aksine polar trofektodermden farklıdır. Bağlantı zonunun maternal tarafında bulunur ve poliploid büyük bir çekirdeği vardır [68, 69].

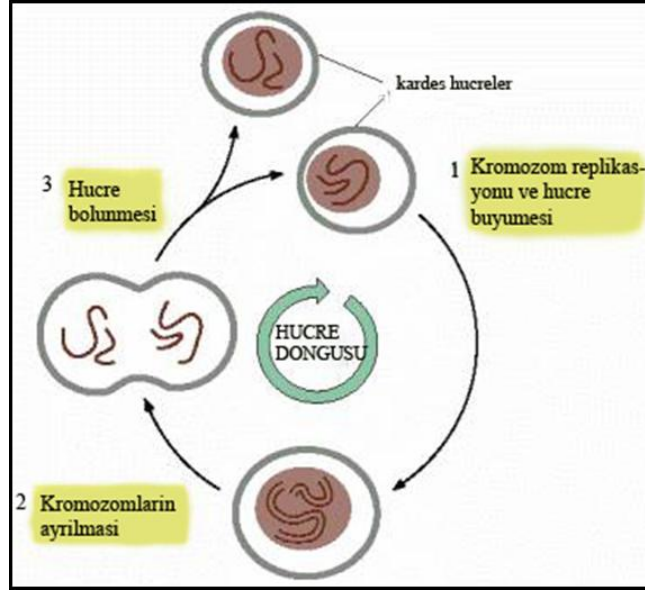
Kemirgen dev hücrelerinin insan invaziv ekstravillöz sitotrofoblastlarıyla analog olduğu ileri sürülmüşse de analoginin görüldüğü gelişme devresi belirtilmemiştir [70]. Bu analoginin E13' ten sonra olması halinde de, bu devrede glikojen hücreleri kemirgen desidua bazalisine invaze olan büyük trofoblastlar oluşturduklarından dikkate alınmamaktadır [58, 59, 65]. Yine de kemirgen sekonder dev hücreleri ile erken insan ekstravillöz trofoblast hücreleri (insan desidua bazalisine invaze olan) arasında bir analogi olabilir: 1. Glikojen hücrelerinin ortaya çıkmasından önce görülen kemirgen bağlantı zonunun desidua bazalise yayılması bu hücreler görülünceye kadar devam eder [35, 71]. Bu, insan intersitisiyel trofoblastlarının desidua bazalise yayılmasıyla analog olabilir. 2. Kemirgen sekonder dev hücreleri insandaki intersitisiyel invazyonun aynısını göstermez: a. Bunlar direk glikojen hücreleri görülmeden önce kemirgen desidua bazalisine yönelirler. b. Desidua bazaliste fagositoz gösterirler [72]. c. Glikojen hücrelerinin ortaya çıkmasından önce proteolitik enzim uPA salgırlar. Fakat glikojen hücrelerinin görülmesinden sonra enzim salgılanmaz [65]. d. Fagositik faaliyet, fonksiyonel definitif plasentanın kurulmasından önce görülmeye başlar [73]. İlginçtir ki, kemirgen sekonder dev hücreleri, kemirgen glikojen hücreleri ve insan intersitisiyel invaziv trofoblastları IGF' ve p57^{Kip2} ekspre ederler [30, 74, 75].



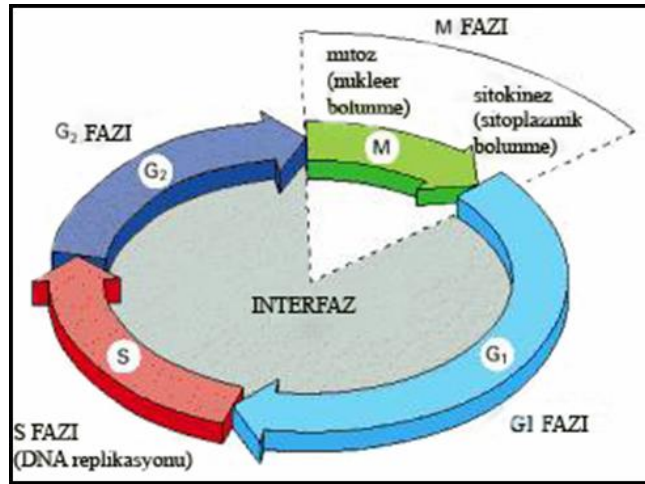
Şekil 2.4.6.1. İnsan ve siçan plasentasının karşılaştırması [76].

2.5. Hücre Döngüsü ve Siklinler

Hücre döngüsünün en temel görevi bir hücredeki kromozom DNA' sını iki katına çıkararak DNA' ları genetik olarak aynı olan iki kardeş hücre oluşturmaktır (Şekil 2.5.1). Bu işlemler iki safhada gerçekleşir: S ve M fazları. Ökaryotik hücre döngüsünde 4 faz vardır: G1, S, G2 ve M fazları. G1 ve G2 fazları ara fazlardır. G1, S ve G2 fazları, hücrenin büyümesi, protein ve organel miktarının iki katına çıkarılması vb. bölünmeye hazırlanması için en önemli zaman aralığını oluşturur (Şekil 2.5.2). Eğer şartlar uygun değilse hücre G1' de ilerlemeyi erteleyebilir hatta G0 diye bilinen günler, haftalar ya da yıllarca kalabileceği özel bir dinlenme durumuna bile geçebilir. Aslında, pek çok hücre kendisi ya da organizma ölene kadar sürekli G0 fazında kalır. Şartlar uygunsa, büyüme ve bölünme için sinyaller olduğunda, G0 ya da erken G1' deki hücreler G1' in sonuna yakın bulunan sınır noktasını (memeli hücrelerinde) geçer ve şartlar ne olursa olsun DNA replikasyonuna girer [77].



Şekil 2.5.1. Hücre döngüsü [77].



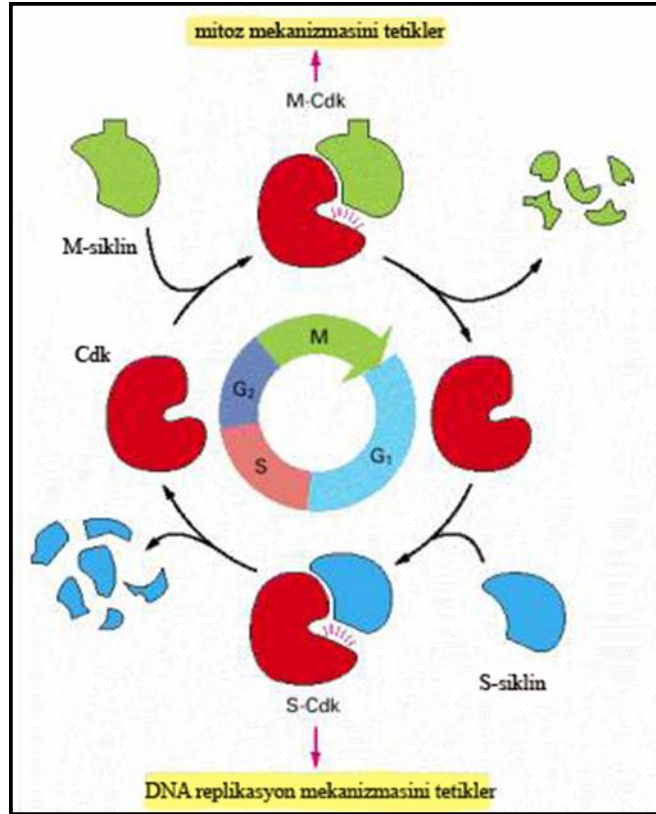
Şekil 2.5.2. Hücre döngüsü kontrolü [77].

2.5.1. Hücre Döngüsü Kontrol Sistemi

Hücre döngüsü kontrol sisteminin özünde siklin bağımlı kinazlar (Cdk) denilen protein kinazlar vardır. Hücre döngüsü ilerlerken bu kinazların aktivitesi artar ya da azalır. Bu enzimler hücre döngüsünün temel olaylarını – DNA replikasyonu, mitoz ve sitokinez- başlatan ya da düzenleyen intraselüler proteinlerin fosforilasyonunda siklik değişikliklere neden olurlar. Cdk aktivasyonunu düzenleyen en önemli proteinler siklinlerdir. İsimlerinden anlaşıldığı üzere Cdk' lar aktiviteleri için siklinlere bağımlıdır: Siklinler hücre döngüsü basamağı ile ilişkili olarak bir yandan sentezlenirken bir yandan da yıkılırlar (Şekil 2.5.1.1). Buna zıt olarak, Cdk seviyeleri en azından basit hücre döngülerinde sabittir. Siklin seviyelerindeki siklik değişiklikler, siklin-Cdk komplekslerinin aktivasyonuna ve hücre döngüsü olaylarının tetiklenmesine neden olur (Şekil 2.5.1.2) [77].



Şekil 2.5.1.1. Hücre döngüsü kontrol sisteminin ikili kilit anahtar yapısı [77].



Şekil 2.5.1.2. Hücre döngüsü kontrol sisteminin basit şeması [77].

Hücre döngüsü basamaklarındaki fonksiyonlarına göre dört sınıf siklin vardır. Bunlardan üçü bütün ökaryotik hücreler için gereklidir:

1. **G1/S siklinleri:** Cdk' lara G1 fazının sonunda bağlanırlar ve hücrenin DNA replikasyonuna geçmesini sağlarlar.
2. **S-siklinleri:** Cdk' lara S fazı boyunca bağlanırlar ve DNA replikasyonunun başlaması için gereklidirler.
3. **M-siklinleri:** Mitoz olaylarını ilerletirler [77].

Pek çok hücrede G1 siklinleri denilen bir dördüncü sınıf siklin, geç G1 fazında sınır noktasından geçişi sağlar[77].

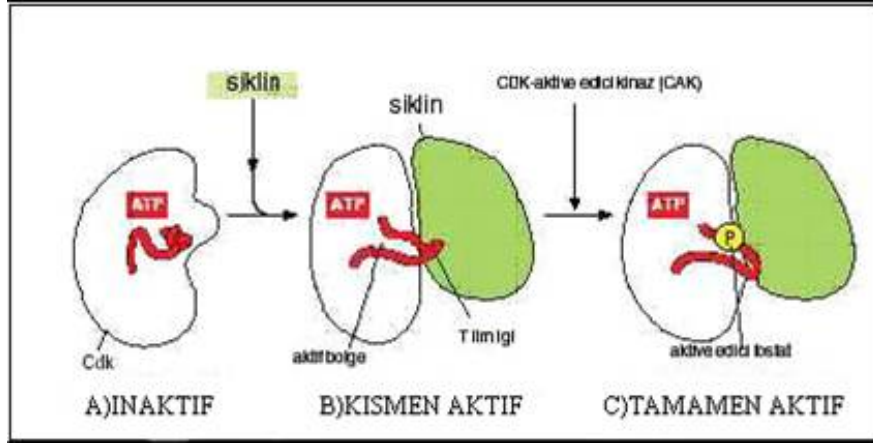
Maya hücrelerinde tek bir Cdk proteini hücre döngüsünde ilgili siklinlere bağlanır. Omurgalı hücrelerinde farklı olarak dört adet Cdk vardır. İki G₁, biri G₁-S ve S, bir diğeri de M siklinleri ile etkileşir. Siklin-Cdk komplekslerine G₁-Cdk, G₁/S-Cdk, S-Cdk ve M-Cdk da denilebilir. Cdk ve siklinlerin isimleri tablo 2.5.1.1 de verilmiştir [77].

Tablo 2.5.1.1. Omurgalı ve mayalardaki hücre siklusu evrelerinde aktivite gösteren siklin-cdk kompleksleri. Memelilerde üç tip siklin-D vardır: Siklin D1, D2, D3 [77].

SİKLİN-CDK KOMPLEKSİ	OMURGALI		MAYA	
	SİKLİN	CDK	SİKLİN	CDK
G ₁ -Cdk	Siklin D*	Cdk 4,6	Cln 3	Cdk1
G ₁ /S-Cdk	Siklin E	Cdk2	Cln 1,2	Cdk1
S-Cdk	Siklin A	Cdk2	Clb 5,6	Cdk1
M-Cdk	Siklin B	Cdk1	Clb 1,2,3,4	Cdk1

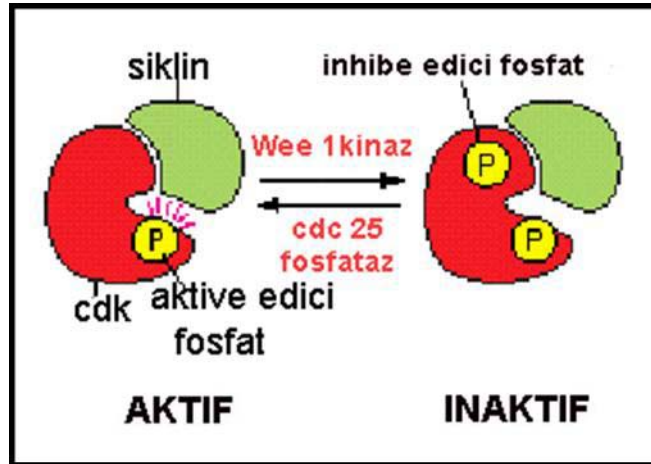
Siklin proteinleri sadece eşi Cdk' yı aktiflemez aynı zamanda onları özel hedef proteinlere yönlendirir. Sonuçta, her siklin-Cdk kompleksi farklı substrat proteinler kümesini fosforile eder. Aynı siklin-Cdk kompleksi hücre döngüsünün farklı zamanlarında farklı etkiler oluşturabilir. Örneğin, mitozda görevi olan bazı proteinler fosforilasyon için sadece G₂ fazında bulunabilirler [77].

Siklin yokluğunda Cdk proteininin aktif olan kısmı, bir protein ile kapatılır. Siklinin bağlanması için proteinin Cdk' nın aktif kısmından uzaklaştırılması gerekir. Siklin-Cdk kompleksinin tamamen aktivasyonu, Cdk aktifleyici kinaz (CAK) denilen ayrı bir kinazın Cdk' nın aktif kısmındaki bir amionasidi fosforillemesiyle olur. Böylece Cdk' nın aktivitesi artar ve hedef proteinler fosforillenir. Bu şekilde özel hücre döngüsü olayları gerçekleşir (Şekil 2.5.1.3) [77].



Şekil 2.5.1.3. Cdk aktivasyonunun şematik görünümü [77].

Bir siklin-Cdk kompleksinin aktivitesi aktif kısmının çatısındaki bir çift aminoasidin fosforilasyonu ile inhibe edilebilir. Wee1 diye bilinen bir protein kinaz tarafından bu bölgelerin fosforilasyonu Cdk aktivitesini inhibe ederken, Cdc25 diye bilinen bir fosfataz tarafından bu bölgelerin defosforilasyonu Cdk aktivitesini artırır (Şekil 2.5.1.4). Bu tür düzenleme mekanizmaları özellikle mitoz başlangıcındaki M-Cdk aktivitesinin kontrolünde önemlidir. Siklin-Cdk kompleksleri, Cdk inhibitör proteinlerinin (CKI) bağlanmasıyla da düzenlenebilir. Çok çeşitli CKI proteini vardır ve de öncelikle G1 ve S fazının kontrolünde görevlidirler [77].

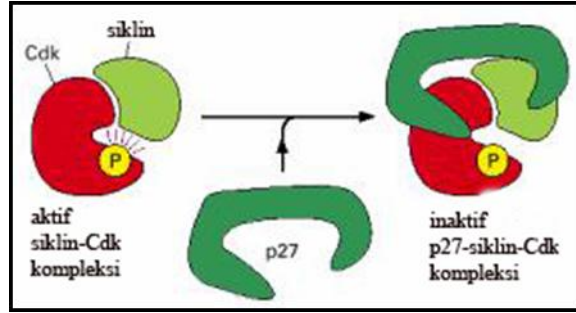


Şekil 2.5.1.4. Cdk aktivitesinin baskılanması [77].

2.5.2. Hücre Döngüsü Kontrol Sisteminde Siklik Proteoliz

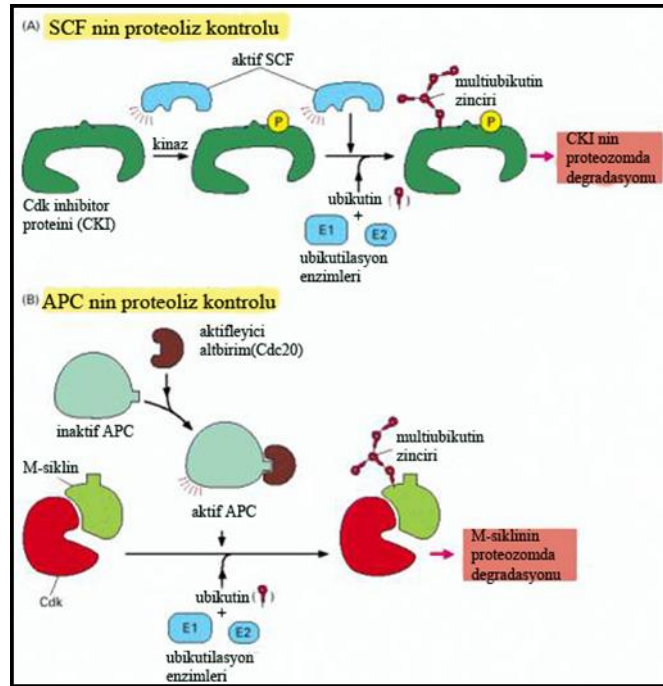
Hücre döngüsü kontrolü en azından iki farklı enzim kompleksine bağlıdır. Bu enzim kompleksleri döngünün farklı zamanlarında hücre döngüsünü kontrol eden anahtar proteinlerin proteolizine neden olurlar. Özellikle, siklin-Cdk kompleksleri belli basamaklarda siklinlerin düzenli proteolizleri ile inaktive edilirler (Şekil 2.5.2.1). Siklin yıkımı, intraselüler proteinlerin proteolizlerinde olduğu gibi ubiquitin bağımlı bir mekanizma ile olur. Aktiflenmiş bir enzim kompleksi, siklin üzerindeki özel aminoasit

dizilerini tanır ve ona ubiquitin'in çeşitli kopyalarını bağlar, böylece proteini proteazomlarda tamamen yok olması için işaretlemiş olur [77].



Şekil 2.5.2.1. Siklin-Cdk kompleksinin bir CKI tarafından inhibisyonu [77].

Siklin yıkımında hız sınırlayıcı basamak, ubiquitin ligazlar olarak bilinen enzimler tarafından katalizlenen ubiquitin-transfer reaksiyonudur. Siklinlerin ve hücre döngüsünü düzenleyen diğer proteinlerin yıkımında iki ubiquitin ligaz önemlidir. G1/S siklinlerinin ve CKI proteinlerinin ubiquitilasyonu ve yıkımından SCF enzim kompleksi, M-siklinlerinin ve diğer mitoz düzenleyenlerinin ubiquitilasyonundan ve proteolizinden de *anafaz ilerletici kompleks (APC)* sorumludur (Şekil 2.5.2.2)[77].



Şekil 2.5.2.2. Hücre döngüsü boyunca proteolizinin SCF ve APC tarafından kontrolü [77].

Çoğu hücrede siklin seviyesi sadece siklin degradasyonundaki değişikliklerle değil, siklin-gen transkripsiyonu ve siklin sentezindeki değişikliklerle de kontrol edilir [77].

2.5.3. Hücre Döngüsü Olaylarının İntraselüler Kontrolü

Siklin-Cdk komplekslerinden her biri özel bir hücre döngüsü olayını tetikleyen moleküler bir anahtar görevi görür. Bir hücrede DNA replikasyon işlemi ileriki hücre jenerasyonundaki mutasyon riskini minimize etmek ve genomdaki her nükleotit gen amplifikasyonunun zarar verici etkilerinden korunmak için sadece bir defaya mahsus yapılmalıdır [77].

Sadece G1 hücreleri DNA replikasyonunu başlatma yeteneğine sahiptir. S fazını tamamlamış (G2 hücreleri) hücreler S-Cdk aktivitesi sağlansa bile kendi DNA' larını replike edemezler. Hücrenin S fazını geçme yeteneğini yeniden kazanması mitozu geçmesi ile mümkündür [77].

DNA replikasyonu, replikasyon orijini denilen kısımlardan başlar. Replikasyon orijinleri bir kromozomun çeşitli bölgelerine dağılmış durumdadır. Orijin tanıma kompleksi (ORC) olarak bilinen multiprotein kompleksi, hücre siklusu boyunca replikasyon orijinlerine bağlanır ve regülatör proteinleri için tutunma ayağı olarak görev yapar [77].

Bu regülatör proteinlerden biri Cdc6' dır. Hücre döngüsünün çoğunda düşük düzeyde olan Cdc6 erken G1' de geçici olarak artar. Cdc6, erken G1' de replikasyon orijinlerindeki ORC' ye bağlanır. Bu, Mcm protein kompleksinin replikasyon orijinine bağlanmasını sağlar. Orijinde ORC, Cdc6 ve Mcm' den oluşan protein kompleksi pre-replikatif ya da pre-RC olarak bilinir [77].

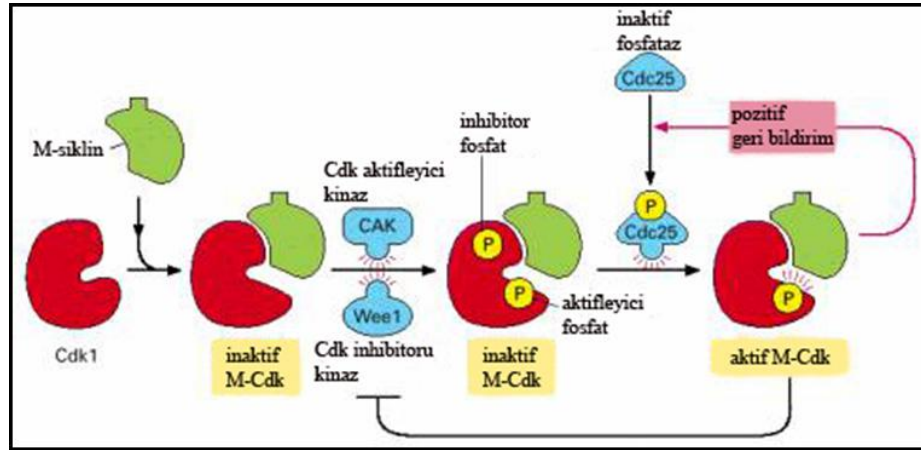
G1' de pre-RC biriktiğinde replikasyon orijini ateşlenmeye hazırdır. Geç G1' deki S-Cdk aktivasyonunun tetiği çekmesiyle DNA replikasyonu başlatılır. Replikasyonun başlaması ikinci bir protein kinazın aktifleşmesini gerektirir. Aktifleşmiş ikinci kinaz, ORC' nin fosforilasyonu için tetiği çeken S-Cdk ile işbirliği yapar [77].

S-Cdk sadece orijin ateşlenmesini başlatmaz aynı zamanda replikasyonun önlenmesine de yardımcı olur: 1. Bir orijin ateşlendikten sonra Cdc6 proteini ORC' den ayrılır. Bu, aynı orijinde tekrar replikasyon olmaması için pre-RC' nin çözülmesiyle sonuçlanır. 2. Cdc6 ve Mcm proteinlerinin herhangi bir orijinde yeniden birleşmesini önler. Şöyle ki, SCF enzim kompleksiyle Cdc6 ubiquitilasyonu tetiklenir. Sonuçta, bir orijine bağlanmayan Cdc6 proteini proteozomlarda hızla degrade edilir. S-Cdk da Mcm proteinlerini fosforiller ve çekirdekte atılmalarını tetikler. Böylece ileride Mcm protein kompleksinin bir replikasyon orijinine bağlanması engellenmiş olur [77].

Siklin-Cdk komplekslerinin işbirliği ile pre-RC oluşması ve S fazından sonra DNA replikasyonu önlenmiş olur. Mitoz sonunda hücredeki bütün Cdk aktivitesi sıfıra iner. Bu şekilde, oluşan Cdc6 ve Mcm proteinlerinin defosforilasyonu bir kere daha pre-RC oluşmasına izin verir ve kromozomlar yeni bir replikasyon turuna hazırlanmış olur [77].

Mitoz olayları, S fazı tamamlandıktan sonra aktiflenen M-Cdk tarafından tetiklenir. M-Cdk aktivasyonu, M-siklinlerin birikmesiyle başlar (omurgalı hücrelerinde siklin-B, Tablo 2.5.1.1' e bakınız). Bu birikim, G2 ve M fazlarında M-siklin gen transkripsiyonu artışıyla gerçekleşir. M-siklin proteinindeki bu artış hücre mitozu yaklaşırken M-Cdk' nın (Cdk1 ve M-siklin kompleksi) kademeli olarak birikmesine neden olur. Bu komplekslerdeki Cdk' lar, CAK enzimi ile aktiflenme bölgelerinden fosforillendikleri halde, protein kinaz Wee1' in iki komşu bölgeyi inhibe edici fosforilasyonu ile inaktif durumda tutulurlar (Şekil 2.5.1.4' e bakınız). Bu yüzden, hücre G2' nin sonuna ulaşana kadar kullanıma hazır pek çok M-Cdk stoku içerir [77].

M-Cdk stokunun aktivasyonu için M-Cdk' yı inhibe edici fosfatları yok eden protein fosfataz Cdc25' in geç G2' de aktiflenmesi önemlidir (Şekil 2.5.3.1). Aynı zamanda inhibe edici kinaz Wee1' in aktivitesi de baskılanır. Böylece M-Cdk aktivitesinin ani artışı garantilenmiş olur. Cdc25' i iki protein kinaz aktifler. Birisi "Polo kinaz" olarak bilinir ve Cdc25' i bir bölgede fosforillerken diğer aktive edici kinaz M-Cdk' nın kendisidir ve Cdc25 üzerinde farklı bir bölgeyi fosforiller. M-Cdk aynı zamanda Wee1' i fosforilleyip inhibe eder. M-Cdk' nın kendi aktivatörünü (Cdc25) aktifleyebilme ve kendi inhibitörünü (Wee1) inhibe edebilme yeteneği, M-Cdk aktivasyonunun mitozda bir pozitif geri besleme döngüsünün olduğunu düşündürmektedir (Şekil 2.5.3.1). Mitoza giriş, eğer DNA replikasyonu tamamlanmamış ise bloklanır. Bu durumda bilinmeyen moleküler sensör mekanizmaları, ya replike olmamış DNA' ları ya da bitmemiş replikasyonu algılar ve hücre döngüsü kontrol sistemine negatif bir sinyal gönderir, böylece M-Cdk aktivasyonu bloklanır [77].



Şekil 2.5.3.1. M-Cdk aktivasyonunun şematik görünümü [77]

Mitozdan çıkış, M-Cdk' nın inaktivasyonu, fosfatazların aktivasyonu ya da her iki olayla tetiklenebilir. Kanıtlar, M-Cdk inaktivasyonunun bu alanda öncelikle sorumlu olduğunu göstermektedir. Geç mitozda M-Cdk' nın inaktivasyonu Cdc20-APC' nin işidir. Burada M-siklinin yıkımı kısa sürede bütün APC aktivitesinin inaktivasyonuna sebep olur. Mitoz sonrası APC inaktivasyonu, hücrenin bir sonraki döngüsü için yeni M-siklin biriktirmesiyle

devam eder. Hücrenin kendisini yenilemesi ve S fazına girmemesi için G1 fazında Cdk' lar CKI' larla ya da Hct1 yolağı ile inhibe edilirler. G1' den S fazına geçiş, G1 siklinlerinin birikmesi ve hücre dışı sinyallerle stimüle edilir [77].

G1 fazında hücre bölünme hızının frenlenmesinde Rb proteini önemlidir. Rb bunu yaparken E2F ile işbirliği yapar. Burada E2F gen düzenleyicisi, G1/S ve S siklinlerini kodlayan genlerin promoterlerinde özel DNA sekanslarına bağlanır. Rb, G1 boyunca E2F' ye bağlanarak S fazı genlerinin transkripsiyonunun bloklanması sağlar [77].

Hücre döngüsünün ilerlemesinde DNA hasarı kontrol noktalarının önemi büyüktür. Hücrelerin çoğunun en azından iki kontrol noktası vardır: birisi geç G1' dedir ve S fazına girişi engeller; diğeri de geç G2' dedir ve mitozaya girişi engeller [77].

G2 kontrol noktası mitozaya girişi engeller. Örneğin, G2 hücrelerinde zarar gören DNA, fosfatase Cdc25' i fosforilleyen ve inaktifleyen bir seri protein kinaza sinyal gönderir ve M-Cdk' nın defosforilasyonunu/aktivasyonunu bloklar. DNA hasarı tamir edildiğinde inhibe edici sinyal kapatılır ve hücre döngüsü kaldığı yerden devam eder [77].

G1 kontrol noktası, G1/S-Cdk ve S-Cdk komplekslerinin aktivasyonunu inhibe ederek S fazına ilerlemeyi bloklar. Örneğin, DNA hasarı memeli hücrelerinde p53 proteinini aktive eder. P53' ün aktive ettiği genlerden birisi tarafından kodlanan p21, G1/S-Cdk ve S-Cdk' ya bağlanarak bu enzimleri inhibe eder ve S fazına girişin bloklanmasına yardımcı olur [77].

Zarar görmeyen hücrelerde, p53 çok kararsızdır ve çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. p53' ün yıkılması Mdm2 protein ile etkileşmesine bağlıdır. DNA hasarı, p53' ü fosforilleyen protein kinazları aktifler ve böylece onun Mdm2' ye bağımlılığını azaltır. Bu şekilde, p53 yıkımı azalır ve hücredeki p53 konsantrasyonu artar [77].

2.6. Siklin-E, PCNA ve p27 Üç Önemli Hücre Siklusunu Regülatör Proteinidir

2.6.1. Siklin-E

Cdk' lar çeşitli fizyolojik sinyallerin etkisiyle katalitik olarak aktif ya da inaktif duruma geçerler. Cdk aktivasyonu siklinler denilen düzenleyici alt birimlerle etkileşim gerektirir. Hücre döngüsünün her fazı belirli siklin-Cdk komplekslerinin dağılımıyla karakterizedir. Memelilerde G1 fazında ilerleme D-tip siklinlerin ve siklin-E' nin aktivitesiyle düzenlenir [78]. Bunlara ek olarak E2F-1, Cdk' lar ve p27 proteinleri de rol oynamaktadır. Retinoblastoma proteini (pRb) aktif hipofosforile durumunda hücre döngüsünün G1' den S fazına geçişinde bir inhibitördür. Siklin-E, Cdk-2 ile kompleks oluşturarak pRb' yi inaktif/fosforile eder ve G1-S geçişini düzenler. PRb inaktif olduğunda E2F-1 serbest kalarak DNA replikasyonu ve hücre döngüsü

kontrolü için gerekli olan diğer proteinlerle kompleksler oluşturur ve G1-S geçişini sağlar. Cdk inhibitörü p27 ise siklinE-Cdk2 kompleksine bağlanarak G1 fazı ilerlemesinde negatif bir düzenleyici olarak görev yapar [79].

2.6.2. PCNA

Prolifere hücre çekirdek antijeni (PCNA) bir hücrenin yaşamından ya da ölümünden sorumlu olan temel moleküllerden biridir. PCNA halka şeklinde bir proteindir [80]. Molekül ağırlığı 36kDa' dur. PCNA' nın S fazında çekirdekteki dağılımı DNA sentezine ya da bu olaylara bağlı olarak değişir [81]. PCNA hücre siklusunda DNA sentezinin yüksek olduğu G1 ve S fazında artar, S fazında maksimum düzeye erişir ve G2/M fazında azalır [82]. Hücre siklusunda G1 fazının son %5' lik ve S fazının ilk %35' lik kısmında dağılım gösterir [80]. Mitoz gösteren hücrelerde ise çok düşüktür.

PCNA, DNA' yı muhtemelen sararak bir yüzük yapı oluşturan homotrimerik bir proteindir. Bu şekliyle PCNA, farklı tipte katalitik ve regülatör proteinler için kayan platform görevinde bulunur. Katalitik ve regülatör proteinler DNA ile etkileşme durumunda, örneğin DNA replikasyonu, tamir sentezi, metilasyon, kromatinin yeniden oluşması, yavru kromatidlerin tutunması gibi olaylarda bu platforma bağlanırlar [83]. Yüzük şeklindeki PCNA, DNA proteinlerini yerleştiren kayan bir mengene ya da kıskaç gibi davranır. Bu görevini yaparken çift zincirli DNA üzerinde DNA boyunca ve onu sararak kayar [84]. Keza PCNA, siklinler, Cdk ve Cdk inhibitörleriyle etkileşerek hücre siklusunun ilerlemesinde DNA metabolizmasını koordine eder. PCNA, nükleotid ve baz eksilmesi dahil çeşitli DNA tamir olaylarına bu olaylarla ilgili proteinlerle etkileşerek katılır [83].

Deksametazon uygulanan tümörlerde PCNA ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir. Deksametazonun G1/S fazında PCNA ekspresyonunu inhibe ettiği sanılmaktadır [85].

PCNA, bu olaylarda p53 ile sıkı ilişki içindedir ve p53 tarafından kontrol edilen Gadd45, MyD118, CR6 ve en önemlisi p21 ile etkileşir. Hücrede p53 yokluğunda PCNA miktarı yüksek ise DNA replikasyonu, p53 varlığında PCNA yüksek ise DNA tamiri gerçekleşebilir [86]. PCNA' nın olmadığı ya da çok az olduğu durumlarda hücrenin apoptoza gittiği bildirilmiştir. Bununla birlikte RNA transkripsiyonuyla da ilişkili olduğu sanılmaktadır [87].

2.6.3. P27

Ökaryotik hücrelerde hücre siklusu faz geçişleri siklin bağımlı kinazlar olarak bilinen protein kinazların aktivitesinin düzenlenmesiyle ilgilidir [88]. Aktif Cdk/siklinler hücre siklusunun S fazında ilerlemesi ve mitozu girmesi için gereklidir. P27, çekirdeğe ait Cdk' lara bağlanarak bu enzimleri inaktive eder ve bu şekilde hücre proliferasyonunu kontrol eder. Keza sitoplazmadaki hedefleriyle etkileşir [89]. Siklin bağımlı kinazların kontrolsüz aktivitesi kansere neden olur [90].

Sitoplazmik p27, küçük GTPaz RhoA yolağının doğrudan regülasyonu ile aktin dinamiklerini değiştirir. Normal hücrelerde p27 protein düzeyleri G₀ ve erken G₁ fazları boyunca en yüksek düzeydedir, daha sonra geç G₁ ve S fazlarında hızla düşer. P27 miktarı öncelikle fosforilasyonla düzenlenen ubiquitin aracılı proteoliz ile kontrol edilir. Bununla birlikte, p27' nin Cdk2 tarafından thr187' den fosforillenmesi SCF' nin ubiquitin-protein ligazı tanınmasına ve daha sonra degradasyonuna neden olur. P27' nin siklin-Cdk' ya bağlanması ve inhibisyonu siklin ve de Cdk alt üniteleriyle kontakt halinde olan bir N terminal domeyni ile sağlanır. Önemli olarak, p27' nin Cdk inhibitör fonksiyonu göstermesi çekirdekte lokalize olmasına bağlıdır. P27, C terminalinde fosforile olan bir çekirdek lokalizasyon sinyali (NLS) içerir. P27' nin çekirdek ve sitoplazma arasındaki taşınımı da fosforilasyon olaylarıyla düzenlenir. Mitojenik stimülasyonda, human kinase interacting stathmin (hKIS) p27' yi ser10 üzerinden fosforiller ve çekirdekten sitoplazmaya geçmesini sağlar. Bununla birlikte, p27' nin Akt tarafından NLS Thr157 üzerinden fosforillenmesi çekirdek lokalizasyon kapasitesini zayıflatır. Sitoplazmik p27' nin siklin-kinaz inhibisyonu dışında hücre göçünün düzenlenmesinde de rolü olduğu sanılmaktadır [91].

2.7. Glukokortikoidler

Adrenal korteksin zona fasikülatasında adrenokortikotropik hormona (ACTH) cevap olarak üretilen glukokortikoidlerin (GC) temel görevi plazma glikoz konsantrasyonunu artırmaktır [92]. GC' ler karbonhidrat, lipid ve proteinlerin metabolizması üzerine fazla etki gösterirler. Bununla birlikte karaciğerde, glikogenez ve glukogenezde kullanılan karbonhidratların (glikoz sentezi), aminoasitlerin (enzim sentezi) ve yağ asitlerinin (enerji kaynağı) alınması ile kullanımını harekete geçirirler. Hakikaten, bu hormonlar fazla miktarda glukoz sentezini stimüle ederler; böylece diabetes mellitusda olduğu gibi kanda yüksek glukoz düzeylerine neden olurlar. Buna karşın karaciğer dışında, GC' ler perifer organlar (örneğin: deri, kas, yağ dokusu) üzerine zıt veya katabolik etki oluştururlar. Sözü edilen yapılarda, bu steroid hormonlar sadece sentez aktivitesini azaltmakla kalmaz, aynı zamanda protein ve lipid yıkımını da hızlandırır. Yıkım yan ürünleri olan aminoasitler ve yağ asitleri sentez açısından aktif olan hepatositler tarafından kandan alınarak kullanılırlar. GC' ler aynı zamanda kanda dolaşan lenfosit sayısını azaltarak immun cevabı baskırlar. Bu azalma, lenfosit yapıcı organlardaki mitotik aktivitenin inhibisyonu ve artan yıkımın birlikte oluşturdukları bir sonuçtur.

Bilindiği gibi embriyoda prenatal dönemde özellikle akciğer [93], kalp, böbrek ve barsak [94] olgunlaşmasında glukokortikoidler kullanılır. Hayvanlarda yapılan bir çalışmada antenatal dönemde tekrarlayan dozlarda kortikosteroid verilmesi akciğer fonksiyonunu olumlu etkilerken, beyin fonksiyonunu ve fetal büyümeyi olumsuz etkileyebilmektedir [95]. Sıçanlarda yetişkin dönemde hipertansiyon [96], kalıcı hiperglisemi ve kısmen hiperinsülinemi [97] ve insülin rezistansı programlamak için son trimesterde glukokortikoid vermek yeterlidir.

Plasenta, fetal (umbilikal) ve maternal (uterus) sirkülasyon arasında besinlerin ve atık ürünlerin transferinden sorumlu organdır. Glukoz, plasenta tarafından transport edilen asıl karbonhidrattır. Normal fizyolojik şartlar altında maternal kandaki glukoz düzeyleri fetal sirkülasyondakinden yüksektir ve bundan dolayı metabolik enerji olmaksızın glukoz anneden fetüse geçebilir [98]. Bazal şartlarda fetüsün glukoz desteği plasental transportla maternal sirkülasyondan sağlanır [99]. Plasental glukoz geçişi, kolaylaştırılmış difüzyonla olur [100]. Bu olaya glukoz transporterleri denen membran kateden glikoprotein ailesi aracılık eder [101]. Memeli plasentasında iki glukoz taşıyıcı izoformu ekspresyonu olan GLUT1 ve GLUT3' ün varlığı gösterildi [102, 103]. Erken gebelik esnasında plasentadan ekspre edilen predominant form GLUT1' dir ve bu trofoblastik hücre plazma membranında gösterilen doku-bariyeri izoformudur [103, 104]. İmmunohistokimyasal çalışmalar GLUT1 proteininin hemokoryal olan fare ve sıçan plasentasında hem bağlantı zonunda (maternal) hem de labirent zonda ekspre edildiğini gösterdi [102, 103]. Lokasyonundan dolayı GLUT1 plasenta ve fetüse olan glukoz transportuna aracılık edebilir [102, 103]. Aksine plasental trofoblastta GLUT3 protein ekspresyonu materno-feto bariyerin fetal yüzündeki hücrelerle sınırlıdır [105]. Kemirgen plasentasında GLUT1, ileri gebelikte GLUT3 ile yer değiştirir [103, 106]. Glukoz taşıyıcı izoformunun değişmesinin bir sonucu olarak GLUT3 terme doğru örneğin fetal büyümenin maksimum olduğu zamanda total plasental glukoz transfer mekanizmasının giderek artan önemli bir komponentini temsil eder [102, 107]. Gebelik esnasında plasental GLUT1 ve GLUT3 ekspresyonunun normal ontogenesisini etkileyen faktörler az anlaşılmıştır. Ama, GLUT3 gen ekspresyonunun transkripsiyon faktörü Sp1 ile baskılandığı sanılır. Sp1, çoğu proliferen hücrede gen transkripsiyonunu aktive eder [108]. Aksine Sp3, GLUT3 gen transkripsiyonunu aktive edebilir [108]. Başka hücre tiplerinde Sp1, GLUT1 promoterin bir transaktivatörü olarak rol alır [109]. Sp1 null mutant fareleri, erken embriyonik devrede normalden daha küçüktür ve gelişmenin durduğunu gösterir [110].

Plasentanın büyümesi anne, plasenta ve fetüs arasında metabolik, otokrin, parakrin ve endokrin ya da sitokin sinyallerin değişimine bağlıdır. Plasentogenezi düzenleyen faktörler hastalığın tanımlanmasını bekler. Son çalışmalar çekirdek hormon reseptörü PPAR- γ ' nin plasental, kardiyak ve yağ dokusu gelişmesi için gerekli olduğunu göstermiştir. Ne ilginçtir ki vahşi tip plasentalı null embriyolarının PPAR- γ ile desteklenmesi kardiyak defekti düzeltir. Bu da fonksiyonel bir plasentada kalbin gelişmesinin bazı faktörlere bağımlı olduğuna işaret eder [111]. Plasenta fetal gelişmede merkezi bir rol oynar. Bu yüzden erken ve orta gebelikte plasental gelişme ve büyüme hataları ileri gebelikte görülen fetal büyümedeki gerilemeyle doğrudan ilişkilidir [112]. Önceki in vitro metodoloji çalışmaları fetal büyüme geriliği plasental glukoz taşınımı oranında önemli değişiklikler gösterdi [113]. Fetal büyüme geriliğiyle ilgili patolojik durumlarda plasental glukoz taşıyıcılarının dağılımı hakkında, bir bakıma tartışmalı olan oldukça az bilgi vardır. Örneğin; fetal büyüme geriliği GLUT1' in azalmasına, hipotroksinemik gebelikte de GLUT3' ün artışına neden olur [114]. Halbuki maternal epidermal büyüme

faktörü eksikliğinin neden olduğu fetal büyüme geriliği GLUT3 mRNA dağılımının azalmasıyla sonuçlanır, GLUT1 mRNA dağılımında hiç değişiklik olmaz [115]. Plasental glukoz taşıyıcı dağılımındaki değişikliklerin plasental büyüme modülasyonu ya da buna paralel bir başka modülasyon olup olmadığı anahtar bir sorudur.

Glukokortikoidlerin normal fetal gelişmede önemli rolleri vardır. Çoğu kez ektrauterin yaşama hazırlanmada fetal dokuların olgunlaşması için önemlidir [116]. Fakat fetal devrede aşırı GC' e maruz kalınma, ergin yaşamda hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık ve glukoz intoleransı riski taşıyan fetal büyüme geriliğinde nedensel bir faktör olarak gösterilmiştir [15, 117]. Sıçanda, prenatal dönemde karşı karşıya kalınan aşırı GC' in yaşam boyunca GC aktivitesini üst düzeyde tuttuğu ileri sürüldü. Çünkü bu durumda hippokampal glukokortikoid reseptör (GR) dağılımının azalmasıyla kortizol salınımının geri beslek kontrolü zayıflamaktadır [96]. Fetüs, yüksek maternal GC düzeyinden normalde fetoplasental 11beta-HSD2 ile korunur. Sentetik GC deksametazon, 11beta-HSD' nin zayıf bir substratıdır [118] ve sıçanda deksametazon uygulanması ergin yavruda hipertansiyon ve anormal glukoz metabolizmasıyla birlikte fetal büyüme geriliğine neden olur [5, 119]. GLUT3, mRNA ve protein düzeyleri antisense GR geni taşıyan transgenik fare plasentasında üst düzeyde düzenlenir [14].

11beta-HSD, biyoaktif glukokortikoidlerin (kortizol ve kortikosteron) ve bunların inaktif metabolitlerinin (kortizon ve 11 dehidrokortikosteron) birbirine dönüşmesinden sorumludur. Bu yüzden 11beta-HSD, GC ve mineralokortikoid hedef organlarında GC biyoyararlanımı için önemli bir doku-spesifik modülatör olduğu düşünülür [120]. Bu enzim ilkin 1950' lerin başında belirlendi. İleriki çalışma yıllarında da iki farklı izozimi olduğu anlaşıldı: 11beta-HSD1 ve 11beta-HSD2.

İnsanda 11beta-HSD aktivitesi ilk olarak 1960' larda belirlendi. 11beta-HSD2 proteinin yaygın olarak sinsisyotrofoblastlarda [121] lokalize iken, 11beta-HSD1 proteinin ekstrasitoplazmik trofoblastlarla sınırlı olduğu bildirildi [122]. 11beta-HSD1 ve 2 lokalizasyonundaki bu farklı durum, bunların farklı fizyolojik fonksiyonlarının olduğuna işaret edebilir. Plasental 11beta-HSD' nin rolünün fetüsü maternal GC' lerin ileri etkilerinden korumak olduğu ileri sürüldü. Lokasyonundan (maternal-fetal değişim yeri) ve enzimatik özelliklerinden (kortizole yüksek afinite göstermesinden ve yalnız dehidrogenaz aktivitesine sahip olmasından) dolayı bu role daha uygundur [4]. İnsan plasentası çalışmasında maternal uygulanan kortizolün çoğunun kortizona metabolize olması bunun bir plasental 11beta-HSD bariyeri olduğuna işaret eder [123]. Plasental 11beta-HSD2 aktivitesi ile doğum ağırlığı arasında da bir ilişkinin olduğu rapor edildiye de [124], bu doğrulanmadı [125]. Gebe sıçanda da zona-spesifik 11beta-HSD1 ve 2 ekspresyonu bu iki enzimin farklı fonksiyonel önemine işaret etmektedir [126]. Gebe sıçana karbenoksolon (11beta-HSD1 ve 2' nin potansiyel inhibitörü) ya da deksametazon (gebelikte 11beta-HSD1 substratı olmayan bir sentetik GC' dir ve sadece 11beta-HSD2 için zayıf substrattır)

uygulandığında yeni doğan yavru ağırlıkları tuz uygulanan kontrollere göre %20 azalmıştır. Keza doğum ağırlığı ile plasental 11beta-HSD2 aktivitesi arasında güçlü bir ilişki bulundu. Bu sonuç, plasentaya gelen maternal kortikosterona (karbenoksolonla plasental 11beta-HSD' nin inhibe edilmesi sonucu plasental bariyerin bozulması) ya da deksametazona aşırı maruz kalan fetüsün doğum ağırlığının azaldığının bulgusudur. Doğumdan hemen önce maternal proteinin sınırdaki olduğu durumlarda plasental 11beta-HSD2 aktivitesinin zayıfladığı ve doğum ağırlığının azaldığı belirlendi [127].

11beta-HSD2, kemirgenlerde ve muhtemelen insanlarda pek çok fetal dokuda gebeliğin ortalarına kadar yüksek miktarda bulunur [124, 128] ve gebeliğin ortalarından itibaren GR ve MR çok miktarda görülür. Sıçanlarda ve insanlarda plasental 11beta-HSD2' nin etkinliği terme yakın ciddi anlamda değişmektedir [123]. Buna bağlı olarak 11beta-HSD2' deki yetersizliğin maternal glukokortikoidlerin fazla miktarda fetüse geçmesine neden olduğu ve ileride ortaya çıkacak hastalıkları programladığı öne sürülmüştür [4]. Sıçanlarda büyük plasentalı en küçük fetüste plasental 11beta-HSD2 aktivitesinin daha düşük olduğu görülmüştür [129]. İnsanda 11beta-HSD2 genindeki zararlı mutasyonların çok düşük doğum ağırlığına sebep olduğu ortaya konulmuştur [130]. Bu bilgiler insanda fetüs ve/veya plasentada 11beta-HSD2 eksikliğinin büyüme geriliğine neden olduğunu akla getirmektedir [129]. Bununla birlikte 11beta-HSD2 geni yok edilmiş farede normal doğum ağırlığı gözlenmiştir [131]. Farelerde 11beta-HSD2 geni dağılımı gebeliğin ortalarında ortadan kalkmaktadır [128], muhtemelen bu dönemde glukokortikoid etkisiyle doğum öncesinde gerekli gelişme ve olgunlaşma olmaktadır [129]. İnsan fetal dokularında da 19 ve 26. haftalar arasında 11beta-HSD2' nin böbrek hariç ortadan kalktığı görülür [132]. Buna karşın insanlarda gebelik yaşıyla birlikte 11beta-HSD2 aktivitesi artar [124]. Sıçan gebeliği boyunca diyetle protein sınırlaması plasentada 11beta-HSD' yi zayıflatır [127]. Ayrıca maternal protein sınırlama modelinde gebe sıçana (ve yavrularına) glukokortikoid sentezi inhibitörü verilerek yavrularda hipertansiyon oluşması önlenir [133]. Plasental 11beta-HSD2 aktivitesinde bir problem olduğunda fetal HPA eksenini aktivasyonundan önce glukokortikoid transportundaki artış fetal dokuların prematür farklılaşmasını stimüle eder ve böylece sonraki doku gelişimini sınırlayarak büyüme geriliğine sebep olur [92]. Son çalışmalar, gebeliğin belli dönemlerinde oluşturulan beslenme kısıtlamasının fetal büyüme geriliğine ve 11beta-HSD2' nin plasental dağılımında ve aktivitesinde belirgin azalmalara sebep olduğunu göstermiştir [134, 135]. Normal insan gebeliği boyunca plasentada 11beta-HSD2 dağılımı artar ancak IUGR ile komplike gebeliklerde 11beta-HSD2 aktivitesi azalır. Bu da 11beta-HSD' nin fetal büyümede önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir [136].

Gebelikte daha erken glukokortikoide maruz kalmak yetişkinlikte glikoz-insülin dengesini etkilememektedir, bu da özel bir duyarlılık dönemi olduğunu düşündürmektedir [129]. Henüz glukokortikoid etki aralığı tamamen belirlenmemiştir. Ancak deksametazon uygulamasında gebeliğin üçüncü trimesterindeki uygulamanın etkileri çok açıktır [96]. Fetal programlama için

dokuların bu karmaşık glukokortikoid duyarlılık pencerelerinin ne anlama geldiği henüz araştırılmamıştır [129].

Plasenta oluşumunu da kapsayan pek çok dokunun gelişmesini Wnt genleri düzenlemektedir. SFRP'lerin de Wnt yolağını inhibe ettiği düşünülmektedir [137]. Maternal deksametazon uygulaması SFRP4 dağılımını hem bazal hem de labirint bölgelerde artırmıştır [137]. Bununla birlikte daha önceki çalışmalarda SFRP4 pek çok üreme dokusunda apoptoz ile ilişkilendirilmiştir [138]. Ek olarak bu bulgular (SFRP4 etkilerine dair) mezoteliyoma [139], uterin [140] ve kolorektal [140] kanserdeki SFRP4 ün anti-proliferatif etkisiyle de uyumludur. Bu, plasental büyümede geriliğe sebep olabilir [137].

İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-II, GC hareketleri için potansiyel bir hedeftir [141]. GC'lerin pek çok hücre ve doku çeşitlerinde IGF-II dağılımını düzenlediklerine dair hem in vitro hem de in vivo çalışmalar mevcuttur [142, 143]. Ayrıca IGF-II plasental bir anahtar otokrin/parakrin büyüme faktörü olarak gözlenmiştir [144]. Sıçanda, IGF-II null mutantlar hem fetüs hem de plasentada gözle görülebilir IUGR'ye sebep olmaktadır [145]. Bununla birlikte IUGR olan insan bebeklerinin göbek kordonu kanındaki IGF-1 konsantrasyonu normale oranla daha düşüktür [146].

Kemirgenlerde olduğu gibi insanlarda da prenatal glukokortikoide aşırı maruz kalmanın yetişkinlikte kardiyovasküler, metabolik, nöroendokrin ve davranışsal fenotipte olumsuz değişiklikler programladığı görülmektedir [129].

2.8. İntrauterin Büyüme Geriliği ve Apoptoz

Düşük doğum ağırlığı plasentanın anormal yapısından kaynaklanabilir. Normalde plasentanın ağırlığı fetüsünkiyle orantılıdır. Bu nedenle her ikisinin ağırlıklarındaki oransal bir azalma fetüsün IUGR olacağı anlamına gelmez. Çünkü küçük plasenta fetüsün daha hızlı büyümesine izin vermez. Aslında aralarında yakın boyut ilişkisinin olması oldukça doğaldır. Çünkü plasentanın fonksiyonel kapasitesinin sınırı fetüsün ihtiyaçlarını karşılayabilecek düzeye oldukça yakındır [147].

Plasentanın fonksiyonel alanı sendroma bağlı olarak preeklempsiyada ve özellikle de hipertansiyonda genelde azalır. Bunun plasentada primer defekt mi yoksa plasental yatakta sekonder vasküler lezyon mu olup olmadığı bilinmez. Bu nedenle bu ve buna benzer durumları genelde ifade etmek için uteroplasental yetersizlik teriminin kullanılması önerilmiştir. Fetal büyüme geriliği olaylarında plasentada görülen üç tip patolojik değişikliğe işaret edildi: 1. İleri olgunlaşma, 2. Çoklu mikroinfarktüsler ve 3. Çok sayıda damarsız villus yapısı. Bu anormalliklerin plasental yetersizliğe, hatta erken doğuma neden olabileceği düşünülmektedir [147].

IUGR, term doğumda 2500g.'dan ya da normal doğumdan %10 daha az doğum ağırlığı olarak tanımlanmaktadır. Fetal büyüme genetik ve çevresel etkenlere bağlıdır, ancak plasenta aracılıdır; plasenta fonksiyonu iyi

ise büyüme iyidir [148]. Büyüme geriliği, eksojen (deksametazon) ya da endojen glukokortikoidler vasıtasıyla oluşmaktadır. İkincisi, 11beta-HSD2' nin inhibe edilmesiyle oluşmaktadır [129]. IUGR' nin bilinmesi önemlidir, çünkü bu durumda neonatal hastalık ve ölüm oranları artmaktadır. Araştırmacıların çoğu yetişkin dönemdeki hastalıkların fetal dönemde programlandığına inanır. Fetal büyümede ve erginde rahimiçi gelişimi etkileyen, değişikliklerin iki ana nedeni vardır: 1. Maternal/fetal beslenme yetersizliği, 2. Hormonal programlanma [129]. Fetal programlanma mekanizmaları, hipotalamus-hipofiz-böbreküstü bezi işleyişi ve dokudaki glukokortikoid reseptör dağılımıyla ilgilidir [129]. Bu programlanma organizmanın pek çok sisteminde, gelişmenin duyarlı dönemlerinde bir faktörün etkisiyle ortaya çıkar ve ömür boyu kalıcı değişikliklere neden olabilir [129]. IUGR sadece plasental faktörlere bağlı değildir. Burada maternal (anne yaşı, enfeksiyon durumu vb.) ve fetal (konjenital anomali vb.) faktörlerin de büyük rolü vardır.

Apoptoz, plasentanın normal gelişmesi için gereklidir [1]. Son çalışmalarda insan plasentasında hem pro- hem de anti-apoptotik proteinlerin birlikte bulunduğu gösterilmiştir [149]. Plasentada apoptozu düzenleyen mekanizmalardaki bazı anormalliklerin sinsisyotrofoblast hücrelerinin fonksiyonlarını engelleyerek materno-fetal transport mekanizmasının bozulmasına yol açtığı [150] ve bunun sonunda da IUGR' nin görüldüğü [151] bilinmektedir. İnsan gebeliğinde apoptoz, daha çok gebeliğin 5–7. haftalarında ve üçüncü trimesterde gerçekleşir [152, 153]. Apoptoz trofoblast hücrelerinde daha çok görüldüğü halde endotel ve stromal hücrelerde daha azdır [1]. IUGR görülen embriyoların plasentalarında villus dejenerasyonuna da apoptoz neden olmaktadır [1]. Kısacası, IUGR ile apoptoz arasında sıkı bir ilişki vardır [1].

Plasental apoptozu tetikleyen fizyolojik sinyaller hakkında çok az bilgi vardır [1]. Pek çok çalışma prenatal dönemde etkili olan faktörlerin, ileriki yaşamda kardiyovasküler ve metabolik düzensizliklerin önemli belirleyicileri olduğunu ortaya koymuştur [129]. Farklı toplumlarda yapılan araştırmalarla düşük doğum ağırlığının yetişkin dönemde hipertansiyon, hiperlipidemi, insülin rezistansı, tip2 diyabet ve iskemik kalp hastalığı ölümlerine yol açtığı belirlenmiştir [154]. Büyük plasentalı küçük bir bebek normal plasentalı büyük bir bebeğe göre, ergin devresinde üç kat daha fazla hipertansiyon riski taşımaktadır [155]. Doğum öncesi glukokortikoide maruz bırakılan kemirgenlerde ve bazı başka türlerde doğum ağırlığının azaldığı, hayat boyunca sürekli hipertansiyon, hiperglisemi, hiperinsülinemi görüldüğü, ayrıca bu hayvanlarda değişik davranışların ve nöroendokrin bozuklukların olduğu görülmüştür [129].

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Denekler

Bu araştırmada Akdeniz Üniversitesi 'Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilen daha önce hiç deneye girmemiş ve çiftleşmemiş ortalama ağırlıkları 250- 300g olan Rattus Norvegicus (Wistar) ırkı 16 dişi ve 8 erkek ergin sıçan kullanıldı. Yapılacak olan deneyler, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Kullanım ve Bakım Kurulu tarafından incelenerek, çalışmanın bilimsel etik çerçevesinde olduğu ve istenen deney hayvanlarının tahsisinin uygun olduğu kararına varıldı. Hayvanlar standart diyet ve musluk suyu ile beslendi. İki dişiye bir erkek olacak şekilde kafeste bir gece bırakıldıktan sonra ertesi sabah hayvanlardan vajinal simir alındı. Simirde spermiyum belirlenenlerin gebeliğın sıfırncı gününde oldukları kabul edildi. Bu hayvanlardan kontrol (8♀) ve deney (8♀) olmak üzere iki çalışma grubu oluşturuldu.

3.2. IUGR Modelinin Oluşturulması

Sıçanda deksametazonla IUGR oluşturulmasında daha önce bildirilen dozlar uygulandı [1, 96, 119]. Gebeliğın 13.gününde deney grubundan her hayvana 0,1ml %10luk etanol içinde 100µg deksametazon asetat (D1881, SIGMA, Almanya) boyun bölgesinden subkutan olarak enjekte edildi. Sonrasında bu hayvanlara 14–19. günler arasında 200µg/kg olacak şekilde deksametazon asetat verilmeye devam edildi. Kontrol hayvanlarına ise 13–19. günler arasında aynı miktarlarda serum fizyolojik (SF) subkutan olarak verildi.

3.3. Doku Temini ve Hazırlanması

Gebeliğın 20. gününde kontrol ve deney grubu hayvanları eter anestezisi altında dişeke edildi. Ve sıçanlar öldürülmeden önce glukokortikoid seviyesini ölçmek için abdominal aortadan heparinli tüplere kan örnekleri alındı. Daha sonra plasentaları ve fetüsleri alınarak tartıldı. Işık mikroskobu için total plasentalardan alınan doku örnekleri Holland fiksatifinde (1000ml distile suda; % 40 lık 100 ml formaldehit + 5 ml glasiyal asetik asit + 40 gr pikrik asit + 2,5 gr bakır asetat) 4 -12 saat, TEM için alınan maternal ve fetal plaseenta doku örnekleri de sıra ile %4'lük gluteraldehitte ve %1'lik OsO₄'te tespit edildi.

3.4. Işık Mikroskobu Çalışma Protokolü

Holland fiksatifinde tespit edilen kontrol ve deney grubu hayvanlarının plaseenta dokusu örnekleri daha sonra 6 – 7 saat akar musluk suyunda yıkandı. Yıkama işlemini takiben dokular sırası ile %70, %80, %90 ve %100'lük alkol serilerinde birer gün tutularak dehidrasyon işleminde geçirildi. Ardından ksilol içinde 3 kez 5 - 7'şer dakikalık şeffaflaştırma işlemini takiben 58°C' ye ayarlı etüvde erimiş parafine konuldu. 3 defa 1'er saatlik parafin banyosunda tutuldu ve etüv dışında temiz erimiş parafinle blokladı.

Kontrol ve deney grubunun parafin bloklarından 5–7 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Yumurta akı sürülmüş lamlara alınan kesitler oryantasyon amacıyla hematoksilen – eozin ile boyandı ve Axioplan, Zeiss (Almanya) ile incelendi. Poli-L-lizin kaplı lamlar üzerine alınan kesitler ise immunohistokimyasal boyamalarda kullanıldı.

3.5. İmmünohistokimyasal Protokol

Poli-L-Lizin kaplı lamlar üzerine alınan parafin kesitler bir gece 56 derecelik etüvde bekletildi. Deparafinasyon için iki kere onar dakika ksilollerden geçirildi ve her birinde beşer dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80 ve % 70'lik alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra, distile suda çalkalandı ve fosfat tuzu tamponunda (PBS, Ph: 7.2 -7.4) üç kere beşer dakika yıkandı. Dokulardaki antijenik maskelenmenin ortadan kaldırılması için kesitler, 200 ml sitrat tamponu (pH:6.0; 900 ml distile suda 2,1 gr sitrik asit) içine alındı ve mikrodalga fırında (931 watt) iki defa 5'er dakika tutuldu. Bu işlemde sonra sitrik asit solüsyonu içerisinde 20 dakika boyunca oda ısısında bekletildi ve dokuların çevresi hidrofobik kalemle çizildikten sonra 3 defa 5'er dakika fosfat tamponlu tuz çözeltisinden (PBS; pH: 7.2-7.4) geçirildi. Bir sonraki basamakta dokulardaki hidrojen peroksidad aktivitesini ortadan kaldırmak için kesitler 20 dakika hidrojen peroksit solüsyonu (Peroxidase blocking reagent, S2001, DakoCytomation, Danimarka) ile muamele edildi. Kesitler 3 defa 5'er dakika PBS'te yıkandıktan sonra dokulardaki özgül olmayan antikor bağlanmasını önlemek amacıyla oda sıcaklığında blokama serumu (Ultra V Block, TA-060-UB, LabVision, Fremont, CA, USA) ile 5 dakika muamele edildi. Serumun fazlası alınarak kesitler, fare-monoklonal anti PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen, sc-56, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), tavşan-poliklonal anti p27 (Anti p27, RB-9019-P, 1:200, NeoMarker, Fremont, CA, USA), tavşan poliklonal anti-siklin E (GTX27959, GeneTex, San Antonio, USA) antikolarıyla oda sıcaklığında bir saat süreyle inkübe edildi. Kontrol kesitlerine uygun serum ya da izotip IgG uygulandı. Kesitler inkübasyondan sonra, 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra sırasıyla 30 dakika biyotinli sekonder antikor (HRP LSAB-2 system, K0609, DakoCytomation, Danimarka) ve 30 dakika streptavidin-peroksidad kompleksi (HRP LSAB-2 system, K0609, DakoCytomation, Danimarka) ile inkübe edildi. Her iki uygulama sonrasında da PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkama yapıldı. Ardından sinyali geliştirmek için dokular amino etil karbozol kromojeni (AEC, K3461, DakoCytomation, Danimarka) ile ortalama 3-5 dakika muamele edildi. Daha sonra kesitler distile suya alındı ve hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Distile suda çalkalandıktan sonra 1–2 dakika akar musluk suyunda yıkandı ve Kaiser' in gliserol jelatini (109242, MERCK, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı. Kontrol ve IUGR gruplarına ait bu kesitler daha sonra Axioplan mikroskopunda (Zeiss, Almanya) PCNA, siklin-E ve p27' nin dağılımlarına ve immunoreaktivite şiddetine bakılarak değerlendirildi ve fotoğraflandırıldı. Kontrol ve IUGR gruplarına ait plasenta kesitlerinde PCNA, p27 ve siklin-E antikoruna immun boyanma yoğunlukları semikantitatif olarak [-: negatif; +: zayıf şiddette; ++: orta şiddette; +++: kuvvetli; ++++: çok kuvvetli şiddette]

değerlendirildi. Ayrıca kontrol ve IUGR gruplarına ait kesitlerde PCNA, p27 ve siklin-E antikoruna ile immünboyanması pozitif olan hücreler labirentte ve bağlantı zonunda sayıldı ve HSCORE değerlerine bakıldı. Bu değerlendirmeler yapılırken Student's t testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı.

3.6. TUNEL protokolü

Plasenta dokusundaki apoptoz, DNA iplikçiklerindeki kırılmaların TUNEL yöntemi ile enzimatik olarak işaretlenmesiyle belirlendi. Polilizinli lamlara plasenta dokusundan 5µm kalınlığında parafin kesitler alınarak kurutuldu sonrasında lamlar etüvde gece boyu 45 °C' de ve takiben 60°C' de 1 saat bırakıldı. Deparafinizasyon ve rehidratasyondan sonra lamlar PBS te iki kere 5 dakika yıkandı. 4°C' de lamların permeabilizasyon solüsyonu (0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate) ile 8 dakika inkübasyonundan ve PBS ile iki kere 5 dakika yıkanmasından sonra enzimsiz ajan eklenen ve 37°C' de 1 saat inkübe edilen negatif kontrol haricinde her kesit için 50µl TUNEL ajanı kullanılarak işaretleme reaksiyonu gerçekleştirildi. PBS yıkamalarından sonra lamlar 37°C' de dönüştürücü ajan ile 30 dakika inkübe edildi. Yıkamadan sonra işaretli DNA iplikçığı kırıkları içeren hücrelerin lokalizasyonu için renk geliştirme işlemi, lamları Fast Red substrat solüsyonu ile 10 dakika inkübe ederek gerçekleştirildi. TUNEL metodu ile işaretleme bir Cell Death Detection Kit (Hücre Ölüm Belirleme Kiti, 1684809, Roche, Mannheim, Germany) ile ve de üreticinin talimatları doğrultusunda yapıldı.

TUNEL yöntemiyle pozitif boyanan apoptotik hücrelerin toplam alandaki sayısı belirlenerek dokudaki apoptotik indeks % olarak belirlendi. Deney ve kontrol gruplarından elde edilen apoptotik indeks sonuçları arasında student's t-test yapıldı. Böylece anlamlı bir fark olup olmadığı anlaşıldı.

3.7. TEM Çalışma Protokolü

TEM çalışması için toplanan kontrol ve deney grubuna ait plasental doku örnekleri pre ve postfiksasyon sonrasında %6,5'lik sakkoroz çözeltisinde yıkandı ve sonrasında dehidratasyona geçildi. Dehidratasyonun ilk aşamasında %70' lik alkolde gece boyu bırakılan dokular, ertesi sabah %80' lik alkole alınmadan önce dokuya kontrast vermek için %1' lik uranil asetat ile 1 saat inkübe edildi. Dehidratasyon ise uranil asetat aşamasından sonra, artan alkol serileri ile propilenoksite kadar devam ettirildi. Bu aşamadan sonra eşit hacimlerde alınarak hazırlanan propilenoksit-araldit (Araldit CY 212, DDSA, BDMA) karışımında dokular oda sıcaklığında, rotatorda 1 gece bırakıldı. Ertesi gün, dokular araldit solüsyonuna alınarak rotatorda 4 saat bırakıldı. Daha sonra araldite gömülen dokular polimerizasyon için 60 derecelik etüvde 48 saat bekletildi. Elde edilen doku bloklarından ultramikrotom ile 300 nanometrelik kalın ve 700 angstrom'luk ince kesitler alındı. TEM' de kontrol ve IUGR gruplarına ait plasentaların maternal ve fetal kısmındaki değişikliklere ince yapı düzeyinde bakıldı ve fotoğraflandırıldı.

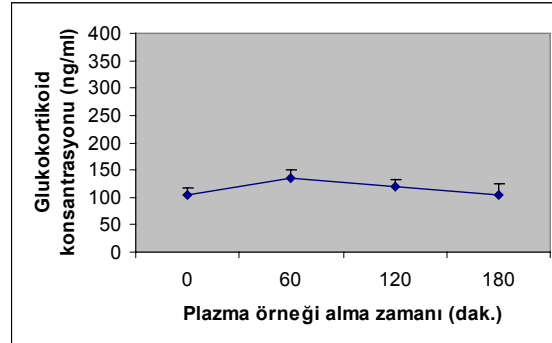
BULGULAR

4.1. Glukokortikoid Konsantrasyonu Ölçümü, Plasenta ve Embriyo Ağırlıkları ile Fetüs Sayımı

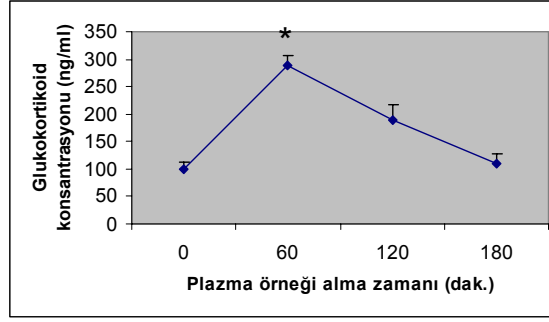
IUGR' nin oluşturulması aşamasında deney grubu hayvanlarının glukokortikoid aldıklarından emin olmak için deney ve kontrol grubu hayvanlarından kan örnekleri alınarak eliza kitiyle (Corticosterone enzyme immunoassay kit, Assay Designs, MI, USA) glukokortikoid ölçümleri yapıldı. Kontrol grubuna SF ve deney grubuna deksametazon enjeksiyonundan hemen önce ve enjeksiyonu takiben 60., 120., ve 180. dakikalarda hayvanların kuyruklarından kan örnekleri alındı. Ölçümler neticesinde kontrol grubu hayvanlarının plazma glukokortikoid seviyelerinde 180 dakikada bir değişiklik olmadığı, deney grubu hayvanlarında ise istatistiksel olarak anlamlılık derecesinde ciddi bir artıştan sonra glukokortikoid seviyelerinin normale döndüğü görüldü ($p < 0,001$) (Şekil 4.1.1, Şekil 4.1.2). Bu sonuca göre hayvanlara verilen deksametazonun yaklaşık üç saat içerisinde metabolize olduğu ve etkisini bu süre zarfında gösterdiği anlaşıldı.

Gebeliğin 20. gününde olan kontrol ve deney hayvanlarından alınan plasenta ve embriyoların tartıları alındı. Keza her hayvana ait embriyolar sayıldı. Plasenta ve embriyo ağırlıkları ile embriyo sayılarının kontrol ve deney gruplarına ait histogramlar yapıldı.

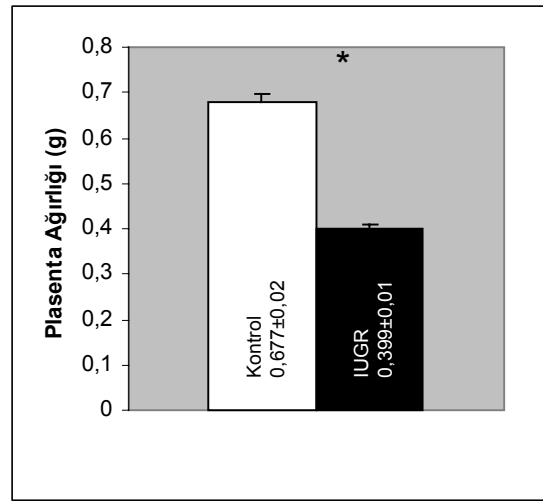
Kontrol grubunun ortalama plasenta ve embriyo ağırlıklarının deney grubuna göre istatistiksel önemlilikte yüksek olduğu belirlendi ($p < 0,005$) (Şekil 4.1.3, Şekil 4.1.4). Kontrol grubunun ortalama embriyo sayısı deney grubuna göre biraz daha yüksek olsa da aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli değildi (Şekil 4.1.5). Sonuçta, subkutan olarak verilen deksametazonun plasentada ve embriyoda ağırlık kaybına neden olduğu, ancak embriyo sayısını etkilemediği görüldü.



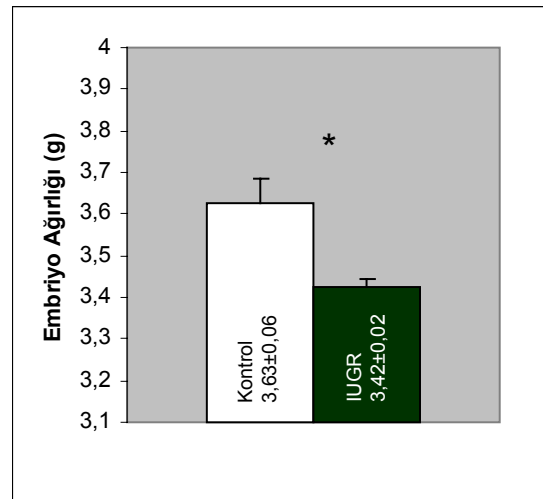
Şekil 4.1.1. Serum fizyolojik verildikten sonra kontrol grubu hayvanlarının plazma glukokortikoid konsantrasyonu değişimi grafiği.



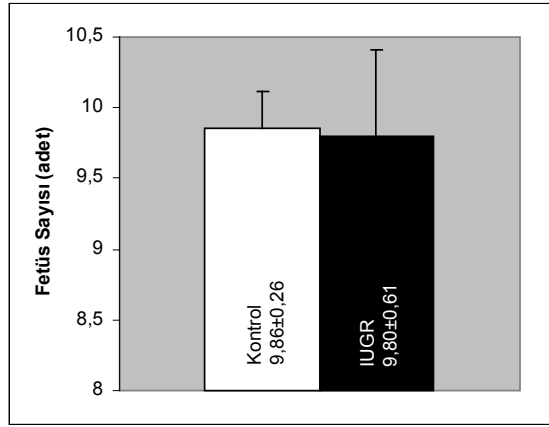
Şekil 4.1.2. Deksametazon verildikten sonra deney grubu hayvanlarının **plazma glukokortikoid konsantrasyonu değişimi** grafiği. (* $p < 0,001$)



Şekil 4.1.3. Kontrol ve deney grubuna ait **sıçan plasenta ağırlıklarının** histogramı (* $p < 0,001$).



Şekil 4.1.4. Kontrol ve deney grubuna ait **sıçan embriyosu ağırlıklarının** histogramı (* $p < 0,005$).

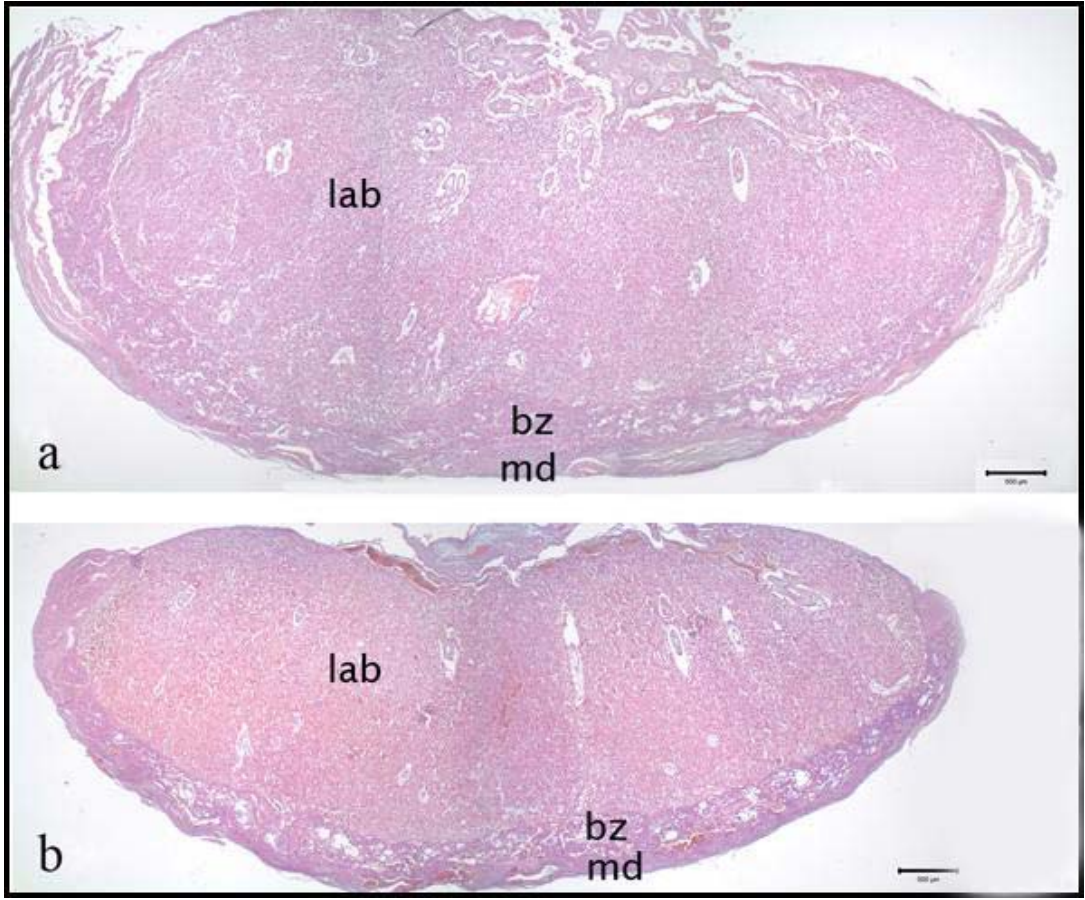


Şekil 4.1.5. Kontrol ve deney grubuna ait **sıçan fetüsü sayılarının** histogramı (p=0,525).

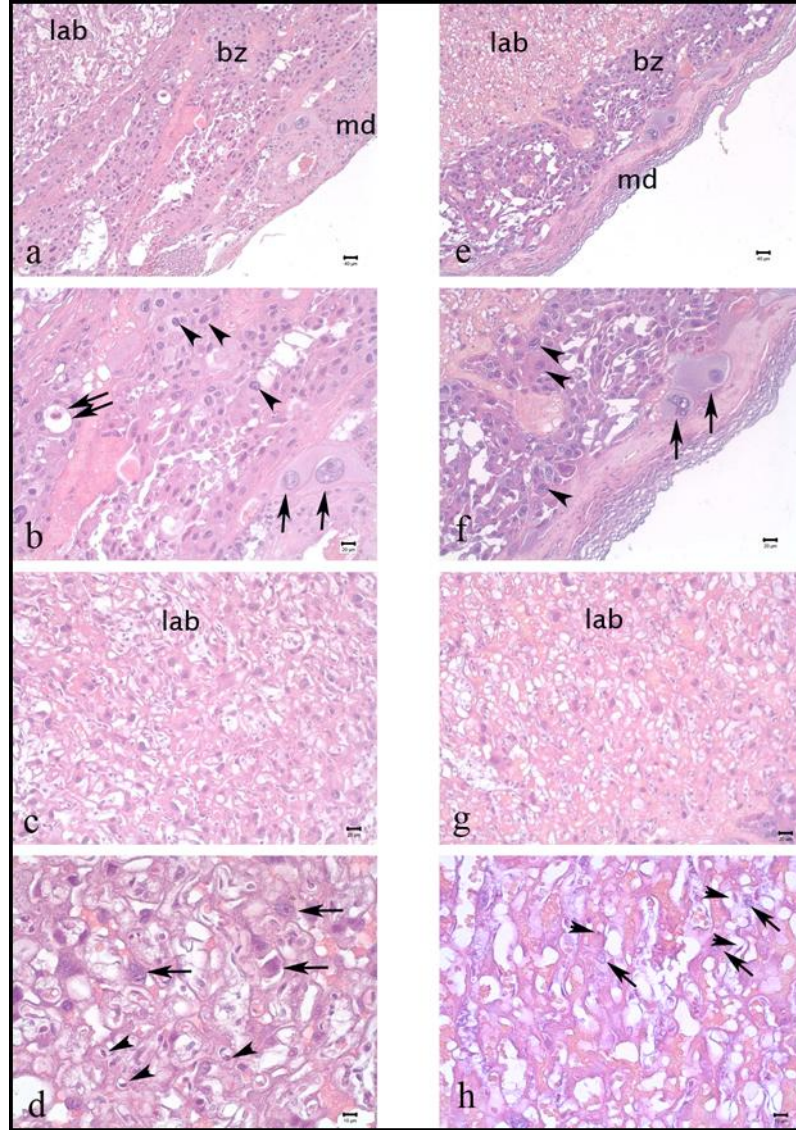
4.2. Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol ve deney grubunun 20 günlük sıçan plasentası kesitlerinde hematoksilin eozin boyaması ile iki kısım ayırt edildi: Labirent tabakası ve bağlantı zonu. Labirent tabakası fetal ve maternal kan sisternalarından zengindi. Sisternalarda çekirdeksiz eritrositler görüldü. Labirent tabakasını maternal desidua yönünde spongiyotrofoblast tabakası ile trofoblast dev hücreleri izlemekteydi. Dıştan trofoblast dev hücreleri ile sarılmış spongiyotrofoblast tabakasında sadece maternal kan adacıkları vardı (Şekil 4.2.2)

Subkutan enjeksiyonla deksametazon verilen sıçan plasentası, kontrol sıçanı plasentasından gözle fark edilebilecek derecede daha küçüktü (Şekil 4.2.1). Bu durum labirent tabakası ve bağlantı zonu için de geçerliydi. Labirent tabakası normal görünümdeydi. Labirent tabakası ile spongiyotrofoblast tabakası arasındaki ilişki normaldi. Labirent tabakasında hücre sayısında da kontrole göre görünüşte bir azalma vardı. Labirent kısmında baskın hücre tipi trofoblasttı. Bağlantı zonunda spongiyotrofoblast ve trofoblast dev hücreleri ile birlikte az sayıda glikojenik hücre görüldü (Şekil 4.2.2)



Şekil 4.2.1. Kontrol (a) ve deney (b) grubunun plasentalarında labirent (lab), bağlantı zonu (bz) ve maternal desidua (md) görülmektedir. Kontrol plasentasının labirent kısmı ve bağlantı zonu deney grubunun aynı kısımlarına göre daha büyüktür. Hematoksilen-Eozin (HxE). **Bar:**500µm.



Şekil 4.2.2.Kontrol (a-d) ve deney (e-h) grubu plasentalarının bağlantı zonu (bz) ve labirent kısımları (lab). Kontrol grubu plasentası: **a, b** bağlantı zonunda spongiyotrofoblastlar (ok başları), trofoblast dev hücreleri (tek oklar) ve glikojenik hücre (çift ok) **c, d** labirent kısmında trofoblast hücreleri (tek oklar) ve fetal endotel hücreleri (ok başları) görülmektedir. Deney grubu plasentası: **e, f** bağlantı zonunda spongiyotrofoblastlar (ok başları) ve trofoblast dev hücreleri (tek oklar) seçilebilmektedir. **g, h** labirent kısmında trofoblast hücreleri (tek oklar) ve fetal endotel hücreleri (ok başları) görülmektedir. md: maternal desidua. Hematoksilen-Eozin. **Barlar:** a,e: 40µm. b,f,c,g: 20µm. d,h: 10µm..

4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

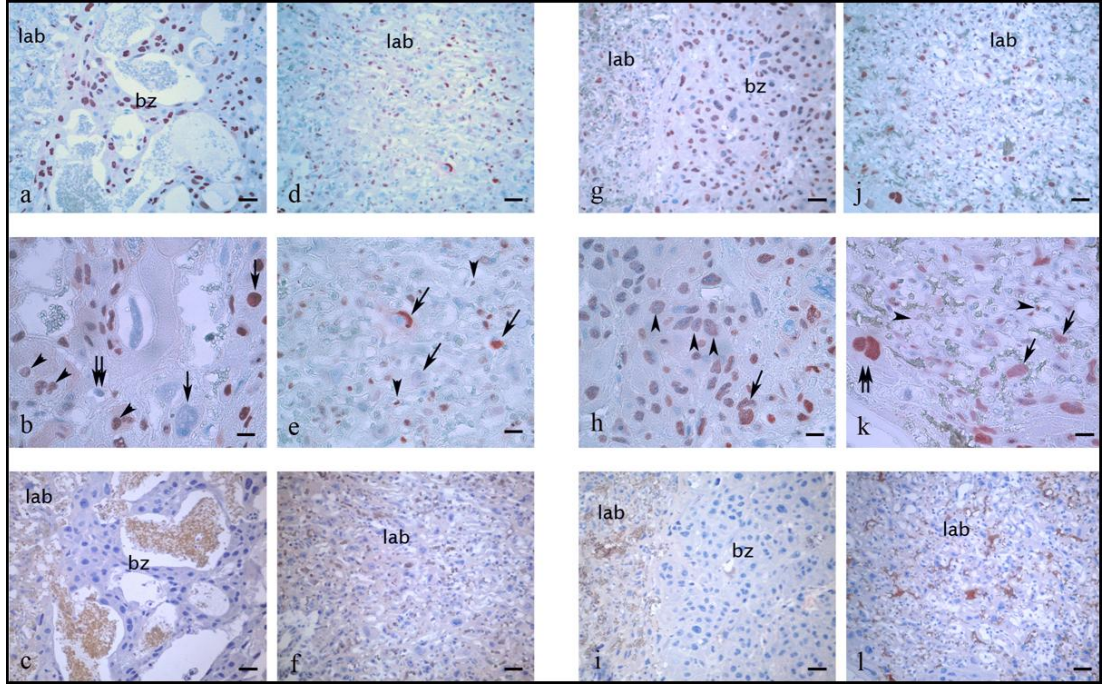
Kontrol ve deksametazon uygulanan 20 günlük sıçan plasentasında PCNA ve p27 antikollarının immünboyanma yoğunluklarına semikantitatif olarak, keza PCNA ve p27 pozitif hücre sıklığı HSCORE değerlerine bakıldı.

Çalışmamızın “Giriş ve Amaç” ve “Gereç ve Yöntem” bölümlerinde belirtildiği gibi çalışılması planlanan anti-siklinE proteininin kullanım klavuzunda “sıçanlarda reaksiyon verir” ifadesi yer almasına rağmen tüm denemelerimizde reaksiyon vermemiştir. Bu yüzden bu protein çalışılmamış ve değerlendirilememiştir.

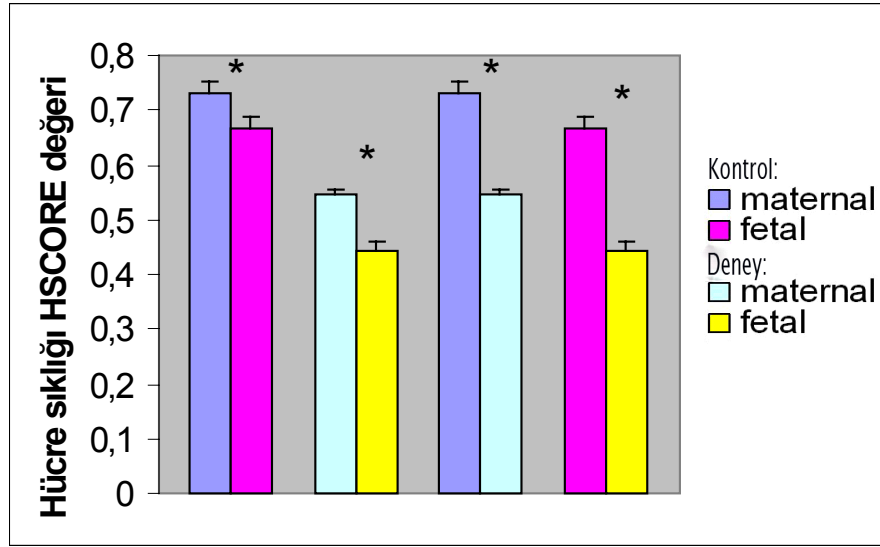
4.3.1. PCNA İmmünboyanması

PCNA immünreaksiyonu kontrol grubu plasentasının labirent tabakasındaki trofoblast hücrelerinde çok kuvvetli, deney grubunda ise orta şiddetteydi. Kontrol grubunda labirent tabakasının fetal endotel hücrelerinde orta şiddette olan PCNA immünboyanma reaksiyonu deney grubunda da değişmedi. Kontrol grubu plasentasının bağlantı zonunda spongiyotrofoblast ve trofoblast dev hücrelerinde PCNA immünreaksiyonu çok kuvvetliydi. Deney grubunun PCNA immünreaksiyon şiddetinde düşme vardı ve spongiyotrofoblast ve trofoblast dev hücreleri orta şiddette PCNA pozitif boyanmıştı (Tablo 4.1, Şekil 4.3.1.1).

Genel olarak bakıldığında kontrol ve deney grubunda PCNA HSCORE değerlerinin siklin-D3 HSCORE değerlerine benzer değişiklikler gösterdiği görülmektedir. Kontrol ya da deney grubuna ait plasentaların maternal kısımlarının PCNA HSCORE değerleri fetal kısımların değerlerinden daha yüksektir ve aralarındaki farklar istatistikî olarak da önemlidir ($p < 0,05$). Kontrol ve deney gruplarının bu bölgelerdeki HSCORE değerlerine göre kontrol maternal ve kontrol fetal değerlerin ayrı ayrı deney maternal ve deney fetal HSCORE değerlerinden daha yüksektir ve aralarındaki farklar da istatistikî olarak anlamlıdır ($p < 0,001$). HSCORE değerlerine göre kontrol grubunun hem maternal hem de fetal bölgesinde PCNA pozitif boyanmış hücre sayısı deney grubunun aynı bölgelerine göre daha fazla olduğu görülmektedir (Tablo 4.2, Şekil 4.3.1.2).



Şekil 4.3.1.1. Kontrol (a-f) ve deney (g-l) grubu plasentalarının **PCNA immünboyanmaları**. Kontrol grubu plasentası: **a-c** bağlantı zonunda (bz) spongiyotrofoblastlarda (ok başı) ve trofoblast dev hücrelerde (tek oklar) çok kuvvetli PCNA immünreaksiyonu görüldüğü halde, glikojenik hücrelerde (çift ok) reaksiyon yoktur. **d-f** labirent kısmında (lab) trofoblast hücrelerinde (tek oklar) çok kuvvetli, fetal endotel hücrelerinde (ok başları) ise orta şiddette immünreaksiyon görülmektedir. Deney grubu plasentası: **g-i** bağlantı zonunda spongiyotrofoblastların (ok başları) ve trofoblast dev hücrelerinin (tek ok) PCNA immünreaksiyonu şiddeti kontrole göre daha az ve orta şiddettedir. **j-l** labirent kısmında trofoblast hücrelerinin (tek oklar) PCNA immünreaksiyonu kontrole göre zayıftır, fakat fetal endotel hücrelerinin (ok başları) immünreaksiyonunda bir değişiklik olmamıştır. (k)' da bağlantı zonuna ait bir trofoblast dev hücresi (çift ok) görülmektedir. **c, f, i, l**: Negatif kontrollar. **Barlar:** a, c, d, f, g, i, j, l : 20µm. b, e, h, k : 10µm.

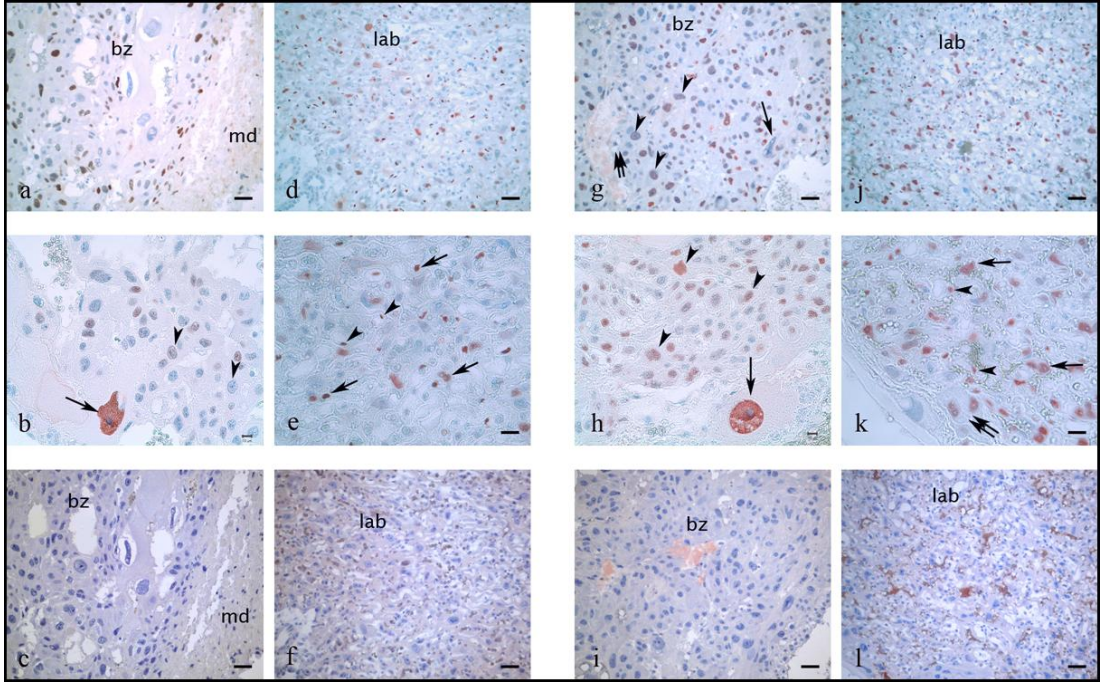


Şekil 4.3.1.2.Kontrol ve deney grubunun sıçan plasentasında maternal ve fetal kısımların **PCNA pozitif hücre sıklığı** HSCORE değerleri histogramı (*p<0,001).

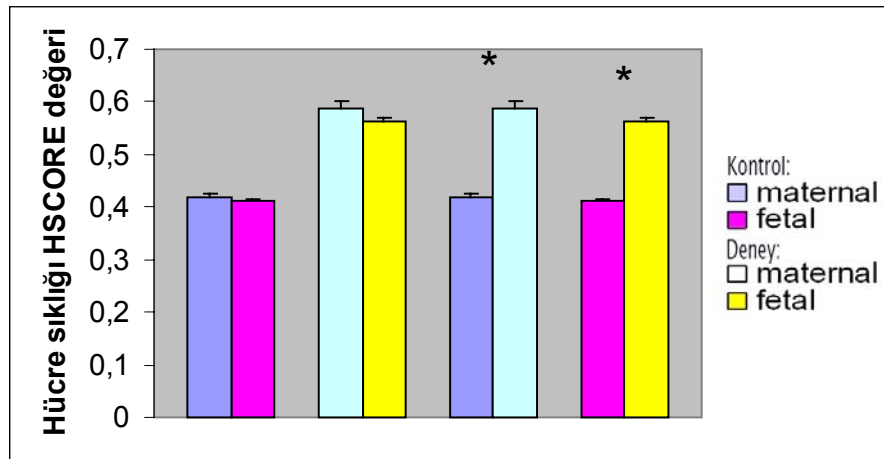
4.3.2. P27 İmmünboyanması

Kontrol grubunun labirent tabakasında trofoblast hücreleri p27 antikoru ile orta, deney grubunda ise kuvvetli boyanmıştı. Fetal endotel hücreleri deney grubunda kuvvetli kontrol grubunda da orta şiddette p27 immünreaksiyonu gösterdi. Bağlantı zonunda da spongiyotrofoblast ve trofoblast dev hücrelerinde kontrolde orta, deneyde kuvvetli şiddette p27 immünreaksiyonu vardı (Tablo 4.1, Şekil 4.3.2.1).

P27 pozitif hücre sıklığı HSCORE değerlerindeki değişiklikler siklin-D3 ve PCNA HSCORE değerlerine göre daha farklıdır. Kontrol grubunun maternal ve fetal kısımlarının p27 HSCORE değerleri birbirine oldukça yakındır. Maternal kısımda biraz yüksek olsa da aralarındaki fark istatistikî yönden anlamsızdır. Aynı durum deney grubunun plasentasında maternal ve fetal kısımlardaki p27 HSCORE değerleri için geçerlidir. Kontrol ve deney gruplarının p27 HSCORE değerleri karşılaştırıldığında aralarında istatistikî yönden önemli farklar vardır. Deney grubunun maternal ya da fetal kısmının HSCORE değeri kontrol grubunun maternal ya da fetal kısmının HSCORE değerinden daha yüksektir. Aralarındaki fark istatistikî olarak da anlamlıdır (p<0,001). Deksametazon uygulanan sıçan plasentasının maternal ve fetal kısımlarında kontrol sıçanı plasentasının aynı bölgelerine göre p27 pozitif hücre sayısı önemlilik düzeyinde daha yüksektir (Tablo 4.2, Şekil 4.3.2.2).



Şekil 4.3.2.1.Kontrol (a-f) ve deney (g-l) grubu plasentalarının **p27 immünboyanmaları.** Kontrol grubu plasentası: **a-c** bağlantı zonunda (bz) spongiyotrofoblastlarda (ok başları) ve trofoblast dev hücrelerde (tek ok) kuvvetli, **d-f** labirent kısmında (lab) trofoblast hücrelerinde (tek oklar) kuvvetli, fetal endotel hücrelerinde (ok başları) ise orta şiddette p27 immünreaksiyonu görülmektedir. Deney grubu plasentası: **g-i** bağlantı zonunda spongiyotrofoblastların (ok başları) ve trofoblast dev hücrelerin (tek oklar) p27 immünreaksiyonu kontrole göre kuvvetlidir. Glikojenik hücrelerde (çift ok) immünreaksiyon yoktur. **j-l** labirent kısmı trofoblast hücrelerinin(tek oklar) p27 immünreaksiyonu kontrolden farklı değildir fakat fetal endotel hücrelerinin (ok başları) immünreaksiyonunda artış görülmektedir. (k)' da bağlantı zonuna ait bir trofoblast dev hücresi (çift ok). **c, f, i, l:** Negatif kontroller. **Barlar:** a, c, d, f, g, i, j, l : 20µm. b, e, h, k : 10µm.



Şekil 4.3.2.2.Kontrol ve deney grubunun sıçan plasentasında maternal ve fetal kısımların **p27 pozitif hücre sıklığı HSCORE** değerleri histogramı (*p<0,001).

Tablo 4.1. Kontrol ve deney grubunun sıçan plasentasında labirent ve bağlantı zonundaki hücrelerin PCNA ve p27 antikorlarıyla immünboyanma yoğunluklarının semikantitatif sonuçları. -: negatif, +: zayıf pozitif, ++: orta pozitif, +++: kuvvetli pozitif, ++++: çok kuvvetli pozitif.

		LABİRENT TABAKASI		BAĞLANTI ZONU		
		Trofoblast Hücresi	Fetal Endotel hücresi	Spongiyo Trofoblast Hücre	Glikojenik Hücre	Trofoblast Dev Hücre
KONTROL	PCNA	++++	++	++++	-	++++
	p27	++	++	++	-	++
DENEY	PCNA	++	++	++	-	++
	p27	+++	+++	+++	-	+++

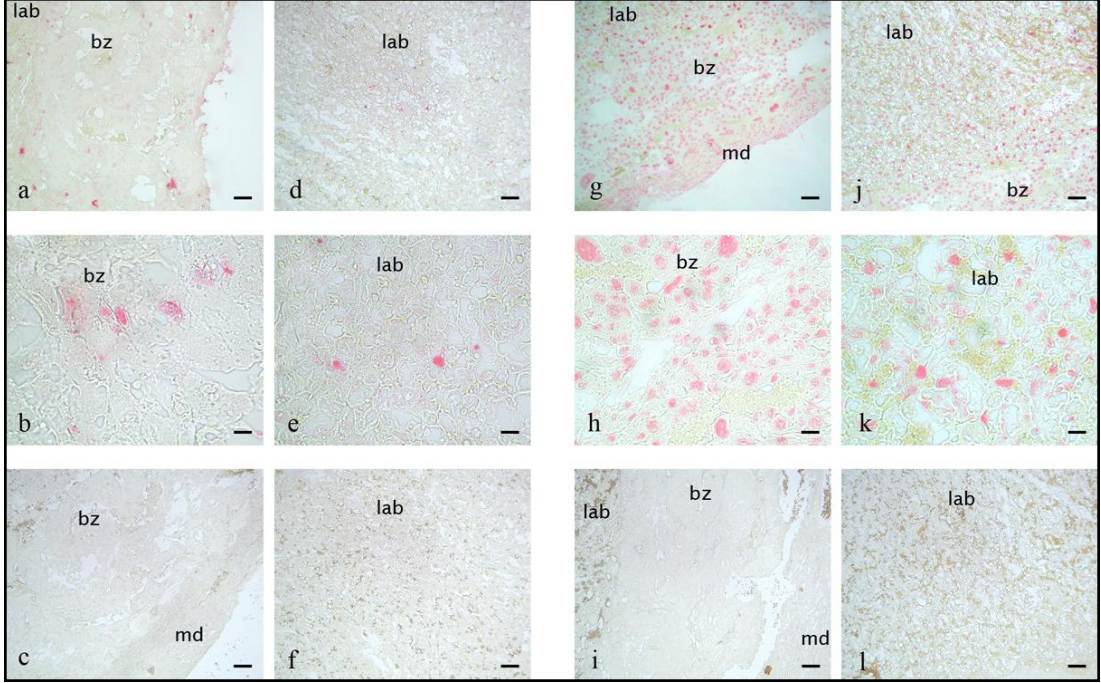
Tablo 4.2. Kontrol ve deney grubunun 20 günlük sıçan plasentasında PCNA ve p27 antikor pozitif hücre sıklığı HSCORE değerleri. PCNA HSCORE değerleri kendi grubu içinde ya da kontrol ve deney grupları arasında, p27 HSCORE değerleri ise sadece kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıdır (* p<0,001, ** p<0,05).

	KONTROL		DENEY	
	Maternal Kısım	Fetal Kısım	Maternal Kısım	Fetal Kısım
PCNA	0,733±0,019 **	0,667±0,016 **	0,545±0,010 *	0,441±0,018 *
P27	0,420±0,005 *	0,411±0,003	0,589±0,013 *	0,564±0,006

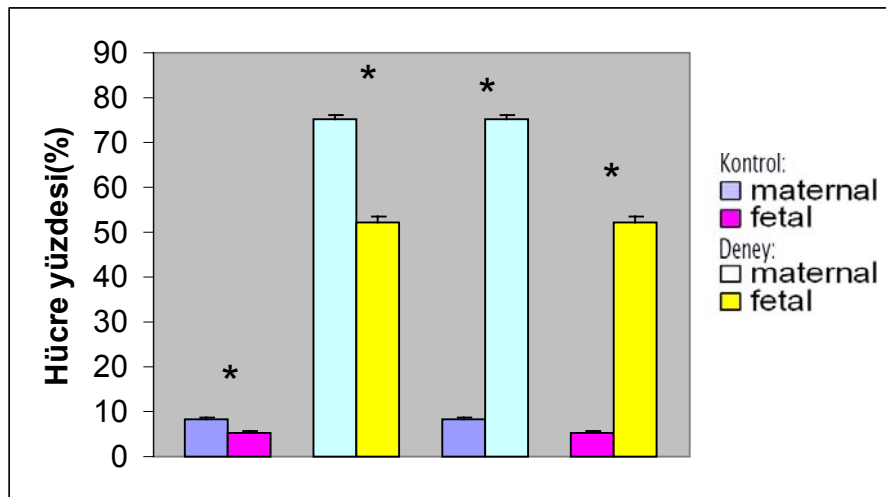
4.4. TUNEL Boyanması

Kontrol ve deney grubunun sıçan plasentasında TUNEL boyanmış kesitlerin maternal ve fetal kısımlarında, x400 büyütmede bağımsız iki gözlemci tarafından apoptotik hücre sayımı yapılarak, apoptotik hücre yüzdesi hesaplandı. Apoptotik hücreler, gereç ve yöntem bölümünde detaylı olarak anlatılan TUNEL pozitif hücreler olarak belirlendi. Şekil 4.4.2' de görüldüğü gibi hem kontrol hem de deney grubunun plasentasında apoptoz gösteren maternal kısmın TUNEL pozitif hücre sayısı değerleri (apoptotik indeks (AI)) fetal kısmına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir

($p < 0,001$). Kontrol ve deney gruplarının AI değerleri karşılaştırıldığında, deney grubunun maternal ve fetal plasenta kısımlarına ait AI değerlerinin, kontrol grubunun maternal ve fetal kısımlarının değerlerine göre daha yüksek olduğu ve bu değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak da anlamlı bulunduğu görüldü ($p < 0,001$) (Şekil 4.4.1, Şekil 4.4.2).



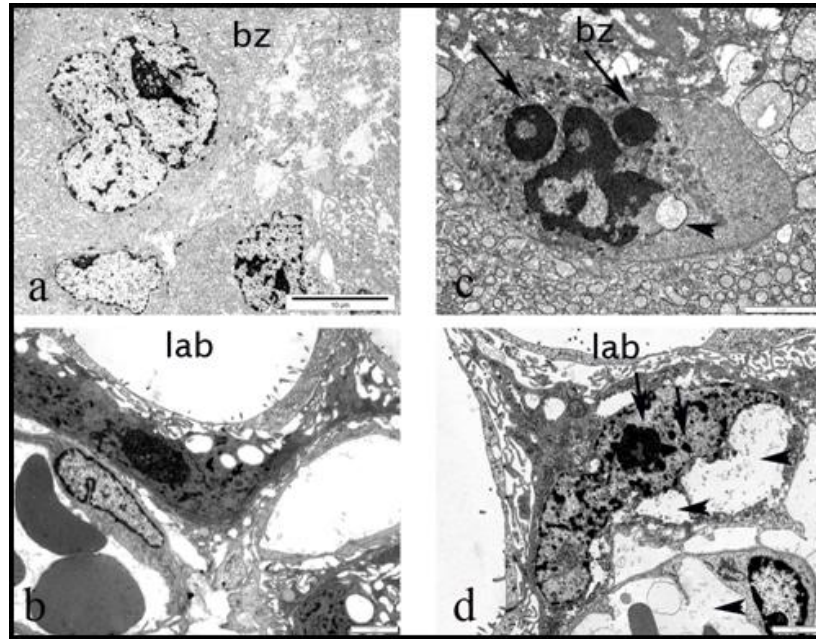
Şekil 4.4.1. Kontrol (a-f) ve deney (g-l) grubu plasentalarının **TUNEL boyamaları**. Kontrol ve deney hayvanı plasentalarında (a-c) ve (g-i) bağlantı (bz), (d-f) ve (j-l) labirent (lab) zonlarıdır. **c, f, i, l:** Negatif kontroller. **Barlar:** a, c, d, f, g, i, j, l : 40 μ m. b, e, h, k : 10 μ m.



Şekil 4.4.2. Kontrol ve deney grubunun sıçan plasentasında maternal ve fetal kısımların **TUNEL pozitif hücre yüzdesi HSCORE değerleri** histogramı (* $p < 0,001$).

4.5. TEM Bulguları

Kontrol ve deney grubu hayvanları plasentalarının ince kesitleri transmisyon elektron mikroskopunda (Zeiss LEO 906E TEM, Oberkochen, Almanya) incelendi. Kontrol hayvanı plasentasında bağlantı zonunda spongiyotrofoblast, labirent kısmında trofoblast ve fetal endotel hücreleri genelde normal morfolojiydi (Şekil 4.5.1a ve b). Kontrol grubunun aksine deney hayvanı plasentasında apoptoz için tipik çekirdek değişiklikleriyle karakterize büzülmüş bazı spongiyotrofoblast ve trofoblast hücreleri gözlemlendi. Büzülmüş ve koyu boyanan bu tip hücrelerde çekirdek periferinde yoğun kromatin yapısı ve vakuolden zengin bir sitoplazma vardı. Keza çekirdek kromatini fragmanları taşıyan apoptotik cisimler dikkat çekmekteydi (Şekil 4.5.1c ve d). TEM’ de apoptotik hücre morfolojisi gösteren bu bulgular ışık mikroskopu düzeyinde TUNEL bulgularını da doğrulamaktaydı.



Şekil 4.5.1.Kontrol (a, b) ve deney (c, d) grubuna ait plasentaların bağlantı zonu (bz) ve labirent kısımlarının (lab) elektron mikrografları. **a:** Kontrol grubu bağlantı zonunda normal sitoplazması ve çekirdeği olan spongiyotrofoblastlar, **b:** labirent kısmında normal trofoblast ve fetal endotel hücreleri görülmektedir. **c:** Deney grubu plasentası bağlantı zonunda, çekirdekte aşırı kromatin yoğunlaşması, parçalanma (tek oklar) ve bozulma (ok başı) görülen bir spongiyotrofoblast hücresi ve **d:** labirent kısmında aynı özellikleri taşıyan (çekirdekte parçalanma-tek oklar) vakuolden (ok başları) zengin sitoplazmalı bir trofoblast hücresi görülmektedir. **Barlar:** a: 10µm, b, c, d: 2µm.

TARTIŞMA

Plasenta, büyüme hormonları ve büyümeyi düzenleyici hormonlar üreterek fetal büyümeyi düzenler. Örneğin; insan plasental laktojen hormonu plasentanın sinsisyotrofoblast hücreleri tarafından salgılanarak fetüste IGF üretimini uyarır ve fetal dokulara besin ulaşımını artırır. Böylelikle fetal büyümeyi düzenler [112].

Maternal ve fetal yapılarıdaki gebeliğe bağlı düzenlenmeler trofoblast hücrelerinin endokrin fonksiyonu tarafından organize edilir [156]. Trofoblast hücreleri farklılaştıkça hormonları, sitokinleri ve büyüme faktörlerini üretme kapasitesi kazanırlar [44, 157].

Pek çok türde fetüs boyutu plasenta boyutuyla orantılıdır. Maternal yanlış beslenmede ya da plasental kan akışındaki bir anormallikten dolayı plasenta boyutu küçük kalırsa sıklıkla fetüste küçük kalır. Küçük kalmış ya da fonksiyon bozukluğu gösteren bir plasenta düşük doğum ağırlığı ile ilişkilendirilir [141].

Term doğumda normal fetüslere göre %10 ve daha altı ağırlıkta doğan fetüslere IUGR teşhisi konur [112]. IUGR' nin yetişkinlerde tip2 diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi, insülin rezistansı ve koroner damar hastalıklarına yol açtığı bildirilmiştir [154].

Spongiyotrofoblast hücrelerinin gelişimindeki aksaklıklar, maternal deksametazon uygulanması indükeli plasental endokrin fenotipinde merkezi bir rol oynayabilir. İlginçtir ki spongiyotrofoblast hücrelerinin dismorfik gelişimi aynı zamanda hibrid ve klon plasentalarının da karakteristiğidir [158, 159].

IUGR görülen insan fetüslerinde fetal kortizol seviyesi yüksek çıkmıştır [160]. Kortizol plasenta boyutunu da etkilemektedir [161]. Kadın doğumda pratikte glukokortikoidler çok önemlidir, çünkü çeşitli organların (özellikle akciğer, kalp, böbrek ve sindirim sistemi) olgunlaşma hızını artırmaktadır [93].

Glukokortikoidler hücre proliferasyonunu ve apoptozu etkilemek için kullanılır fakat etkisi dokuya özeldir. Bu yüzden bir dokudan diğerine etki tahmin edilemez. Örneğin, deksametazonun insan gastrik kanser hücrelerinde apoptozu baskıladığı gösterilmiştir [162] fakat çoklu miyeloma hücrelerinde ve lenfoid hücrelerde apoptozu artırmaktadır [163]. GC' ler aynı zamanda seçilmemiş timosit klonlarının apoptozuna da katılırlar [164].

Fetal glukokortikoid seviyesi maternalden düşüktür [165]. Bu, kortizolü kortizona çeviren 11beta-HSD2 tarafından sağlanır [166]. Ancak bu enzim tamamiyle bir bariyer değildir [123]. Anneye aşırı glukokortikoid vererek

11beta-HSD2' yi göreceli olarak yetersiz bırakmak fetüste büyüme geriliği oluşturabilir [4]. İnsanda 11beta-HSD2 geninin zararlı mutasyonları çok düşük doğum ağırlığı ile ilişkilendirilmiştir [130]. Sıçanlarda da 11 beta-HSD inhibisyonu deksametazona benzer sonuçlar doğurmuştur [5].

Geçtiğimiz yıllarda pek çok bulgu, fetal büyüme geriliğinin yetersiz besin sağlanmasına karşı bir adaptasyon olduğuna odaklanmıştır. Bu fetüslerin yaklaşık tamamının plazma glikoz konsantrasyonları normale göre daha düşüktür [167, 168]. Maternal glikoz az olduğunda fetal hipoglisemi, fetal adaptasyon ve hayatı idame ettirme için önemli pek çok sonuç doğurur. Fetal hipoglisemi ilkin maternal/fetal glikoz konsantrasyon gradiyentini devam ettirir ve böylece plasentadan fetüse glikoz geçişi sağlanır [169]. Ek olarak, doku glikoz kullanımını sınırlarken aynı zamanda insülin salınımını da sınırlar. Bu, ilkin fetal glikoz üretiminin gerçekleşmesine yol açsa da sonraları hipoglisemi ile birleşerek artan protein yıkımına ve azalan protein yapımına sebep olur [170]. Fetal hipoglisemi maternal glikoz kaynağındaki bir düşüğe karşılık sağlanan besin miktarını artırmak ve fetal besin ihtiyacını azaltmak için çalışır. Bu koşullarda oluşan IUGR fetal hayatı idame ettirmek için başarılı bir adaptasyon olarak görülür [112].

Deksametazon indükeli IUGR plasentasında plasental VEGF dağılımında ve buna bağlı olarak plasental damarlanmada da azalma görülmüştür [171]

Başka organlarda olduğu gibi plasentada da hücre gelişimi ve fonksiyonu hücre proliferasyonu, hücre olgunlaşması ve hücre ölümü arasındaki dengeye dayalıdır. Önceki çalışmalar IUGR gebeliklerinde plasental apoptozun olası rolünden bahsetmişlerdir [172]

Memeli hücre proliferasyonunun en iyi bilinen düzenleyicileri D-tip siklinlerdir (D1, D2, D3) ve G1 siklinleri olarak bilinirler. Bunlar hücre proliferasyonunun ve hücre döngüsünde G1/S fazı geçişinin anahtar düzenleyicileri olarak kabul edilirler [173]. Bu proteinler etkilerini özel siklin-bağımlı kinazların (Cdk-2, -4, -5 ve -6) katalitik alt birimlerine bağlanarak gösterirler [174]. Bu siklin proteinlerinin G1 fazının ilerlemesinde pozitif bir düzenleyici olarak görev yapmaları için p34^{Cdk-4} ve p38^{Cdk-6} holoenzimleriyle birleşmeleri özellikle önemlidir. D-tip siklinlerin etkileri retinoblastoma proteinlerinden (pRb) olumsuz etkilenir, G1 fazında ilerleme için pRb proteinlerinin fosforilasyonla inaktive edilmesi gerekir [175].

Hücre döngüsünde geç G1' den S fazına kadar olan periyot çok önemlidir. Hücrelerin proliferere olup olmayacakları geç G1 fazındaki kontrol noktasında belirlenir. Bir kere S fazına girdiklerinde kendi istekleriyle proliferasyonu durduramazlar. Bu noktada en temel protein pRb' dir. pRb aktif formunda fosforile değildir ve aktif pRb, inaktif yapmak için E2F' ye bağlanır. E2F, DNA sentezi için gerekli olan hücresel genlerin transkripsiyonuyla ilgilidir. Kontrol noktasından önce pRb fosforilasyonla

inaktif hale geçerse E2F serbest kalır ve hücreler proliferasyon için S fazına girerler [176].

Bu çalışmada, gebeliğin 13. gününden 20. gününe kadar subkutan olarak uygulanan deksametazonun sıçanlarda intrauterin büyüme geriliği oluşturduğunu gözledik. IUGR oluşan hayvanlarda plasenta ve fetüs ağırlıkları kontrole göre daha azdı. Ayrıca hücre siklusu inhibisyon belirteçlerinden p27' nin deney grubunda kontrole göre istatistikî olarak anlamlı derecede arttığını, PCNA' nın ise anlamlı derecede azaldığını belirledik.

Siklin-D1 Cdk4 yada Cdk6 ile, Siklin-E' de Cdk2 ile birleşerek kompleks kurarlar ve pRb' yi fosforillerler. Hücre S fazına girdikten sonra siklin-A-Cdk2 kompleksi pRb' yi fosforilemeye M fazının sonuna kadar devam eder [176]. 2004 yılında yapılan bir çalışmada Karpas 707 ve U-1958 hücrelerinde rapamisin indükeli G0/G1 tutuklanmasında p27 dağılımının artmış, siklin-D2,-D3 dağılımının azalmış olduğu gösterilmiştir [177]. Çalışmamızda p27 ile ilgili elde ettiğimiz bulgular bahsedilen çalışmayla da uyumludur.

pRb' nin fosforillenmesini üç ana Cdk inhibitörü engelleyebilir. Bunlar p16, p21 ve p27' dir. P16 etkisini siklin-D1-Cdk4 (ya da 6) kompleksine bağlanarak gösterir. P21' de çeşitli siklin-Cdk komplekslerine bağlanarak, etki gösterir. Ayrıca doğrudan PCNA' ya bağlanarak hücrede DNA replikasyonunu inhibe eder. Bununla birlikte hücrede DNA hasarı varsa hasar tamir edilirken hücre döngüsünü durdurur. P27, p21 ile %42 amino asit homolojisi gösterir ve p21' e benzer şekilde etki gösterdiği bilinmektedir [176]. Ayrıca başka bir çalışmada p21, p27 ve p57' nin siklin-D-Cdk4, siklinD-Cdk6, siklinE-Cdk2 ve siklinA-Cdk2 aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir [178]. Çeşitli insan kanser tiplerinde p27 dağılımının azaldığı bilinmektedir [179]. 1996 yılında yapılan bir çalışmada farede p27 geni yokluğunda çoklu organ hiperplazileri ve hipofiz tümörü geliştiği bildirilmiştir [180].

PCNA, DNA replikasyon proteini olup DNA polimeraz- δ için yardımcı protein olarak çalışır ve hücre proliferasyonunun değerlendirilmesinde kullanışlı bir belirteç olarak kabul edilir [86]. 2003 yılında yapılan bir çalışmada prepubertal dönemde deksametazon ile büyüme geriliği oluşturulan farelerde tibial büyüme plağında PCNA dağılımında ciddi miktarda düşüş gözlenmiştir [181]. Çalışmamızda, PCNA dağılımıyla ilgili bulgumuz bu çalışmayla paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda deksametazon indükeli sıçan plasentasında hücre siklusu G1 fazı proliferasyon belirteçlerinden PCNA' nın azaldığı, yine aynı fazın inhibisyon belirteçlerinden olan p27' nin dağılımının arttığı tespit edildi. Bununla birlikte deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde apoptozda artış vardı. Bütün bu bulgular ışığında plasentadaki büyüme geriliğinin nedeninin deksametazon uygulanan deney grubunda dağılımı artan p27' nin siklin-Cdk komplekslerine bağlanarak pRb' nin

fosforilasyonunu engellemiş olabileceđi buna bađlı olarak da aktif pRb' nin E2F' ye bađlanıp onu inaktifleřtirerek hücreslerin S fazına girememiř olabileceđini ya da G1 fazı hızını dūřürebileceđini dūřünmekteyiz.

Sonuçta bir glukokortikoid olan deksametazonun hücre siklusu G1 fazı proteinlerinden p27 sentezini arttırmak suretiyle siklin-Cdk komplekslerinin aktivitesini inhibe ederek ya da apoptozu indükleyerek hücre siklusu üzerinde antiproliferatif etkide bulunabileceğini söyleyebiliriz.

SONUÇLAR

Gebeliğin 13–20. günleri arasında deksametazon verilen sıçan plasentasında ışık mikroskopik düzeyde hücre silusunun G1 fazı proteinlerinden PCNA ve p27' nin dağılımlarına keza TUNEL pozitif hücelere, TEM düzeyinde plasentadaki ince yapı değışikliklerine bakıldı ve aşığıdaki sonuçlara varıldı:

1. Deney grubu hayvanlarının ortalama plasenta ve embriyo ağırlıklarının kontrola göre önemlilik düzeyinde düşük olduğu, bu nedenle subkutan olarak verilen deksametazonun plasentada ve embriyoda ağırlık kaybına neden olduğu, ancak embriyo sayısını etkilemediği,
2. Deksametazon verilen sıçan plasentasında trofoblast, spongiyotrofoblast ve trofoblast dev hücrelerinde PCNA immünboyanma reaksiyon şiddetinin kontrola göre önemlilik düzeyinde düştüğünü ve PCNA bağlantılı DNA replikasyonunun deksametazondan olumsuz etkilendiğini,
3. Deney hayvanı plasentasında PCNA immünboyanma yoğunluğundaki azalmanın aksine trofoblast, spongiyotrofoblast ve trofoblast dev hücrelerinde p27 immünboyanma reaksiyon şiddetinde bir artışın görülmesi, deksametazonun p27 aracılığı ile siklin-Cdk komplekslerini hücre siklusunun G1 fazında inaktif edebileceğini,
4. TEM ile yapılan çalışmalarda bazı trofoblast ve spongiyotrofoblast hücrelerinin TUNEL ile de doğrulandığı gibi, deksametazondan apoptoza gidebilecek düzeyde etkilendikleri,
5. Glukokortikoidlerin (deksametazon) hücre siklusu üzerinde antiproliferatif etkilerinin olduğu, bunu; a. Apoptozu indükleyerek b. Hücre siklusunu yavaşlatarak ya da durdurarak yapabildikleri sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. Sugden, M.C. and M.L. Langdown, Possible involvement of PKC isoforms in signalling placental apoptosis in intrauterine growth retardation. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. 185(1-2): p. 119-26.
2. Chard, T., A. Yoong, and M. Macintosh, The myth of fetal growth retardation at term. *Br J Obstet Gynaecol*, 1993. 100(12): p. 1076-81.
3. Chard, T., K. Costeloe, and A. Leaf, Evidence of growth retardation in neonates of apparently normal weight. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1992. 45(1): p. 59-62.
4. Edwards, C.R., et al., Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet*, 1993. 341(8841): p. 355-7.
5. Lindsay, R.S., et al., Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia*, 1996. 39(11): p. 1299-305.
6. Saegusa, H., et al., Influence of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-HSD) inhibition on glucose metabolism and 11beta-HSD regulation in adult offspring of rats. *Metabolism*, 1999. 48(12): p. 1584-8.
7. Schatz, M., et al., The relationship of asthma medication use to perinatal outcomes. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 113(6): p. 1040-5.
8. Ali, R., et al., Idiopathic thrombocytopenic purpura in pregnancy: a single institutional experience with maternal and neonatal outcomes. *Ann Hematol*, 2003. 82(6): p. 348-52.
9. Matchaba, P. and J. Moodley, Corticosteroids for HELLP syndrome in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004(1): p. CD002076.
10. Langdown, M.L. and M.C. Sugden, Enhanced placental GLUT1 and GLUT3 expression in dexamethasone-induced fetal growth retardation. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. 185(1-2): p. 109-17.
11. Hajdich, E., et al., Regulation of glucose transporters in cultured rat adipocytes: synergistic effect of insulin and dexamethasone on GLUT4 gene expression through promoter activation. *Endocrinology*, 1995. 136(11): p. 4782-9.
12. Olgemoller, B., J. Schon, and O.H. Wieland, Endothelial plasma membrane is a glucocorticoid-regulated barrier for the uptake of glucose into the cell. *Mol Cell Endocrinol*, 1985. 43(2-3): p. 165-71.
13. Goland, R.S., et al., Elevated levels of umbilical cord plasma corticotropin-releasing hormone in growth-retarded fetuses. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. 77(5): p. 1174-9.
14. Hahn, T., et al., Placental glucose transporter expression is regulated by glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84(4): p. 1445-52.

15. Reinisch, J.M., et al., Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. *Science*, 1978. 202(4366): p. 436-8.
16. Bloom, S.L., et al., Antenatal dexamethasone and decreased birth weight. *Obstet Gynecol*, 2001. 97(4): p. 485-90.
17. Mulay, S. and S. Solomon, Adrenal cortical function during pregnancy. In: James VHT (ed.). 2nd ed ed. *The Adrenal Gland*. 1991, New York: Raven Press. 195-216.
18. Liggins, G.C., The role of cortisol in preparing the fetus for birth. *Reprod Fertil Dev*, 1994. 6(2): p. 141-50.
19. Bamberger, C.M., H.M. Schulte, and G.P. Chrousos, Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev*, 1996. 17(3): p. 245-61.
20. Stewart, P.M. and Z.S. Krozowski, 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm*, 1999. 57: p. 249-324.
21. Ma, G.T., et al., Nodal regulates trophoblast differentiation and placental development. *Dev Biol*, 2001. 236(1): p. 124-35.
22. Waddell, B.J., et al., Apoptosis in rat placenta is zone-dependent and stimulated by glucocorticoids. *Biol Reprod*, 2000. 63(6): p. 1913-7.
23. Yamauchi, H., et al., Involvement of p53 in 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced rat fetal brain lesions. *Neurotoxicol Teratol*, 2004. 26(4): p. 579-86.
24. Pijnenborg, R., et al., Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta*, 1981. 2(1): p. 71-91.
25. Handwerker, S. and M. Freemark, The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2000. 13(4): p. 343-56.
26. Moore, K. and T. Persaud, *Klinik yönleri ile insan embriyolojisi*. 2002, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
27. Demir, R., *İnsan gelişimi ve implantasyon biyolojisi*. 1995, Ankara, Türkiye: Palme Yayıncılık.
28. Enders, A.C., A Comparative Study of the Fine Structure of the Trophoblast in Several Hemochorial Placentas. *Am J Anat*, 1965. 116: p. 29-67.
29. Knipp, G.T., K.L. Audus, and M.J. Soares, Nutrient transport across the placenta. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999. 38(1): p. 41-58.
30. http://www.merck.com/media/mmhe2/figures/fg259_1.gif.
31. Acar, N., Gebeliğin belli evrelerinde normal ve diyabetik sıçan plasentasında hücre siklusu regülatörlerinin dağılımı, in *Histoloji ve Embriyoloji*. 2005, Akdeniz Üniversitesi: Antalya.
32. <http://www.medicine.ucsd.edu/cpa/rat>.
33. Cross, J.C., et al., Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. 187(1-2): p. 207-12.
34. Enders, A.C. and T.N. Blankenship, Comparative placental structure. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999. 38(1): p. 3-15.

35. Davies, J. and S.R. Glasser, Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. *Acta Anat (Basel)*, 1968. 69(4): p. 542-608.
36. Jollie, W.P. and S.S. Craig, The fine structure of placental junctional zone cells during prolonged pregnancy in rats. *Acta Anat (Basel)*, 1979. 105(4): p. 386-400.
37. Achen, M.G., et al., Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor are co-expressed during early embryonic development. *Growth Factors*, 1997. 15(1): p. 69-80.
38. Teesalu, T., et al., Expression of matrix metalloproteinases during murine chorioallantoic placenta maturation. *Dev Dyn*, 1999. 214(3): p. 248-58.
39. Wooding, F. and A. Flint, Placentation. 4. baskı ed. In *Marshall's Physiology Reproduction*. 1994, NewYork: Chapman and Hall. 233-460.
40. Jollie, W.P., Age changes in the fine structure of rat trophoblast giant-cells. *Anat Embryol (Berl)*, 1981. 162(1): p. 105-19.
41. Zybina, E.V. and T.G. Zybina, Polytene chromosomes in mammalian cells. *Int Rev Cytol*, 1996. 165: p. 53-119.
42. Damsky, C.H., et al., Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development*, 1994. 120(12): p. 3657-66.
43. Linzer, D.I. and S.J. Fisher, The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy. *Mol Endocrinol*, 1999. 13(6): p. 837-40.
44. Soares, M.J., The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004. 2: p. 51.
45. Gardner, R., Origin and development of the trophoblast and inner cell mass in implantation of the human embryo. 1985, London: Academic Press. 155-178.
46. Georgiades, P., A.C. Ferguson-Smith, and G.J. Burton, Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta*, 2002. 23(1): p. 3-19.
47. Bulmer, J.N., et al., Maternal and fetal cellular relationships in the human placental basal plate. *Placenta*, 1988. 9(3): p. 237-46.
48. Redline, R.W. and P. Patterson, Pre-eclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast. *Hum Pathol*, 1995. 26(6): p. 594-600.
49. Muntener, M. and Y.C. Hsu, Development of trophoblast and placenta of the mouse. A reinvestigation with regard to the in vitro culture of mouse trophoblast and placenta. *Acta Anat (Basel)*, 1977. 98(3): p. 241-52.
50. Brosens, I., W.B. Robertson, and H.G. Dixon, The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J Pathol Bacteriol*, 1967. 93(2): p. 569-79.
51. Kirby, D.R. and S. Bradbury, The hemo-chorial mouse placenta. *Anat Rec*, 1965. 152(3): p. 279-81.

52. Steven, D.H. and C.A. Samuel, Anatomy of the placental barrier in the mare. *J Reprod Fertil Suppl*, 1975(23): p. 579-82.
53. Wynn, R., Morphology of the placenta. In *Biology of Gestation* (Ed.) ed. 1968, New York: Academic Press. 93-184.
54. Jauniaux, E., D. Jurkovic, and S. Campbell, Current topic: in vivo investigation of the placental circulations by Doppler echography. *Placenta*, 1995. 16(4): p. 323-31.
55. Jauniaux, E., et al., Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol*, 2000. 157(6): p. 2111-22.
56. Burton, G.J., J. Hempstock, and E. Jauniaux, Nutrition of the human fetus during the first trimester--a review. *Placenta*, 2001. 22 Suppl A: p. S70-7.
57. Kaufman, M., Morphological stages of postimplantation embryonic development. In *Postimplantation Mammalian Embryos* (Eds), ed. C.A.C. DL. 1990, Oxford: IRL Press. 81-92.
58. Redline, R.W. and C.Y. Lu, Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leukocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship. *Lab Invest*, 1989. 61(1): p. 27-36.
59. Redline, R.W., et al., Differential expression of insulin-like growth factor-II in specific regions of the late (post day 9.5) murine placenta. *Mol Reprod Dev*, 1993. 36(2): p. 121-9.
60. Georgiades, P., et al., Roles for genomic imprinting and the zygotic genome in placental development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(8): p. 4522-7.
61. King, B., The functional anatomy of the placental vasculature. In *The Uterine Circulation* (Ed.), ed. R. CR. 1989, New York: Perinatology Press. 17-33.
62. Kam, E.P., et al., The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries. *Hum Reprod*, 1999. 14(8): p. 2131-8.
63. Meekins, J.W., et al., A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*, 1994. 101(8): p. 669-74.
64. Pijnenborg, R., et al., Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta*, 1983. 4(4): p. 397-413.
65. Teesalu, T., F. Blasi, and D. Talarico, Expression and function of the urokinase type plasminogen activator during mouse hemochorial placental development. *Dev Dyn*, 1998. 213(1): p. 27-38.
66. al-Lamki, R.S., J.N. Skepper, and G.J. Burton, Are human placental bed giant cells merely aggregates of small mononuclear trophoblast cells? An ultrastructural and immunocytochemical study. *Hum Reprod*, 1999. 14(2): p. 496-504.
67. Kurman, R.J., C.S. Main, and H.C. Chen, Intermediate trophoblast: a distinctive form of trophoblast with specific morphological, biochemical and functional features. *Placenta*, 1984. 5(4): p. 349-69.

68. Varmuza, S., et al., Polytene chromosomes in mouse trophoblast giant cells. *Development*, 1988. 102(1): p. 127-34.
69. Nakayama, H., I.C. Scott, and J.C. Cross, The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev Biol*, 1998. 199(1): p. 150-63.
70. Cross, J.C., Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 2000. 11(2): p. 105-13.
71. Iguchi, T., et al., Developmental changes in mouse placental cells from several stages of pregnancy in vivo and in vitro. *Biol Reprod*, 1993. 48(1): p. 188-96.
72. Bevilacqua, E.M. and P.A. Abrahamsohn, Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. *Arch Biol Med Exp (Santiago)*, 1989. 22(2): p. 107-18.
73. Rassoulzadegan, M., et al., Phagocytosis reveals a reversible differentiated state early in the development of the mouse embryo. *Embo J*, 2000. 19(13): p. 3295-303.
74. Chilosi, M., et al., Differential expression of p57kip2, a maternally imprinted cdk inhibitor, in normal human placenta and gestational trophoblastic disease. *Lab Invest*, 1998. 78(3): p. 269-76.
75. Han, V.K. and A.M. Carter, Spatial and temporal patterns of expression of messenger RNA for insulin-like growth factors and their binding proteins in the placenta of man and laboratory animals. *Placenta*, 2000. 21(4): p. 289-305.
76. Cross, J.C., et al., Genes, development and evolution of the placenta. *Placenta*, 2003. 24(2-3): p. 123-30.
77. Alberts, B. and L.J. Johnson A, Raff M, Roberts K, Walter P., *Molecular Biology of The Cell*. 2002, NY, USA.: Garland Science.
78. Sheaff, R.J., et al., Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev*, 1997. 11(11): p. 1464-78.
79. Olvera, M., et al., Immunohistochemical expression of cell cycle proteins E2F-1, Cdk-2, Cyclin E, p27(kip1), and Ki-67 in normal placenta and gestational trophoblastic disease. *Mod Pathol*, 2001. 14(10): p. 1036-42.
80. Takahashi, T. and V.S. Caviness, Jr., PCNA-binding to DNA at the G1/S transition in proliferating cells of the developing cerebral wall. *J Neurocytol*, 1993. 22(12): p. 1096-102.
81. Bravo, R. and H. Macdonald-Bravo, Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *Embo J*, 1985. 4(3): p. 655-61.
82. Danova, M., et al., Cell cycle-related proteins: a flow cytometric study in human tumors. *Biol Cell*, 1988. 64(1): p. 23-8.
83. Scovassi, A.I. and E. Prosperi, Analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) associated with DNA. *Methods Mol Biol*, 2006. 314: p. 457-75.
84. Essers, J., et al., Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(21): p. 9350-9.
85. Gottschalk, J., et al., Influence of preoperative dexamethasone therapy on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in

- comparison to other parameters in meningiomas. *Histol Histopathol*, 1992. 7(4): p. 653-61.
86. Paunesku, T., et al., Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol*, 2001. 77(10): p. 1007-21.
 87. Kelman, Z., PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 1997. 14(6): p. 629-40.
 88. Hengst, L. and S.I. Reed, Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science*, 1996. 271(5257): p. 1861-4.
 89. Lacy, E.R., et al., p27 binds cyclin-CDK complexes through a sequential mechanism involving binding-induced protein folding. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. 11(4): p. 358-64.
 90. Coqueret, O., New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol*, 2003. 13(2): p. 65-70.
 91. Denicourt, C. and S.F. Dowdy, Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev*, 2004. 18(8): p. 851-5.
 92. Michael, A.E., L.M. Thurston, and M.T. Rae, Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction*, 2003. 126(4): p. 425-41.
 93. Ward, R.M., Pharmacologic enhancement of fetal lung maturation. *Clin Perinatol*, 1994. 21(3): p. 523-42.
 94. Bian, X.P., F.J. Seidler, and T.A. Slotkin, Promotional role for glucocorticoids in the development of intracellular signalling: enhanced cardiac and renal adenylate cyclase reactivity to beta-adrenergic and non-adrenergic stimuli after low-dose fetal dexamethasone exposure. *J Dev Physiol*, 1992. 17(6): p. 289-97.
 95. Aghajafari, F., et al., Repeated doses of antenatal corticosteroids in animals: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol*, 2002. 186(4): p. 843-9.
 96. Levitt, N.S., et al., Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology*, 1996. 64(6): p. 412-8.
 97. Nyirenda, M.J., et al., Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest*, 1998. 101(10): p. 2174-81.
 98. Herrera, E., et al., Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. *Diabetes*, 1991. 40 Suppl 2: p. 83-8.
 99. Hay, W.W., Jr. and H.K. Mezmarich, Effect of maternal glucose concentration on uteroplacental glucose consumption and transfer in pregnant sheep. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1989. 190(1): p. 63-9.
 100. Wheeler, P.D. and D.L. Yudilevich, Effect of insulin, prostaglandin E1 and uptake inhibitors on glucose transport in the perfused guinea-pig placenta. *J Dev Physiol*, 1989. 11(3): p. 159-69.

101. Devaskar, S.U. and M.M. Mueckler, The mammalian glucose transporters. *Pediatr Res*, 1992. 31(1): p. 1-13.
102. Zhou, J. and C.A. Bondy, Placental glucose transporter gene expression and metabolism in the rat. *J Clin Invest*, 1993. 91(3): p. 845-52.
103. Devaskar, S.U., et al., Expression of genes involved in placental glucose uptake and transport in the nonobese diabetic mouse pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1994. 171(5): p. 1316-23.
104. Takata, K., et al., Immunolocalization of glucose transporter GLUT1 in the rat placental barrier: possible role of GLUT1 and the gap junction in the transport of glucose across the placental barrier. *Cell Tissue Res*, 1994. 276(3): p. 411-8.
105. Boileau, P., et al., Overexpression of GLUT3 placental glucose transporter in diabetic rats. *J Clin Invest*, 1995. 96(1): p. 309-17.
106. Mantych, G.J., et al., Cellular localization and characterization of Glut 3 glucose transporter isoform in human brain. *Endocrinology*, 1992. 131(3): p. 1270-8.
107. Ehrhardt, R.A. and A.W. Bell, Developmental increases in glucose transporter concentration in the sheep placenta. *Am J Physiol*, 1997. 273(3 Pt 2): p. R1132-41.
108. Rajakumar, R.A., et al., Sp1 and Sp3 regulate transcriptional activity of the facilitative glucose transporter isoform-3 gene in mammalian neuroblasts and trophoblasts. *J Biol Chem*, 1998. 273(42): p. 27474-83.
109. Santalucia, T., et al., Factors involved in GLUT-1 glucose transporter gene transcription in cardiac muscle. *J Biol Chem*, 1999. 274(25): p. 17626-34.
110. Marin, M., et al., Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell*, 1997. 89(4): p. 619-28.
111. Barak, Y., et al., PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*, 1999. 4(4): p. 585-95.
112. Hay, W.W., Jr., et al., Workshop summary: fetal growth: its regulation and disorders. *Pediatrics*, 1997. 99(4): p. 585-91.
113. Thomas, C.R., G.L. Eriksson, and U.J. Eriksson, Effects of maternal diabetes on placental transfer of glucose in rats. *Diabetes*, 1990. 39(3): p. 276-82.
114. Pickard, M.R., et al., Maternal hypothyroxinemia influences glucose transporter expression in fetal brain and placenta. *J Endocrinol*, 1999. 163(3): p. 385-94.
115. Kamei, Y., et al., Maternal epidermal growth factor deficiency causes fetal hypoglycemia and intrauterine growth retardation in mice: possible involvement of placental glucose transporter GLUT3 expression. *Endocrinology*, 1999. 140(9): p. 4236-43.
116. Fowden, A.L., J. Li, and A.J. Forhead, Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? *Proc Nutr Soc*, 1998. 57(1): p. 113-22.

117. Barker, D.J., Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *Br Med Bull*, 1997. 53(1): p. 96-108.
118. Siebe, H., et al., Metabolism of dexamethasone: sites and activity in mammalian tissues. *Ren Physiol Biochem*, 1993. 16(1-2): p. 79-88.
119. Benediktsson, R., et al., Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet*, 1993. 341(8841): p. 339-41.
120. Monder, C. and C.H. Shackleton, 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase: fact or fancy? *Steroids*, 1984. 44(5): p. 383-417.
121. Krozowski, Z., et al., Immunohistochemical localization of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in human kidney and placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. 80(7): p. 2203-9.
122. Sun, K., K. Yang, and J.R. Challis, Differential expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human placenta and fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. 82(1): p. 300-5.
123. Benediktsson, R., et al., Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1997. 46(2): p. 161-6.
124. Stewart, P.M., F.M. Rogerson, and J.I. Mason, Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid and activity in human placenta and fetal membranes: its relationship to birth weight and putative role in fetal adrenal steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. 80(3): p. 885-90.
125. Rogerson, F.M., K.M. Kayes, and P.C. White, Variation in placental type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity is not related to birth weight or placental weight. *Mol Cell Endocrinol*, 1997. 128(1-2): p. 103-9.
126. Burton, P.J., et al., Zonal distribution of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 messenger ribonucleic acid expression in the rat placenta and decidua during late pregnancy. *Biol Reprod*, 1996. 55(5): p. 1023-8.
127. Langley-Evans, S.C., et al., Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta*, 1996. 17(2-3): p. 169-72.
128. Brown, R.W., et al., The ontogeny of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. *Endocrinology*, 1996. 137(2): p. 794-7.
129. Seckl, J.R., Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. 185(1-2): p. 61-71.
130. Dave-Sharma, S., et al., Examination of genotype and phenotype relationships in 14 patients with apparent mineralocorticoid excess. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. 83(7): p. 2244-54.
131. Kotelevtsev, Y., et al., Hypertension in mice lacking 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *J Clin Invest*, 1999. 103(5): p. 683-9.

132. Stewart, P.M., B.A. Murry, and J.I. Mason, Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human fetal tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994. 78(6): p. 1529-32.
133. Langley-Evans, S.C., Hypertension induced by foetal exposure to a maternal low-protein diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. *J Hypertens*, 1997. 15(5): p. 537-44.
134. Bertram, C., et al., The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology*, 2001. 142(7): p. 2841-53.
135. Lesage, J., et al., Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology*, 2001. 142(5): p. 1692-702.
136. Shams, M., et al., 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. *Hum Reprod*, 1998. 13(4): p. 799-804.
137. Hewitt, D. and A.M.D. Peter J. Mark, Brendan J. Waddell, Placental expression of secreted frizzled related protein-4 in the rat and the impact of glucocorticoid-induced fetal and placental growth restriction. 2006: BOR Papers in Press.
138. Lacher, M.D., et al., Role of DDC-4/sFRP-4, a secreted frizzled-related protein, at the onset of apoptosis in mammary involution. *Cell Death Differ*, 2003. 10(5): p. 528-38.
139. Lee, A.Y., et al., Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene*, 2004. 23(39): p. 6672-6.
140. Hrzenjak, A., et al., Inverse correlation of secreted frizzled-related protein 4 and beta-catenin expression in endometrial stromal sarcomas. *J Pathol*, 2004. 204(1): p. 19-27.
141. Ain, R., L.N. Canham, and M.J. Soares, Dexamethasone-induced intrauterine growth restriction impacts the placental prolactin family, insulin-like growth factor-II and the Akt signaling pathway. *J Endocrinol*, 2005. 185(2): p. 253-63.
142. Cheng, S.L., et al., Regulation of insulin-like growth factors I and II and their binding proteins in human bone marrow stromal cells by dexamethasone. *J Cell Biochem*, 1998. 71(3): p. 449-58.
143. Smink, J.J., et al., Dexamethasone-induced growth inhibition of porcine growth plate chondrocytes is accompanied by changes in levels of IGF axis components. *J Endocrinol*, 2002. 174(2): p. 343-52.
144. Constancia, M., et al., Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*, 2002. 417(6892): p. 945-8.
145. DeChiara, T.M., A. Efstratiadis, and E.J. Robertson, A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature*, 1990. 345(6270): p. 78-80.

146. Thakur, A., et al., Effect of dexamethasone on insulin-like growth factor-1 expression in a rabbit model of growth retardation. *J Pediatr Surg*, 2000. 35(6): p. 898-904; discussion 904-5.
147. Danforth, D., *Obstetrics and Gynecology*. 1982, Philadelphia, Pennsylvania: Harper&Row Publishers Inc. 689-694.
148. Bauer, M.K., et al., Fetal growth and placental function. *Mol Cell Endocrinol*, 1998. 140(1-2): p. 115-20.
149. Fulop, V., et al., c-myc, c-erbB-2, c-fms and bcl-2 oncoproteins. Expression in normal placenta, partial and complete mole, and choriocarcinoma. *J Reprod Med*, 1998. 43(2): p. 101-10.
150. Yui, J., et al., Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta*, 1994. 15(8): p. 819-35.
151. Pridjian, G., *Fetomaternal interactions: placental physiology and its role as a go-between*. 4th ed. ed. Neonatology: Pathophysiology and Management of the Newborn,, ed. G. Avery, Fletcher, M., MacDonald, M. 1994, Philadelphia, PA: J.B. Lippincott Co. 126-143.
152. Smith, S.C., P.N. Baker, and E.M. Symonds, Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1997. 177(1): p. 57-65.
153. Sakuragi, N., et al., [Apoptosis in human trophoblastic cells identified by in situ nick end. Labeling of fragmented DNA]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 1994. 46(6): p. 533-4.
154. Barker, D., *Fetal and Infant Origins of Adult Disease*. 1991, London: BMJ,.
155. Barker, D.J., et al., Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *Bmj*, 1990. 301(6746): p. 259-62.
156. Soares, M.J., et al., Differentiation of trophoblast endocrine cells. *Placenta*, 1996. 17(5-6): p. 277-89.
157. Soares, M. and D. Linzer, *Rodent prolactin family and pregnancy*. 2001, Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers. 139-167.
158. Rogers, J.F. and W.D. Dawson, Foetal and placental size in a *Peromyscus* species cross. *J Reprod Fertil*, 1970. 21(2): p. 255-62.
159. Tanaka, S., et al., Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biol Reprod*, 2001. 65(6): p. 1813-21.
160. Goland, R.S., et al., Concentrations of corticotrophin-releasing hormone in the umbilical-cord blood of pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Reprod Fertil Dev*, 1995. 7(5): p. 1227-30.
161. Gunberg, D.L., Some effects of exogenous hydrocortisone on pregnancy in the rat. *Anat Rec*, 1957. 129(2): p. 133-53.
162. Chang, T.C., et al., Dexamethasone suppresses apoptosis in a human gastric cancer cell line through modulation of bcl-x gene expression. *FEBS Lett*, 1997. 415(1): p. 11-5.
163. Chauhan, D., et al., Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism. *Oncogene*, 1997. 15(7): p. 837-43.

164. Asada, A., et al., Induction of thymocyte apoptosis by Ca²⁺-independent protein kinase C (nPKC) activation and its regulation by calcineurin activation. *J Biol Chem*, 1998. 273(43): p. 28392-8.
165. Beitins, I.Z., et al., The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. *Pediatr Res*, 1973. 7(5): p. 509-19.
166. Brown, R.W., et al., Cloning and production of antisera to human placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Biochem J*, 1996. 313 (Pt 3): p. 1007-17.
167. Marconi, A.M., et al., An evaluation of fetal glucogenesis in intrauterine growth-retarded pregnancies. *Metabolism*, 1993. 42(7): p. 860-4.
168. Thureen, P.J., et al., Placental glucose transport in heat-induced fetal growth retardation. *Am J Physiol*, 1992. 263(3 Pt 2): p. R578-85.
169. Molina, R.D., et al., Gestational maturation of placental glucose transfer capacity in sheep. *Am J Physiol*, 1991. 261(3 Pt 2): p. R697-704.
170. Carver, T.D., et al., Leucine metabolism in chronically hypoglycemic hypoinsulinemic growth-restricted fetal sheep. *Am J Physiol*, 1997. 272(1 Pt 1): p. E107-17.
171. Hewitt, D.P., P.J. Mark, and B.J. Waddell, Glucocorticoids prevent the normal increase in placental vascular endothelial growth factor expression and placental vascularity during late pregnancy in the rat. *Endocrinology*, 2006. 147(12): p. 5568-74.
172. Axt, R., et al., Immunohistochemical evaluation of apoptosis in placentae from normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 1999. 26(3-4): p. 195-8.
173. Herzinger, T. and S.I. Reed, Cyclin D3 is rate-limiting for the G1/S phase transition in fibroblasts. *J Biol Chem*, 1998. 273(24): p. 14958-61.
174. Grana, X. and E.P. Reddy, Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*, 1995. 11(2): p. 211-9.
175. Weinberg, R.A., The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 1995. 81(3): p. 323-30.
176. Ito, Y., et al., Expression and prognostic roles of the G1-S modulators in hepatocellular carcinoma: p27 independently predicts the recurrence. *Hepatology*, 1999. 30(1): p. 90-9.
177. Stromberg, T., et al., Rapamycin sensitizes multiple myeloma cells to apoptosis induced by dexamethasone. *Blood*, 2004. 103(8): p. 3138-47.
178. Lee, M.H., I. Reynisdottir, and J. Massague, Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev*, 1995. 9(6): p. 639-49.
179. Matsuda, Y., et al., Loss of p16 contributes to p27 sequestration by cyclin D(1)-cyclin-dependent kinase 4 complexes and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(9): p. 3389-96.

- 180.** Nakayama, K., et al., Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*, 1996. 85(5): p. 707-20.
- 181.** Smink, J.J., et al., Short-term glucocorticoid treatment of prepubertal mice decreases growth and IGF-I expression in the growth plate. *J Endocrinol*, 2003. 177(3): p. 381-8.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Adana' nın Ceyhan ilçesinde doğdu. 1987 yılında Ceyhan Ayşe Malaz İlkokulu' ndan, 1990 yılında Ceyhan Pamukeli Ortaokulu' ndan ve 1994 yılında da Ankara Anadolu Tapu ve Kadastro Meslek Lisesi' nden mezun oldu. 1998 yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi' nde Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümünü ve Eğitim Fakültesi Fizik Öğretmenliği bölümünü eş zamanlı olarak bitirerek lisans eğitimini tamamladı. 1999–2001 yılları arasında çeşitli kurumlarda fizik öğretmenliği yaptı. 2002 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Elektron Mikroskopi Ünitesi' nde uzman olarak göreve başladı. 2004 yılında ise bu görevle birlikte Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsüne bağlı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı' nda Histoloji ve Embriyoloji Programı Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi' nde uzman olarak çalışmaktadır. Hakan Er evli, bir çocuk babası ve İngilizce bilmektedir.