

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
BİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Mehmet KANTER

**SIÇANLARDA PLASENTA GELİŞİMİNİN  
MORFOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Mustafa ERBOĞA**

EDİRNE – 2010

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
BİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Mehmet KANTER

**SIÇANLARDA PLASENTA GELİŞİMİNİN  
MORFOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Mustafa ERBOĞA**

**Destekleyen Kurum: TÜBAP 2010-31**

**Tez No :**

EDİRNE – 2010

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü**

**O N A Y**

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Mehmet KANTER danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Mustafa ERBOĞA tarafından tez başlığı “Sıçanlarda Plasenta Gelişiminin Morfolojik Olarak İncelenmesi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 19/07/2010 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet KANTER

JÜRİ BAŞKANI

Doç. Dr. Gülnur KIZILAY

ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Selman ÇIKMAZ

ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK

Enstitü Müdürü

## TEŐEKKÜR

Eğitimim süresince, yetiŐmemde büyük emeği olan ve benden hiçbir fedakârlığı esirgemeyen aileme minnettirim. Lisansüstü eğitimim boyunca beni yetiŐtiren, bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, çalışmam sırasında bilimsel katkıları ve yardımlarını esirgemeyen, danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet KANTER'e, araŐtırmam süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocalarım Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ve Yrd. Doç. Dr. YeŐim Hülya UZ'a ve çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Öğr. Gör. Cevat Aktaş, AraŐ. Gör. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŐIR, AraŐ. Gör. Dr. Melike SAPMAZ METİN, Yeliz BOZDEMİR DÖNMEZ, Ferhat CENGİZ, Duygu UZUN, Uğur DİLEKÇİ ve Soner UYSAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|  |    |
|--|----|
| <b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....   | 1  |
| <b>GENEL BİLGİLER</b> .....  | 4  |
| <b>PLASENTA</b> .....  | 4  |
| <b>İNSAN PLASENTASININ GELİŞİMİ VE YAPISI</b> .....                            | 7  |
| <b>SIÇAN PLASENTASININ GELİŞİMİ VE YAPISI</b> .....                            | 12 |
| <b>İNSAN VE SIÇAN PLASENTASI ARASINDAKİ BENZERLİKLER VE FARKLILIKLAR</b> ..... | 18 |
| <b>APOPTOZİS</b> .....   | 21 |
| <b>HÜCRE ÇOĞALMASI VE PROLİFERE OLAN HÜCRE NÜKLEER ANTİJENİ</b> .....          | 23 |
| <b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....  | 25 |
| <b>BULGULAR</b> .....  | 29 |
| <b>TARTIŞMA</b> .....  | 63 |
| <b>SONUÇLAR</b> .....  | 68 |
| <b>ÖZET</b> .....  | 69 |
| <b>SUMMARY</b> .....   | 71 |
| <b>KAYNAKLAR</b> .....   | 73 |
| <b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....  | 82 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....  | 86 |
| <b>EKLER</b>   |    |

## SİMGE VE KISALTMALAR

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>dk</b>                         | : Dakika  |
| <b>DNA</b>                        | : Deoksiribo nükleik asit   |
| <b>H+E</b>                        | : Hematoksilen+Eosin  |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | : Hidrojen peroksit   |
| <b>HSCORE</b>                     | : Histolojik skorlama   |
| <b>PBS</b>                        | : Fosfat Buffer Solüsyonu   |
| <b>PCNA</b>                       | : Prolifere hücre nükleer antijen   |
| <b>TdT</b>                        | : Terminal deoksinükleotidil transferaz   |
| <b>TUNEL</b>                      | : Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end-labeling |
| <b>µm</b>                         | : Mikrometre  |

## GİRİŞ VE AMAÇ

Plasenta, gebelik süresince embriyo/fötüs gelişimini sağlayan önemli bir organdır (1). Embriyonun sağlıklı gelişimi, doğru ve tam plasental gelişim ile doğrudan ilişkilidir. Erken embriyonik ölümlerin en büyük nedenlerinden birisi de anormal plasental gelişimlerdir (2). Plasental gelişim bozuklukları insanlarda düşük, preeklampsi ve fötüste büyüme geriliği gibi sonuçlar doğurmaktadır (3).

Memelilerde bulunan plasenta, uterus içinde gelişmekte olan embriyoyu koruyan ve uterus ile embriyo arasındaki metabolizma olaylarının gerçekleşmesi için gerekli bağlantıyı sağlayan organdır. Plasenta, fötüsün immünolojik reddiyle korunmasını, anneden embriyo için gerekli besin maddelerinin alınmasını, embriyonun metabolizma artıklarının atılmasını ve oksijen-karbondioksit değişiminin gerçekleşmesini sağlar. Aynı zamanda gebeliğin sürdürülmesi ve metabolik faaliyetlerin sağlanması için gerekli olan hormonları sentezleyen endokrin bir organdır (4-6).

Plasental bozuklukların moleküler mekanizmasını açıklamaya yönelik deney hayvanlarında birçok genetik çalışma yapılmaktadır. Bu bozukluklar; düşükler, bazı uterus içi büyüme geriliği tipleri ve preeklampsiyi içermektedir. Türler arasındaki moleküler benzerlikleri test etmek amacıyla insan ve sıçan plasentaları arasındaki yapısal farklılık ve benzerlikleri anlamak gerekmektedir (7). İnsan ve sıçan plasentaları aralarında farklılıklar barındırır da yapısal ve gelişimsel olarak büyük benzerlikler göstermektedir. Bu nedenle sıçan plasentasını, plasental gelişim çalışmalarında sıkça kullanılan bir modeldir (8).

Plasenta, türler arasında farklılıklar gösterebilir. Sıçan ve insan plasentaları, fötal plasenta/labirentin şekli nedeniyle her iki türde de diskoidal olarak sınıflandırılır. Sıçanlarda

tek, insanlarda ise çoklu kotiledon vardır. İnsanlarda kotiledonlar tek bir diske benzeyen sağlam bir demet oluştururlar. Her iki plasenta tipi de koryoallantoyiktir. Maternal ve fetal yapılar arasındaki tabaka sayısına göre sıçan plasentası hemotrikoryal, insan plasentası ise hemomonokoryal olarak isimlendirilir (9,10).

Kemirgen ailesinin bir üyesi olan *Rattus norvegicus* türü sıçanların ortalama ağırlıkları 250 gr'dır. Gebelik süreleri genellikle 21 gün olup yavru sayısı 14'e kadar ulaşabilir, ortalama yavru sayısı ise 7'dir (11).

Sıçanlarda implantasyon, genellikle 5. günün sonunda blastosistin desidual kriptaya yerleşimiyle başlar ve 12. günün sonunda plasenta gelişimini tamamlar. Plasenta, hücresel özelliklerine bağlı olarak embriyodan maternal bölgeye doğru 4 tabakaya ayrılır. Bunlar sırasıyla labirent, spongiyotrofoblast tabakası (bağlantı zonu), trofoblast dev hücre tabakası ve maternal desidual katmandır. Bu tabakaların her biri gebeliğin farklı günlerinde gelişmeye başlar ve gelişimlerini tamamlarlar. Ayrıca gebeliğin farklı günlerinde bu tabakalar arasında kapladıkları alan bakımından da farklılıklar bulunur (12-16).

Sağlıklı bir plasental gelişim esas olarak trofoblast proliferasyonu, differansiyasyonu ve apoptozisin birlikte gerçekleşmesine bağlıdır. Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (17,18). Bu olaylarda mitotik regülatörlerin rolü hakkında çok az bilgi vardır (2).

Hücre siklusu regülatörlerinden olan proliferasyon hücre nükleer antijen (PCNA), hücre siklusunda deoksiribonükleik asit (DNA) sentezinin yüksek olduğu G1 ve S fazında artar, S fazında maksimum düzeye erişir ve G2/M fazında azalır (19,20). Hücre siklusunda G1 fazının son %5' lik ve S fazının ilk %35' lik kısmında dağılım gösterir (19). Mitoz gösteren hücrelerde ise çok düşüktür. PCNA'nın olmadığı ya da çok az olduğu durumlarda hücrenin apoptozise gittiği bildirilmiştir (21).

Apoptozis, plasentanın normal gelişimi için gerekli olan bir süreçtir (22). Plasentada apoptozisi düzenleyen mekanizmalardaki bazı anormalliklerin, sinsityotrofoblast hücrelerinin fonksiyonlarını engelleyerek materno-fetal transport mekanizmasının bozulmasına yol açtığı (23) ve bunun sonucunda da uterus içi büyüme geriliğinin görüldüğü (24) bilinmektedir.

Yaptığımız literatür taramalarında; sıçanlarda plasenta gelişiminin erken ve geç dönemlerinde trofoblast proliferasyonu ve plasental apoptozisi gösteren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle planladığımız bu çalışmada, sıçanlarda gebeliğin farklı günlerinde plasentanın gelişiminin morfolojik olarak incelenmesi ile birlikte trofoblast proliferasyonu ve differensiyasyonunda mitotik ve apoptotik aktiviteyi immünohistokimyasal



ve TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end-labeling) teknikleriyle göstermeyi amaçladık.

## GENEL BİLGİLER

### PLASENTA

Plasenta, embriyonun anne uterusuna tutunması, canlılığının ve gelişiminin sürdürülmesinde çok önemli bir işlev görür. Ayrıca embriyonun beslenmesi, solunumu, boşaltımı ile gelişiminde gerekli hormonları salgılama gibi çok yönlü işlevleri de yerine getirir (25). Tüm bunlarla beraber plasenta sadece mekanik bir bariyer ya da pasif bir transport organı değildir; iki yönlü transfer sürecini kontrol eder. Bir yandan fötüse ulaştırılacak olan besinleri modifiye ederken diğer taraftan da kendi aktivitelerini desteklemek için kendi enerji metabolizmasını düzenler (26). Plasentanın oluşumu yani plasentasyon, fötüsün ekstraembriyonik dokuları ile anne endometriyal dokuları arasındaki karmaşık bir etkileşim sonucunda olur (25).

### Plasenta Çeşitleri

Memeli hayvanlarda ve insanda dış görünüş ve morfolojilerine göre plasentalar iki gruba ayrılır: yarım plasenta ve tam plasenta.

**A) Yarım plasenta (semiplasenta) :** Bu tip plasentalarda uterus mukozası ile koryon villusları arasındaki bağlantı genellikle gevşektir, temas halindedir. Dolayısıyla doğum esnasında villuslar endometriyumunu zedelemeyen ayrılırlar, kanama görülmez, desidua da şekillenmemiştir (adesiduata). Bu tipe tek tırnaklılarda, domuzlarda ve ruminantlarda rastlanır.

Yarım plasentalar uterus ile koryon arasındaki ilişki derecesine göre iki alt gruba ayrılır:

1) *Plasenta epithelio-koryalis*: Tek tırnaklılarda (kısarak, eşek) ve domuzda rastlanan bu tipte, villuslar koryon üzerinde yaygın (diffüz) olup koryon epiteli uterus epiteli ile karşı karşıyadır (*epithelio-koryal* ilişki) (Şekil 1a). Yani bağlantı gevşektir, temas halindedir.

2) *Plasenta syndesmo-koryalis*: Bu tip plasentaya ruminantlarda rastlanır. *Plasenta syndesmokoryalis*, *adesiduata villosa cotyledonata* olarak adlandırılan ruminant plasentasında, uterus epitelinde yer yer ayrılmalar gözlenir ve koryon epiteli, uterusun bağ dokusu ile karşı karşıyadır. Villuslar koryon üzerinde topluluklar, kümeler meydana getirmiştir. Bu villus kümelerini içinde bulunduran çukurluklara kotiledon denir (Şekil 1b). Kotiledonların karşısındaki endometrium kısımları ise *caruncula* ismini alır ve bu iki yapı kaynaşarak plasentoneleleri oluşturur.

Plasentone'lerde, anneye ait epitel (uterus epiteli) yer yer dejenere olmuş ve dolayısıyla uterus bağ dokusu bazal membranla birlikte, villuslar karşı karşıya gelmiştir (*syndesmo-koryalis*). Villuslarda ise zedelenme yoktur. Koryon-uterus bağlantısı yine basit şekildedir ve *desidua* şekillenmemiştir.

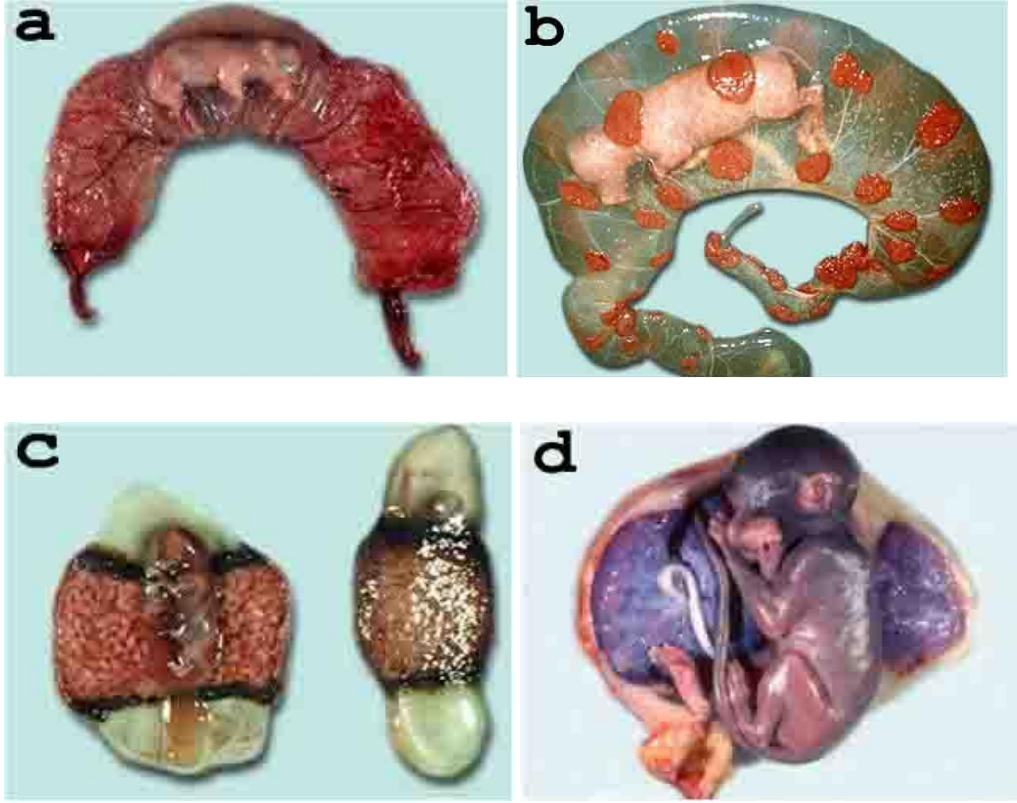
*Syndesmo-koryal* plasentalar yarım ve tam plasentalar arasında geçit tipidir (27).

**B) Tam (hakiki) plasenta (euplasenta)** : Köpek, kedi, kemiriciler, maymun ve insanda rastlanan bu tip plasentalarda uterus mukozası ile koryon birbirine sıkı sıkıya yapışmış, adeta kaynaşmıştır. *Desidua* şekillendiğinden (*desiduata*), doğumda uterus mukozasında az veya çok kanama, zedelenme ve atılma görülür (27).

Tam plasentalar da uterus-koryon ilişkisine göre iki alt gruba ayrılır:

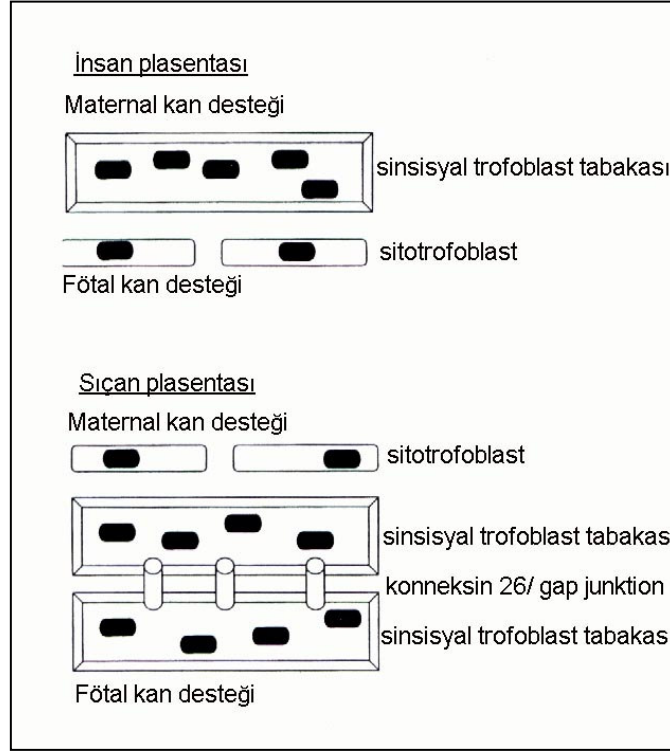
1) *Plasenta endothelio-koryalis*: Bu tip plasentaya kedi, köpek, aslan gibi memelilerde rastlanır (Demir 1995). *Plasenta endothelio-koryalis*, *desiduata*, *villosa zonaria* olarak adlandırılan karnivor plasentasında villuslar, koryon kesesinin yalnızca orta bölgesinde kemer şeklinde (*zonaria*) bir topluluk meydana getirmişlerdir (Şekil 1c).

2) *Plasenta hemo-koryalis*: Kemirgenlerde, primatlarda ve insanda görülür (Kurt Benirschke 2006). *Plasenta hemo-koryalis*, *desiduata*, *villosa diskoidea* olarak adlandırılan bu çeşit plasentada villuslar, koryon kesesinin belirli bir yerinde disk şeklinde (*diskoidal*) bir topluluk meydana getirmişlerdir (Şekil 1d). Uterus mukozasının villuslar karşısında bulunan epiteli, bağ dokusu ve kan damarlarının bütün katmanları erimiş olduğundan, villuslar serbest bir halde anne kanı ile temas halindedir (*hemo-koryal* ilişki) (27).



**Şekil 1. Villus organizasyonuna göre plasenta tiplerinin canlı örnekleri a: diffüz plasenta b: kotiledonar plasenta c: kuşak plasenta d: diskoidal plasenta (28).**

Hemokoryal plasentalar, trofoblast hücrelerinin tabaka sayısına bağlı olarak hemo-mono, hemo-di veya hemo-trikoryal olarak sınıflandırılırlar. İnsan plasentasında bir trofoblast tabakası olduğundan hemomonokoryal, kemirgen plasentasında üç trofoblast tabakası olduğundan hemotrikoryal plasenta olarak isimlendirilir (Şekil 2) (29).



**Şekil 2. Hemomonokoryal ve hemotrikoryal tip plasentalarda trofoblastik hücre katı görünümleri (29).**

## İNSAN PLASENTASININ GELİŞİMİ VE YAPISI

### Fertilizasyon ve İmplantasyon

Fertilizasyon, spermiyumun ovumu döllemesi ile gerçekleşir ve bu dölleme sonucunda tek hücreli zigot oluşur. Fertilizasyondan yaklaşık 1,5 gün sonra da zigot ilk mitoz bölünmesini gerçekleştirir ve iki hücreli hale gelir. Yeni oluşan hücrelere blastomer denir. (30-32). Zigot, fertilizasyondan sonra yaklaşık 3. günde morula olarak adlandırılan 12-16 blastomerden oluşan dut benzeri bir hücre kümesi halini alır. Morulayı oluşturan blastomerler hücre yüzey adhezyon moleküllerinin yardımıyla sıkıca bir araya gelerek bir hücre topu oluştururlar. Bu evreye sıkışma ya da kompaktasyon evresi denir. Sıkışma evresi ile birlikte morulayı oluşturan blastomerler iki hücre kümesine farklılaşırlar. Merkezde olanlar ve daha sonra embrioyu oluşturacak hücreler, iç hücre kitlesi (embriyoblast) olarak adlandırılır. İç hücre kitlesini dıştan çevreleyen dış hücre kitlesinden (trofoblast) ise fötal zarlar ve plaseenta gelişir (33). 4. günde uterus salgıları blastomerlerin arasına sızmaya başlar. Blastomerlerin ortasında içi sıvı dolu bir boşluk oluşur. Böylece blastosist şekillenir ve embriyoblast ile trofoblastlar kolaylıkla ayırt edilebilir duruma gelirler. 1,5-2 gün kadar uterus boşluğu içinde

serbestçe dolaşan blastosist'in zona pellüsidası 5,5 – 6. günde dejenere olarak ortadan kalkar. Blastosist biraz daha büyür ve embriyoblast kutbundan endometriyum'a gömülmeye başlar ki bu olaya implantasyon denir. İmplantasyon blastosist'in uterus yüzey epiteline tutunumu, bazal laminayı geçişi ve sonunda uterus stromasına tutunması ile olaylanır. İnsan blastosistinin 6 – 7. günde uterusu implante olduğu gösterilmiştir (30,34)

İmplantasyonun 3 evresi olduğu bilinmektedir (35). İlk evre blastosist ile endometriyum epitelinin apozisyon evresidir. Apozisyon evresinde uterus kavitesine gelen blastosist, endometriyal yüzeye embriyonik kutuptan yaklaşır ve adeta birbirlerine bakarlar. Trofoblastlar glandular epitelin luminal kısmında bulunurlar ve bu dönemde aslında stabil olmayan bir adhezyon vardır (36).

Endometriyal epitelin ufak çıkıntıları olan pinopodlar, blastosistin dışını oluşturan sinsityotrofoblastlar ile birbirlerinin içine geçen tarzda karşılaşır ve birbirlerine yapışırlar (Adhezyon evresi). Adhezyon, siklusun 20-21. günlerinde embriyo ile endometriyum arasında lokal parakrin haberleşme sonucunda gerçekleşir (37). Adhezyon evresinde blastosistin endometriyuma yapışması sabitlenir.

Blastosist-epitel ilişkisi sağlandıktan sonra invazyon evresi başlar. İnvazyon esnasında embriyonun trofoblast hücreleri luminal epiteliden ve bazal laminadan içeri geçerek stromaya girer ve maternal vasküler yatağı invaze ederler (38). Trofoblastların stromayı invaze etmeleri ile eş zamanlı olarak stromada desidualizasyon reaksiyonu meydana gelir. Bunun olabilmesi için de endometriyumun proliferatif ve sekretuar değişiklikleri zamanında geçirmiş olup, onu invaze eden trofoblastlara bu reaksiyonu verecek durumda olması gerekir (39).

### **Desidualizasyon**

Endometriyumda, implantasyon ve gebelik fizyolojisine yanıt olarak meydana gelen değişikliklere desidualizasyon denir. Desidualizasyon, endometriyal stromal hücrelerin genişlemesi, adeta epiteloid yapı kazanması ile karakterizedir. Stromal hücreler glikojen ile lipit kapsamlarını arttırlar, poligonal bir görünüm alarak desidual hücreleri oluştururlar. Çekirdek ökromatik, sıklıkla ortada yerleşik ve çekirdekçik belirgindir. Sitoplazma eozinofilik boyanır, içeriğinde bol mitokondri, ara filaman, bol miktarda glikojen ve lipid vakuolleri gözlenir. Spiral arterlerin genişlemesi endometriyuma özgü yeni bir damar oluşumu ile olaylanır. Endotel ve düz kas hücrelerinin damarların yapısını koruyarak proliferasyona uğradığı gözlenir. Desidualizasyon gebelik boyunca sürerek trofoblast invazyonu ve plasentanın şekillenmesini düzenler. Bu düzenlemeyi metalloproteinazlar, sitokinler ve yüzey integrinlerinin ekspresyonlarını düzenleyerek gerçekleştirir (40).

## **Trofoblastların Farklılaşması**

Embriyoblastı çevreleyen trofoblastlar, gelişimin 7,5 – 8. gününde 2 hücre grubuna farklılaşırlar. Bunlar;

- a) Sitotrofoblast denilen tek çekirdekli hücrelerden oluşan iç tabaka,
- b) Sinsityotrofoblast denilen, hücre sınırları pek belirgin olmayan çok çekirdekli hücrelerden oluşan bir dış tabakadır.

Sitotrofoblastlar ince yapı düzeyinde farklanmamış kök hücreler olarak izlenirler. Sitoplazmalarında granülsüz endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve az sayıda mitokondri vardır. Çekirdekleri ise büyük ve ökromatiktir.

Sinsityotrofoblast hücrelerinin intervillöz aralığa bakan yüzlerinde yüzey emilim alanını arttırmaya yönelik çok sayıda düzensiz mikrovillus gözlenir. Mikrovillusları örten hücre zarı, madde emilimde kullanılan bazı enzimler ile çok sayıda hormon ve büyüme faktörü için reseptörler içerir (30-32).

Başlangıçta blastosisti çepeçevre kuşatan sitotrofoblastlar sinsityotrofoblastlara farklıırken, implantasyonun tamamlanıp plasentanın uterus duvarına sıkıca tutunması ve anne bebek arasındaki alışverişin ivedilikle kurulması için farklı trofoblast hücre tipleri ve villus yapıları şekillenir. Kök hücre işlevi gören sitotrofoblastların farklılanması ile iki esas yapı ortaya çıkar (40, 41).

**1. Villöz trofoblastlar:** Plasenta villus ağacının gaz ve madde alışverişinin yapıldığı bölümüdür. Villöz trofoblastlar, sitotrofoblastların füzyona uğramasıyla oluşan sinsityotrofoblastlardır. Sinsityotrofoblastlar, endokrin olarak insan plasental laktojen ve insan koryonik gonadotropin gibi hormonların sentezinde rol alırlar. Fötomaternal dolaşımında madde alışverişi ve endotelial işlevleri de bulunur.

**2. Ekstravillöz trofoblastlar:** Göç ile anne desiduasını invaze eder, endometriyum–miyometriyum sınırını geçerek miyometriyumun yüzeyel 1/3 kısmına tutunmayı sağlarlar. Kök ya da tutundurucu villusları oluştururlar.

Villöz trofoblastlar ve ekstravillöz trofoblastlar yapısal ve işlevsel olarak farklıdırlar. Her iki grup hücre de epitelyal özelliklerini yansıtabacak şekilde sitokeratin pozitif boyanırlar. Villöz trofoblastlar epidermal büyüme faktörlerini ekstravillöz trofoblastlara karşı daha yoğun sentezlerler. Endometriyumda ekstravillöz trofoblastların alt tipi olan endovasküler ekstravillöz trofoblastlar spiral arterleri invaze ederler. Bu hücreler vimentin pozitif boyanan endotel hücrelerin aksine sitokeratin pozitifdirler.

Olgun plasentanın oluşumu sırasında ekstrasvillöz trofoblastlar da iki hücre grubuna ayrılırlar (42, 43);

a. İnterstisiyel ekstrasvillöz trofoblastlar: Miyometriyumun iç üçte birlik kısmına kadar göç ederler. Bu göçle birlikte desiduanın spiral arterlerine ulaşırlar ve çok çekirdekli dev hücrelere ayrılırlar.

b. Endovasküler ekstrasvillöz trofoblastlar: Spiral arterlerin apikal bölümlerinde gevşek plaklar oluştururlar. Spiral arterlerin duvarlarında endotelin yerini alırlar.

Plasentanın uterus'a başarılı bir şekilde tutunmasının gerçekleşmesi için ekstrasvillöz trofoblastlar çeşitli görevleri yerine getirirler. Bunlar spiral arterlerin şekillenmesi, hipoksiye uyum, çoğalma, ayrılma, hareket, hücre dışı maddeye tutunma ve hücre dışı maddenin sindirilmesidir (44).

### **Plasentanın Yapısı**

Plasenta makroskopik olarak disk şeklinde bir organdır. Maternal ve fetal yüzü vardır. Maternal yüzü, bazal plate olarak adlandırılır. Lobüle yapıdadır ve her bir lobüle kotiledon denir. Maternal yüzde yaklaşık 10-40 adet kotiledon vardır (45). Kotiledonlar fonksiyonel yapılar değildir. Fetal yüzü, koryonik plak olarak adlandırılır ve düzgün yüzeylidir. Fetal yüzden umbilikal kordon çıkar ve plasentayı fötüse vasküler olarak bağlar.

Histolojik olarak değerlendirildiğinde plasentayı oluşturan yapıya villus adı verilir.

Villus yapısı; İmplantasyondan yaklaşık 1 hafta sonra plasenta ekstraembriyonik mezoderm ve trofoblast (sitotrofoblast ve sinsityotrofoblast) tabakalarından oluşur. Sitotrofoblastların tek sıra sinsityotrofoblastlar ile çevrili olduğu trofoblast kolonları birincil (primer) villusları oluşturur. Trofoblast kolonlarının içine alttaki ekstraembriyonik mesodermin girmesi ile ikincil (seconder) villuslar oluşur. Postkonsepsiyon 3. haftadan (21. gün) itibaren trofoblast kolonları içindeki mesodermal hücrelerden hemangiogenik prekürsör hücreler ortaya çıkar ve yapı üçüncül (tersiyer) villus adını alır. Tersiyer villus, içinde fetal dolaşımın başladığı ve bu anlamda fonksiyonel olarak olgunluğa erişmiş villusdur ve bu dönemden sonra bütün villuslar tersiyer villus yapısındadır. (46).

Villuslar makroskopik olarak ağaç gibi yapılanmışlardır. Her bir villöz ağacı plasentanın koryonik plate'inden kalın bir kök ile çıkar ve ileriye doğru gittikçe dallanır. Bunlardan çoğu intervillöz mesafede serbestçe yüzer, az bir kısmı ise maternal stroma içine girer. Serbest olanlara yüzen (floating=koryonik), maternal stroma içine girenlere ise çapalanan (anchoring) villus adı verilir. Her bir villus ağacı ve etrafındaki intervillöz mesafe fonksiyonel bir ünite oluşturur. Bu fonksiyonel üniteye "plasentone" adı verilir ve plasentada



60-70 tane plasentone bulunur. Her bir plasentone ortalama olarak 2-4 cm büyüklüğündedir ve plasental septumlarla birbirinden ayrılmıştır (47).

### **Plasental Dolaşım**

Uteroplasental dolaşım fötüsa besin maddeleri ve oksijenin sağlanması için şarttır. Esas olarak uterus spiral arterlerinin aşındırılması, plasentanın yüzeyini örten sinsityotrofoblast katmanının düşük basınç altında anne kanı ile yıkanması ile gerçekleşir. Farklanmış invaziv sitotrofoblastik hücreler kök villusların dışına doğru göç ederek spiral arterleri aşındırırlar ve spiral arterlerin normal hücresel yapılarının yerini alarak bu arterlerin yeniden yapılanmasını sağlarlar. Sonuçta arterler genişler, kan normal dolaşımdan çok daha düşük basınç altındaki bu arterlerin açık uçlarına doğru akar (48).

Dolaşımın başladığı ilk dönemlerde oksijen basıncı düşüktür ve embriyo bu duruma uyum sağlayacak embriyonik hemoglobin içerir. Düşük oksijen basıncı sitotrofoblastik hücre mitozunu uyarır. Bu durum embriyolojik gelişim sürecinde trofoblastların hızla büyümesini uyarıcı çevresel etkenlerden birisidir. 12. haftadan sonra uteroplasental dolaşımın iyice gelişmesi, intervillöz alanı dolduran anne kanının çok sayıda eritrosit ve yüksek oksijen yoğunluğu içermesi ile fetal eritrositlerde oksijeni bağlamak için yüksek oksijen basıncına gereksinimi olan fetal hemoglobin yapımı başlar. Anne kanı spiral arterlerde villuslar arası boşluğa boşalır, villusları yıkar ve sitotrofoblastik kabuğa penetre olmuş spiral venlerin açık uçlarından anne dolaşımına geri döner.

Desidual plağı delen 80-100 adet spiral arter plasentaya maternal kan getirir. Miyadında bir plasentada, dakikada ortalama 3-4 kez yenilenen 150 ml kadar kan intervillöz gölcüklerde bulunur.

Koryon villuslarının yüzey alanı 28. haftada 5 m<sup>2</sup> iken termde 11 m<sup>2</sup>'yi geçmektedir. (4 – 14 m<sup>2</sup>). Madde alışverişi tüm villuslarda değil yalnızca fetal damarların, yüzeyi örten sinsityal zar ile yakın ilişkide bulunduğu villuslarda olaylanır. Bu villusları kaplayan sinsityotrofoblastların apikal yüzlerindeki mikrovilluslar emilim alanını attırır.

Anne ile fötüs dolaşımını birbirinden ayıran plasental bariyer gebeliğin ilk döneminde şu yapılardan oluşur;

1. Fetal damarların endoteli
2. Endotel bazal laminası
3. Villus bağ dokusu
4. Sitotrofoblastların bazal laminası
5. Sitotrofoblastik tabaka

## 6. Sinsityotrofoblastik tabaka

4. aydan sonra madde alışveriş hızını arttırmak için fötal damarlar villus yüzeyine, sinsityotrofoblast tabakasına doğru yaklaşır. Sitotrofoblastik katman ortadan kalkmaya başlar ve beşinci ayda tamama yakını kaybolur. Plasenta bariyeri incelir. Olgun plasentada bu bariyer;

1.Sinsityotrofoblastik tabaka

2.Bu tabakanın bazal laminası

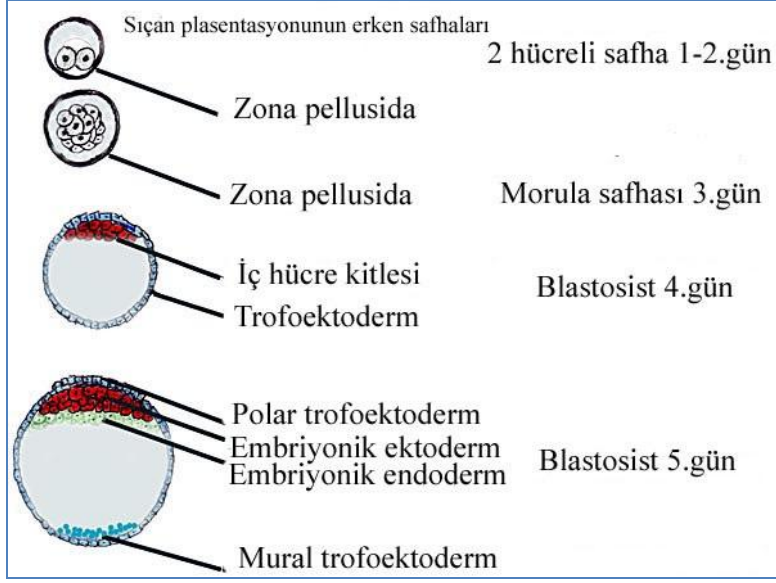
3.Fötal kapillerlerin bazal laminası

4.Fötal kapiller endotelinden oluşmaktadır (31,32,48).

## **SIÇAN PLASENTASININ GELİŞİMİ VE YAPISI**

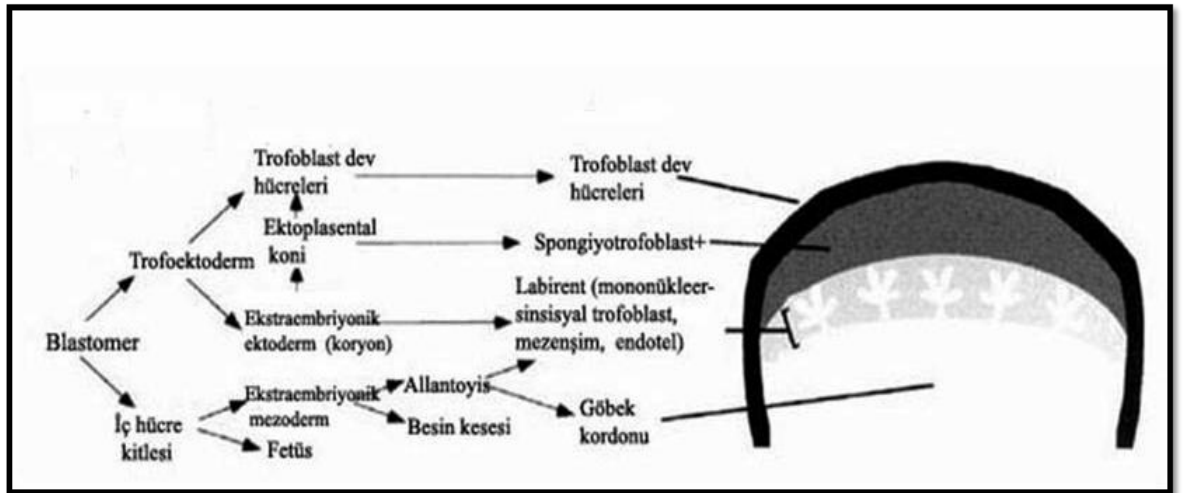
Kemirgen ailesinin bir yesi olan *Rattus norvegicus* türü sanların ortalama ağırlıkları 250 gr'dır. Gebelik süreleri genellikle 21 gün olup yavru sayısı 14'e kadar ulaşabilir, ortalama yavru sayısı ise 7'dir (11).

Sanlarda gebeliğin 1-2. günlerinde embriyo yarıklanır ve iki hücreli olur. 3. günde morula ve 4. gün civarında blastosist evreleri görülür. 4. günün sonunda ise blastosist, trofoektoderm ve i hücre kitlesine farklılaşır. 5. günde trofoektoderm tabakası, trofoektoderm hücrelerinin i hücre kitlesine komşuluk yapıp yapmamalarına göre 2 bölgeye ayrılır: İ hücre kitlesinin üzerinde yer alan polar trofoblastlar ve blastosl çevreleyen mural trofoblastlar (Şekil 3). 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 i hücre kitlesini (gelecekte embriyoyu) oluşturur. Zona pellusida gebeliğin 5. gününde blastosistten kaybolmaya başlar ve blastosist 5. günün sonunda uterus lümeninin antimezometriyal bölgesine implante olur. Definitif (olgun) plasenta mezometriyal bölgeye doğru oluşur ve o bölgede varlığını sürdürür. 6. günde blastosist büyüklüğü artar ve uzar. İmplantasyon alanındaki stromal hücrelerde desidualizasyon görülür. Uterus stromasında desidualizasyon fibroblastların desidua hücrelerine dönüşmesiyle başlar (49,50).



**Şekil 3. Sıçan plasenta gelişiminin erken safhaları (51).**

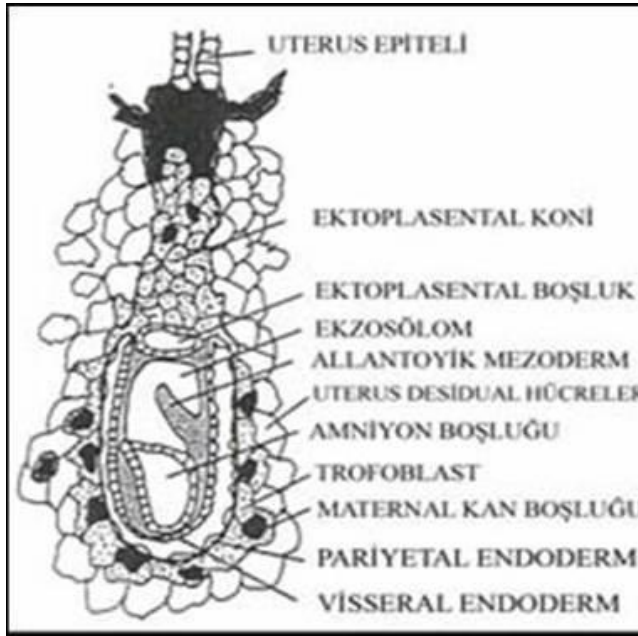
İmplantasyondan sonra iç hücre kitlesinin üzerindeki polar trofoblastlar prolifer olmaya devam ederler ve iç hücre kitlesini blastosölik kaviteye doğru iterek gelişimin yumurta silindiri denilen safhasını oluşturur. Bu hücreler apikal olarak göç eder ve birbirlerinin üzerine yığılırlar. Embriyonik 7-8. günlerde ise ekto-plasental kon ve ekstraembriyonik ektodermi oluştururlar. Ekto-plasental kon, önce sekonder trofoblast dev hücrelerini oluştururlar ve bu hücreler konseptusu çevrelemek üzere göç edip bağlantı zonunun maternal yüzeyini sınırlarlar. Ekto-plasental kon daha sonra da koryoallantoyik plasentanın spongiyotrofoblast tabakasını oluştur (Şekil 4) (49,52).



**Şekil 4. Sıçan plasentasının gelişimi (53).**

İç hücre kitlesi içerisinde gelişen primitif endoderm hücreleri, blastosöl boşluğunu döşemek üzere mural trofoektodermin iç yüzeyi üzerine göç ederler ve pariyetal endodermi oluştururlar. Yumurta silindirinin üzerindeki primitif endoderm hücreleri de visseral endodermi oluşturur. Pariyetal ve visseral endoderm hücreleri morfolojik olarak oldukça farklıdır. Pariyetal endoderm hücreleri küçük, iğ şekilli, visseral endoderm hücreleri ise prizmatik şekillidir (Şekil 5) (54,55).

Pariyetal endoderm, Reichert membranı adı verilen ve sadece kemirgenlerde görülen kollajen, laminin ve distroglikanca zengin kalın bir bazal membran tabakası salgılar. Bu membran pariyetal endoderm hücreleri ve trofoblast dev hücreleri arasında yer alır. Bir bazal membranın tüm morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine sahip olan bu yapı muhtemelen koruyucu bir tabaka olarak davranır. Maternal/fetal yüzeyin bütünlüğünü sağlar ve erken postimplantasyon periyodunda difüzyonal maternal kökenli besinler için karşılıklı değişim tabakasını oluşturur. Trofoblast dev hücreleri, Reichert membranı ve pariyetal endodermi içeren bu yapılar pariyetal yolk salk'ı oluşturur. Pariyetal yolk salk plasental fonksiyon gören en erken yapıdır. Postimplantasyon evresindeki embriyoda pariyetal yolk salk uterus ile direkt olarak kontakt kuran ekstraembriyonik membrandır. Bu yapı gebeliğin ilerleyen günlerinde dejenere olur (56).

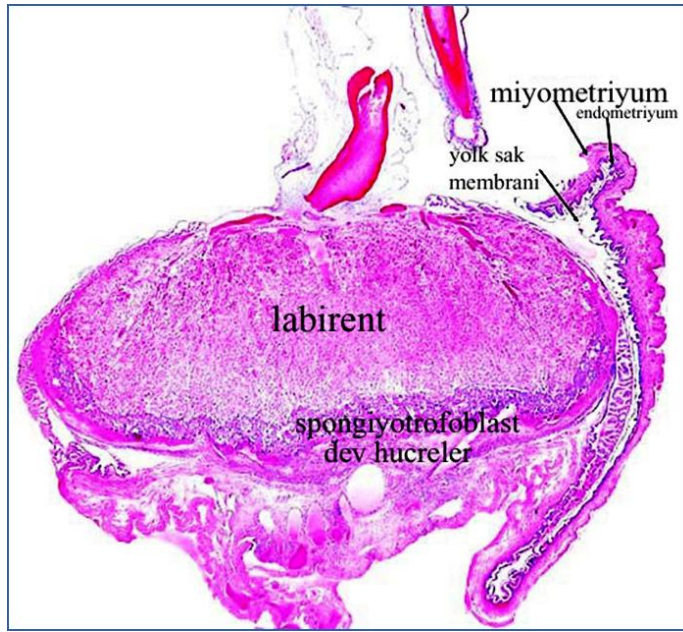


Şekil 5. Sığanda plasental gelişim (55).

## Plasentanın Yapısı

Sıçanlarda plasenta olgun yapısına gebeliğin 12. gününde ulaşır ve hücresel özelliklerine bağlı olarak embriyodan maternal bölgelere doğru 4 kısım halinde görülür (Şekil 6) (14).

- 1-Labirent
- 2-Spongiyotrofoblast tabakası
- 3-Trofoblast dev hücre tabakası
- 4-Maternal desidual katman



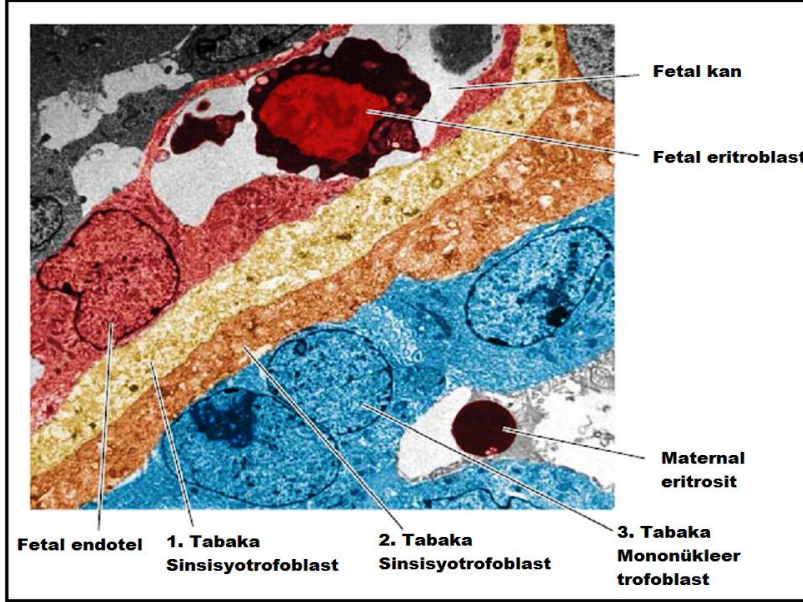
Şekil 6. Sıçanlarda term plasentanın genel görünümü (51).

**1-Labirent:** Ekstraembriyonik ektodermden gelişir ve fetal ve maternal kısımlar arasında besin ve gaz değişimine olanak sağlar. Labirent tabakası gebeliğin 9. gününde oluşmaya başlar. Besin ve gaz değişimi için geniş yüzey alanı sağlayabilmek amacıyla dallanma gösteren bir yapı şeklindedir (13).

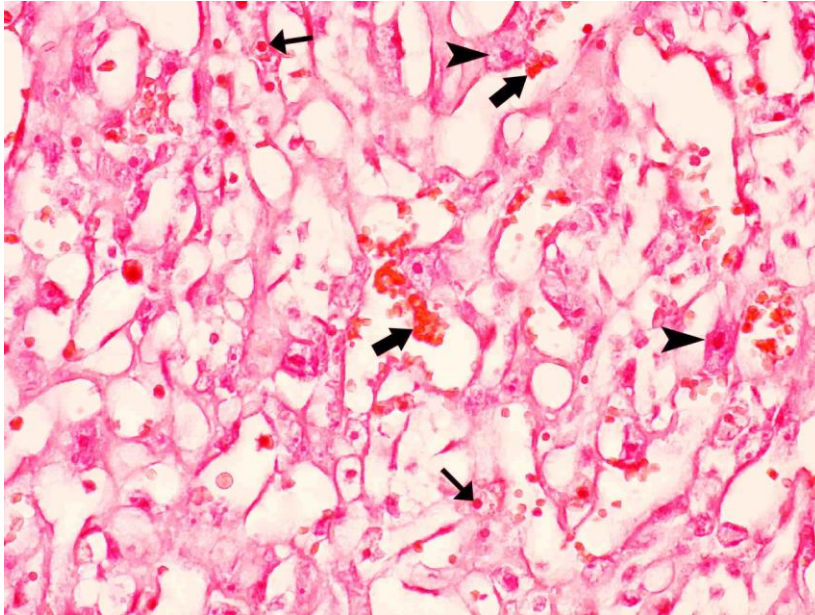
Fötal yüzeyinde ekstraselüler matriks ile desteklenmiş trofoblast tabakası (koryon plağı) yer almaktadır. Göbek kordonu içerdiği fetal arter ve venlerle koryon plağına dahil olur. Trofoblast hücreleri dallanmalar yapar ve villusları oluştururlar. Koryonik villusların dış yüzeyi trofoblast hücrelerinden, iç kısımları ise allantoik mezoderm ve damarlardan oluşmaktadır (57). Labirent trofoblast tabakası 3 tabakalıdır. 1. tabaka maternal kan ile doğrudan temasta bulunan sitotrofoblast hücreleri, 2. ve 3. tabaka ise sinsityotrofoblastlardan oluşur (Şekil 7) (8).



Labirent tabakasının hüresel özellikleri gebelik süreci boyunca değişkenlik gösterir. Gebeliğin son günlerinde mezenşim doku ve trofoblast hücrelerinin miktarındaki azalma ile yavruya ait damarların endotel hücreleri anne kanı ile temas eder ve ilişki en ileri düzeye ulaşır (58).



Şekil 7. Üç sıra halinde düzenlenmiş labirent trofoblast hücreleri (8).



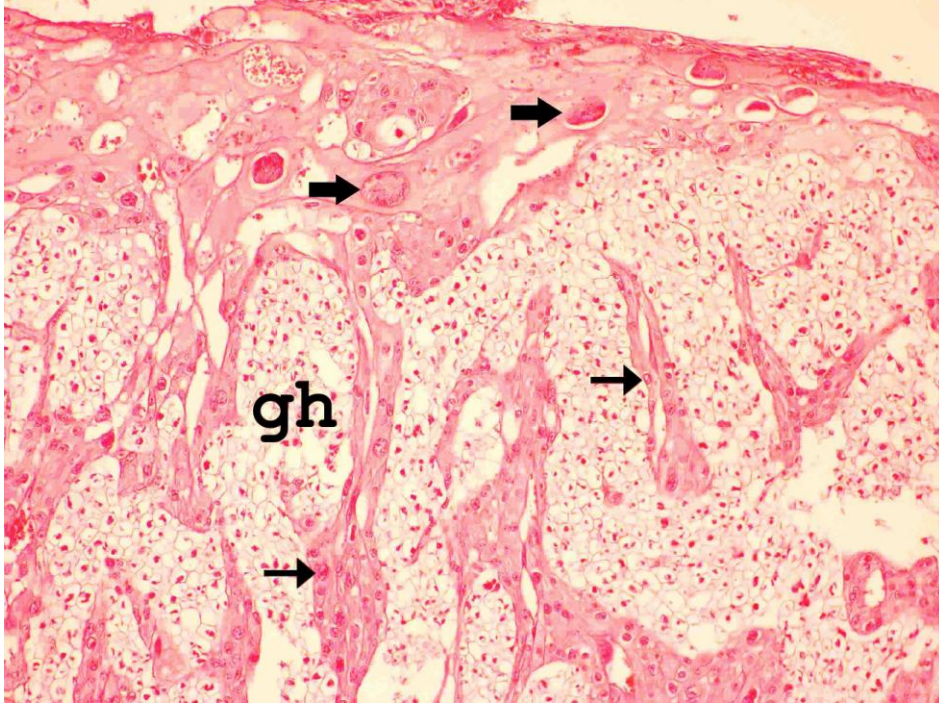
Şekil 8. Gebeliğin 17.gününde labirentin detaylı görünümü. Şekilde labirent trofoblastlar (okbaşı), maternal kan adacıklarına ait nükleussuz eritrositler (kalın ok) ve nükleuslu fötal eritrositler (ince oklarla) görülmektedir.

**2-Spongiyotrofoblast tabakası:** Ektoplasental kondan köken alır ve plasentanın maternal yüzeyini sınırlandırır. Aynı zamanda trofospongiyum olarak da adlandırılır. Bu tabakada fetal kan damarları bulunmaz ama labirente maternal kan taşıyan ve zigot kökenli trofoblast hücrelerinin döşediği maternal kan kanalları bu bölgenin içerisinden geçer. Spongiyotrofoblastlar, çeşitli proteinler (örneğin: prolaktin benzeri protein A, insan plasental laktojen) salgılayarak maternal metabolizmayı etkilerler (59,60).

Bu tabakada spongiyotrofoblastların yanında gözlenen bir diğer hücre tipi trofoblast glikojen hücreleri (glikojenik hücre)'dir (Şekil 9). Gebeliğin 13. gününden sonra glikojen trofoblast hücreleri sıçan plasentasında gruplar halinde görülmeye başlar ancak sayıları gebeliğin ilerlemesiyle azalır. Bunlar oldukça vakuollü hücrelerdir, büyük miktarlarda glikojen içerirler ve sitoplazmaları açık renkte görünür. Spongiyotrofoblast hücrelerinin karakteristiği olan genleri eksprese etmeleri (örneğin: trofoblast spesifik protein beta), bunların spongiyotrofoblast hücresinin farklılaşmış bir alt tipi olduğunu gösterir. Labirent zonda da glikojenik hücreler bulunur ancak herhangi bir fonksiyona sahip olup olmadıkları bilinmemektedir (61). Glikojen hücrelerinin, insülin benzeri büyüme faktörü gibi protein yapıdaki hormonları sentezlemeleri ve salgılamaları fetomaternal etkileşimleri etkileyebileceklerini göstermektedir (62).

**3-Trofoblast dev hücre tabakası:** Maternal desidua ve bağlantı zonu arasında sınır oluşturan trofoblast dev hücreler, endoreduplikasyon sonucu oluşan poliploid hücrelerdir (Şekil 9). Ektoplasental kondan farklılaşan sekonder dev trofoblastik hücreler olarak da bilinirler (primer trofoblast dev hücreleri mural trofoblast türevidir ve definitif plasenta yapısına katılmazlar) (63).

Trofoblast dev hücreleri implantasyon zamanında invaziv hücrelere farklılaşır, uterus epitel hücrelerini fagosite ederler ve uterus stromasına penetre olarak maternal kan ile vasküler bağlantılar yaparlar (64). Annede lokal immün sistem, ovaryum, metabolizma ve kan hücresi üretimini düzenleyen bazı sitokinler ve hormonlar üretirler ayrıca gebeliğin devamı ve koryoallantoyik plasentanın oluşumu, vaskularizasyonu için gerekli hormonları ve büyüme faktörlerini salgırlar (65).



**Şekil 9. Gebeliğin 17. gününde spongiyotrofoblast ve dev hücre tabakasının detaylı görünümü. Açık boyanan glikojenik hücreler (gh), spongiotrofoblastlar (ince oklar) ve dev hücreler (kalın oklar) görülmektedir.**

**4-Maternal desidual katman:** Gebeliğin erken dönemlerinde endometriyumda şekillenen desidua hücreleri katmanıdır. Gebeliğin sonuna doğru atrofiye gider.

## **İNSAN VE SIÇAN PLASENTASI ARASINDAKİ BENZERLİKLER VE FARKLILIKLAR**

### **1-Sınıflandırma**

Sıçan ve insan plasentaları fetal plaseenta/labirentin şekli nedeniyle her iki türde de diskoid olarak sınıflandırılır. Sıçanlar bir kotiledona, insanlar ise çoklu kotiledonlara sahiptir. İnsandaki çoklu kotiledon yapısı, tek bir diske benzeyen sağlam bir demet oluşturur.

Her iki plaseenta tipi de koryo-allantoyiktir. Maternal ve fetal yapılar arasındaki tabaka sayısına göre sıçanlar hemotrikoryal, insan ise hemomonokoryal plaseentaya sahiptir.

Sıçanlarda labirentin ince yapısı insandakinden biraz farklıdır. İnsandaki tek tabakalı sinsityotrofoblastların aksine sıçanlardaki trofoblastik ara yüzey bölgesi üç tabakalıdır. Bu anlamda insan plaseantasına monokoryal, sıçan plaseantasına trikoryal denir (9).



Sıçanlarda yolk salk konseptüsün temel ekstraembriyonik membranı olarak tüm fötüsü çevreler. İnsanda ise fötüsü çevrelemez, sadece birkaç hafta varlığını sürdürür ve değişim fonksiyonunda büyük ölçüde kalıntıdır (10).

## **2- Fötal Plasenta ve Labirent**

İnsan fötal plasentası ile kemirgen labirent tabakası, fötal ve maternal kanın fizyolojik değişimine olanak sağladıkları için fonksiyonel olarak analogtur (9). Her iki türde de bu bölge, fötal yüzünde ekstraselüler matriks tarafından desteklenen bir trofoblast tabakası tarafından sınırlanır ve koryonik plak olarak bilinir. Göbek kordonu, içerdiği fötal arter ve venlerle, koryonik plak aracılığıyla plasentaya bağlanır. Koryonik plaktan koryonik villi olarak bilinen birçok ağaç benzeri yapı çıkar. Koryon plağının dış yüzeyi trofoblast, iç kısımları ise allantoik mezoderm ve damarlardan oluşmaktadır. Allantoik damarlar ve ilişkide olduğu fötal dolaşım, fötoplasental dolaşım sistemini oluşturur. Koryonik plağın trofoblast hücreleri, bağlantı zonu aracılığıyla labirente ulaşan maternal kan ile yıkanır. Bu alanlarda uteroplasental dolaşım gerçekleşir (57,66).

İki yapı, koryonik plağın ana dallarından türeyen dallanmalarında farklılıklar gösterirler. İnsan plasentası villöz tiptedir, koryonik villi sayısız dal ve alt dal içeren bir ağaca benzer. Sıçan plasentası ise ana koryonik çıkıntılarının dalları çok daha fazla birbiriyle bağlantılı olduğundan labirent tiptedir. Bu farklılığın bir sonucu olarak insan fötal plasentasında maternal kanın dolaştığı boşluk (intervillöz boşluk) sıçan labirent tabakasından daha geniştir (66,67).

## **3- Bazal Plak ve Spongiyotrofoblast Tabakası**

İnsan bazal plağı ve bunun kemirgen plasentasında homoloğu olan bağlantı zonu, fötal plasenta/labirent oluşumunun maternal yüzünü oluşturur. Bu yapılarda fötal kan ve kan damarları yoktur. İki türde de bu bölgede sitotrofoblastlar vardır.

Kemirgenlerde bağlantı zonunda iki tip sitotrofoblast vardır: Spongiyotrofoblastlar ve trofoblast glikojen hücreleri. Glikojen hücrelerinin sitoplazmaları açıktır, kümeler teşkil ederler ve glikojen içeren çok sayıda vakuelleri vardır. İlk olarak gebeliğin 13. gününün sonunda görülmeye başlarlar. Gebeliğin 16. gününde sayıları artar, gebeliğin son döneminde ise sayıları oldukça azalma gösterir. Fonksiyonları tam olarak bilinmez. Spongiyotrofoblastlar gibi bağlantı zonunun maternal venöz sinüslerini döşerler ve insülin benzeri büyüme faktörü-2 gibi hormon sentezlerler (62,68).

Kemirgen bağlantı zonunda olduğu gibi insan bazal plağında da iki tip sitotrofoblast vardır. İnsan endovasküler trofoblastları sıçan plasentasında maternal arterleri sınırlayan trofoblastlara, interstisyel trofoblastlar da bağlantı zonundaki herhangi bir damarı invaze etmeyen trofoblastlara benzetilebilir (10).

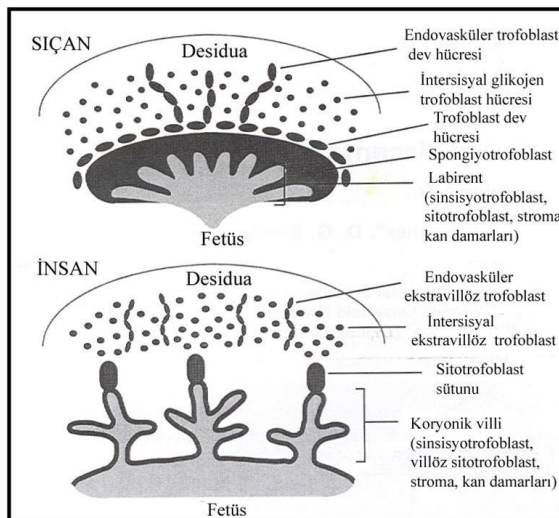
#### 4- Ekstravillöz Trofoblastlar ve Dev Hücreler

Sıçan plasentasında görülen dev hücrelerin insan ekstravillöz trofoblastlarıyla analog olduğu düşünülmektedir (69). İnsanda iki ya da daha fazla çekirdeklidir ve mononükleer ekstravillöz trofoblastların birleşmesiyle ya da sitoplazmik bölünme olmaksızın çekirdek bölünmesiyle oluştuğu sanılır. Kemirgen sekonder dev trofoblastları ise polar trofoektodermden farklıdır. Bağlantı zonunun maternal tarafında bulunur ve poliploid büyük bir çekirdeği vardır (70).

İnsanlarda invazyon işlemi invazif ekstravillöz trofoblast hücreleri tarafından gerçekleştirilirken, sıçan plasentasında trofoblast dev hücreleri implantasyona ve invazyona aracılık eder (71).

#### 5- Plasental Yatak ve Desidua Bazalis

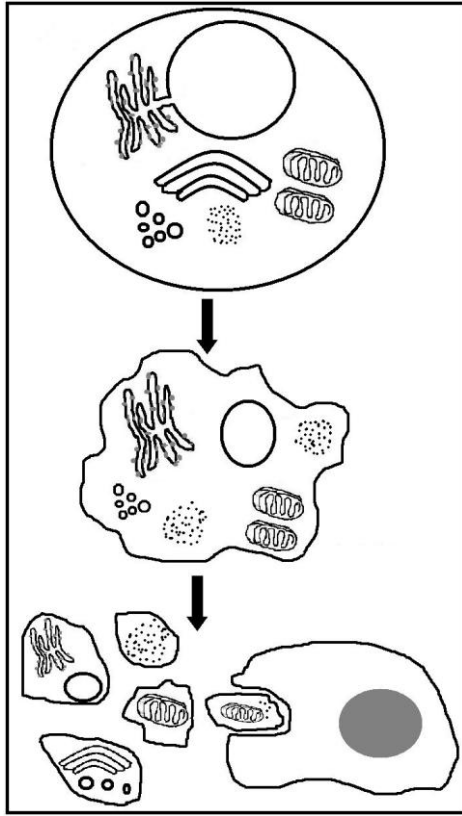
İnsan desidua bazalisi ve altındaki miyometriyumu plasental yatak olarak isimlendirilir. İnsanda trofoblast invazyonu miyometriyumun 1/3' üne kadar uzanırken, kemirgenlerde desidua bazaliste kalır. Ancak sıçanda miyometriyuma kadar geçtiği sanılır (9). İnsan plasenta yatağı ve kemirgen desidua bazalisi maternal arter ve ven içerir. Sonuçta, insan plasental yatağı kemirgen desidua bazalisine analog olabilir (Şekil 10) (57).



Şekil 10. Sıçan ve insan plasentalarının karşılaştırılması (10).

## APOPTOZİS

Apoptoz terimi ilk olarak 1972’de J.F.K.Kerr (72) tarafından nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Eski bir yunan terimi olan apoptoz, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Bugün de bu terimin kullanımı uygundur ve fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümünü anlatır (Şekil 11) (73).



**Şekil 11. Apoptoza maruz kalan bir hücrede hücre ölümünün aşamaları (74).**

Apoptozis programlı hücre ölümüdür ve normal dokuların homeostazı açısından önemlidir. Fazladan olan ve disfonksiyonel hücrelerin yok edilmesi için varolan normal bir fonksiyonu temsil etmektedir (75). Ayrıca embriyogenez sırasında bazı canlılarda parmaklar arasındaki perdenin ve damak füzyonu sonrası kalıntı epitel hücrelerin ortadan kaldırılmasında olduğu gibi, organogenez sırasında apoptozis, fazla üretilen hücrelerin ortadan kaldırılmasını da sağlamaktadır (76). Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam

etmektedir. Böylece ölüm (apoptozis) ve yeniden yapım (mitozis) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir (77).

Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde (primer) başlatılabilir ya da bir uyarı sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyarılar tümör nekroz faktörü, koloni uyarıcı faktörler, nöron büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü 2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, hipertermi, radyasyon, ilaçlar, sitotoksik antikanser ilaçları, hipoksi ve çeşitli antijenler gibi uyarılar olabilir. Özellikle son zamanlarda otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri, virüsler hücreyi apoptozise götürmektedir.

Apoptoziste ana morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Ayrıca mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişiklikler de görülür (78,79).

### **Plasenta ve Apoptozis**

Apoptoz, plasentanın normal gelişmesi için gereklidir (80). Plasentada apoptozu düzenleyen mekanizmalardaki bazı anormalliklerin sinsityotroblast hücrelerinin fonksiyonlarını engelleyerek materno-fetal transport mekanizmasının bozulmasına yol açtığı ve bunun sonunda da uterus içi büyüme geriliğinin görüldüğü (24) bilinmektedir.

Normal gebeliğin farklı dönemlerinde plasentada apoptozis insidansına dair ilk çalışma 1997 yılında sunulmuştur (80). Takip eden yıllarda normal gebelik, preeklampsi, uterus içi büyüme geriliği, ilk trimester abortusları ve gestasyonel trofoblastik hastalıklarda plasentada apoptozis varlığı araştırılmıştır.

İlk ve son trimester normal gebeliklerden alınan plasenta örneklerinde tüm hücre tiplerinde apoptozis gösterilmiş ve apoptotik hücrelerin büyük kısmının (>%50) trofoblastlara ait olduğu ortaya konulmuştur. Yine ilk trimester plasenta örnekleri ile kıyaslandığında son trimester örneklerinde apoptozis insidansının anlamlı oranda arttığı farkedilmektedir. Gebelik ilerledikçe gözlenen artmış apoptozisin doku yaşlanmasının doğal bir sonucu olduğu ve yaşanan dokuların apoptotik uyarılara daha hassas oldukları şeklinde bir görüş belirmiştir (81).

Yine normal son trimester gebeliklerinden alınan plasenta örneklerinde sinsitsiyotroblast tabakasında devamsızlıklar olduğu ve bu alanlarda fibrin tipi fibrinoidin trofoblastik bazal lamina boyunca biriktiği rapor edilmiştir. İlginç olarak fibrin birikimi gösteren alanlarda sinsitsiyotroblastların apoptozise uğramış oldukları fark edilmiştir. Bu

alandaki sinsitsiyotrofoblastlar, kromatin kondensasyonu, nükleer membranda kıvrıntı, yüzeyde mikrovillus kaybı, yüzey protrüzyonları ve sitoplazmik bleb oluşumu, yani apoptoziste görülen hemen tüm ultrasütrüktürel değişimleri sergilemişlerdir. Plasental yaşlanma ile artan apoptozisin plasentada yeniden şekillenme için bir mekanizma olduğu ve bu sayede sinsitsitotrofoblast/sitotrofoblast oranının korunarak plasentadan transportun daha kolaylaştırıldığı bir fizyolojik hadise olduğu vurgulanmıştır (81).

### **TUNEL Metodu**

Apoptozisde ortaya çıkan DNA fragmantasyonunu göstermenin bir yolu da TUNEL metodudur. Bu yöntemle, DNA kırıklarının serbest 3' OH uçları modifiye nukleotidlerle enzimatik olarak işaretlenir. DNA fragmantasyonundan kökenlenen bu yeni DNA uçları, morfolojik olarak gözlenebilen nukleuslarda ve apoptotik cisimciklerde bulunurlar. Bu yöntemle kromatin kondensasyonu oluşmuş ve DNA kırıkları bulunan erken evre apoptozise özgüdür. Daha sonra nukleusda major morfolojik değişiklikler oluşmaya başlar (82,83).

TUNEL metodu, kimyasal olarak işaretlenmiş ve işaretlenmemiş nukleotidler kullanılarak serbest 3' OH uçlarının işaretlenmesi prensibine dayanır. Reaksiyon tamponuna eklenmiş olan nukleotidler, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak enzimatik olarak DNA'ya bağlanması sağlanır. TdT tek sarmallı ya da çift sarmallı DNA'nın 3' OH uçlarına serbest olarak eklenen nukleotid trifosfatları katalizler. Serbest olarak bulunan nukleotidler digoksigenenin-konjugat eklenmesiyle bir oligomer oluştururlar. Daha sonra digoksigenin ile konjuge olan nukleotidler peroksidaz reaksiyonu verebilen anti-digoksigenin antikoru ile bağlanması sağlanır. Böylece bağlanmış peroksidaz antikoru, immunohistokimya ve immunositokimya hassas görünüm sağlayan kromojenik substratlarla bağlanması sağlanır. Sonuç olarak apoptotik cisimciklerde çok yüksek oranda bulunan 3' OH uçlarının hassas ve spesifik boyanması sağlanır (84).

### **HÜCRE ÇOĞALMASI VE PROLİFERE HÜCRE NÜKLEER ANTİJENİ**

Hücre çoğalması hücre bölünmesi ile olur (85). İki mitoz bölünme arasındaki aralık "hücre döngüsü" olarak tanımlanır. Hücre döngüsü iki aşamada olur:

1-İnterfaz evresi

2-Mitoz evresi

İnterfaz, G1 evresi olarak adlandırılan bir aralığı izleyerek çekirdekdeki DNA miktarının iki katına çıktığı (replikasyon) S evresiyle devam eder. S evresini G2 evresi izler. G1 ve G2 evrelerinin önemi mitoz öncesi ve sonrası hücreye büyüme zamanı

kazandırmalarıdır. G1 aşamasındaki hücreler ya DNA çoğalması için S evresine girerler ya da girmezler. Bir hücre S evresine girmezse, G0 (G sıfır) evresi olarak adlandırılan ve tekrar hücre döngüsüne dönmeden önce günlerce, aylarca, hatta yıllarca kalabileceği bir dinlenme evresine girer. İnterfazı, sitokinezle sonlanan mitoz evresi izler ve hücre bölünmesi tamamlanır.

Hücre döngüsünde pek çok denetim noktası vardır. G2 evresinde yer alan bir denetim noktası, replike olmamış DNA'ya hassastır. DNA tam olarak replike olmamışsa hücre m evresine geçemez. Radyasyon gibi nedenlerle DNA'nın hasara uğraması da G1 ve G2 evresinde yer alan denetim noktalarını uyarır ve hücre döngüsünün sürmesi hasar onarılincaya kadar engellenir. Bir diğer denetim noktası ise mitoz bölünme sonundadır. İğ iplikçikleri üzerinde bir ya da daha fazla kromozomun düzgün olarak dizilmemesi, metafazda mitozun durmasına neden olur. Kromozomlar tam olarak dağılmak için düzenleninceye kadar bölünme gerçekleşmez (86).

PCNA çekirdek içi bir antijendir ve DNA polimeraz gamma'nın alt birimi olarak hücre döngüsünde rol oynar (86). PCNA, genomik DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve tamirinde önemli rolü olan 36 KD ağırlığında temel bir proteindir (87,88). PCNA, ilk kez 1986 yılında Bravo (89) tarafından bulunmuş ve siklin olarak adlandırılmıştır. Geni 20. kromozomda yerleşiktir. Bu protein hem bitkilerde hem hayvanlarda bulunur. Sıçandaki aminoasit dizisi insanınkinden 261 aminoasitte sadece 4 aminoasit farklıdır. Hücrelerde başlıca DNA replikasyonu veya sentezi olan yerlerde bulunur (90). PCNA, hücre siklusunun G1 fazında sentezlenmeye başlar, S fazında en yüksek seviyesine ulaşır. G2 ve mitoz evresinde ise PCNA miktarı düşer. PCNA bu özellikleri nedeniyle bir proliferasyon işaretleyicisi olarak kullanılır. G1 evresinden S evresine geçen hücrelerde PCNA ekspresyonu çekirdekte belirlenerek bir hücrenin mitotik erki izlenebilir (89).

PCNA, normal proliferasyon gösteren hücreler ile tümörlerde sentez edilen, sentez hızı hücrelerin proliferasyon ve DNA sentezi hızı ile doğru orantılı olan bir proteindir. İstirahattaki hücreler farklı mitojenlerle uyarıldığında aynı derecede PCNA ve DNA sentezi yapıldığı gösterilmiştir. Biyolojik yarı ömrü yaklaşık 20 saattir (89). Hem hücre DNA sentezi ve onarımı için, hem de hücre siklusunun ilerlemesi için PCNA' nın gerekli olduğu gösterilmiştir (91).

## **GEREÇ VE YÖNTEMLER**

### **DENEKLER**

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen, ağırlıkları 250-300 g arasında değişen, aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip Wistar albino türü 48 dişi ve 12 erkek ergin sıçan kullanıldı. Deney süresi boyunca, tüm deneklerimiz, optimum laboratuvar koşulları ( $22\pm 1$  0C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) altında, günlük içme suyu ve % 21 ham protein içeren pelet yemlerle (Purina) beslendi. Sıçanlar iki dişiye bir erkek olacak şekilde kafeste bir gece bırakıldıktan sonra ertesi sabah sıçanlardan vajinal smear alındı. Mikroskopta bakılan smear örnekleri ile sperm taşıyan sıçanlar belirlendi ve bu hayvanların gebeliğinin birinci gününde oldukları kabul edildi. Deney modeli her grupta 6 hayvan olmak üzere plasental gelişimin gerçekleştiği gebeliğinin 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 ve 21. günlerinden oluşmaktaydı. Gebe dişiler gebeliklerinin 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 ve 21. günlerinde ketamin-xylazin anestezisi altında kurban edildi.

Çalışma için Trakya Üniversitesi Etik Kurulu'ndan (Ek 1) 17.12.2009 tarihinde onay alındı.

### **DOKU TEMİNİ VE HAZIRLANMASI**

Gebeliklerinin 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 ve 21. günlerindeki sıçanlar intraperitoneal (i.p.) yoldan 50 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı/Türkiye) ve 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye) ile anestezisi sağlanıp kurban edildikten sonra, 7, 9, 11 ve 13. günlerdeki plasenta, uterus ve embriyolar birlikte alınıp değerlendirildi. 15, 17, 19 ve 21. günlerdeki embriyo ve plasentalar ayrı ayrı alındı. Bu işlem sonrasında 7, 9, 11 ve 13. günlerde

makroskopik olarak plasenta-uterus ayrımı yapılamadığından plasenta+uterus+embriyo ağırlıkları birlikte, diğer günlerde ise embriyo ve plasenta ağırlıkları ayrı ayrı ölçüldü. Alınan plasenta örnekleri Bouin fiksatifinde (75 cc pikrik asit + 25 cc formalin + 5 cc Asetik asit) tespit edildi. Dokuların ışık mikroskopik incelemeleri için işlemlendirilmeleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

### **IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME**

Işık mikroskopik incelemeler için plasenta dokuları, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Işık Mikroskopi Laboratuvar'ında işlemlendirildi. Bu amaçla plasenta dokuları Bouin fiksatoründe 4 gün fikse edildikten sonra yıkama işlemine geçildi. Dokular 2 gün %70'lik alkolde yıkanarak, dehidratasyon işlemine geçildi. Dokular artan alkol serilerinde (%70, 90, 96, 100) 1'er saat tutuldu. Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma basamağı için dokular 3 seri 15'er dk (dakika) toluol ile muamele edildi. Gömme işleminden önce dokular yumuşak parafinde 1 gece tutuldu. Bir sonraki gün plasenta dokuları yumuşak parafinden alınarak 1 saat sıvı sert parafinde tutularak, bloklandı. Bu bloklardan Leica RM-2245 silindirik mikrotom kullanılarak 5 µm (mikrometre) kalınlığındaki kesitler alındı. Plasentadaki histolojik yapı değişikliklerini ortaya koyabilmek amacıyla alınan kesitler Hematoksilen+Eosin (H+E) ile boyandı. Işık mikroskopunda (Olympus CX31-Japan) incelenerek, bulguların fotoğrafları çekildi.

### **İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME**

Yapılan immünohistokimyasal incelemeler Hsu ve ark. (92) tarafından açıklanan metoda göre yapıldı. İnceleme için plasenta dokusundan 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve deparafinizasyon işlemini takiben kesitler suya indirildi. Suya indirilen kesitler antijen retrieval içinde mikrodalga fırında 20 dk kaynatıldı. Oda ısısında 20 dk soğumaya bırakıldıktan sonra kesitler Fosfat Buffer Solusyonu (PBS) ile yıkandı. Bu aşamadan sonra hidrojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için metanolde (Riedel-de Häen 24229) hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile 20 dk muamele edildi. Distile su içinde çalkalanarak kesitler PBS (pH 7.6) ile yıkandı. Özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere kesitlere %1 preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB) uygulandı. Daha sonra kesitler nemli chamber içinde 1/100 oranında sulandırılmış primer antikor ile 1 saat süre ile inkübe edildi. Kullanılan antikor, mouse monoclonal anti-PCNA antibody (MS-106-B, Thermo LabVision, USA) idi. Kesitler 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 20 dk sekonder antikor solüsyonunda



(Biotinylated Goat Anti-Mouse, LabVision, TM-015-BN) tutuldu. 3 kez PBS'de yıkanan kesitlere 20 dk streptavidin peroksidaz solüsyonu (Streptavidin Peroxidase, LabVision, TS-015-HR) uygulandı. Kesitlere 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dk 3-amino 9-etil karbazol (AEC) kromojen solüsyonu (LabVision, TA-002-HAC) uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 5 dk Mayer hematoksilen uygulanarak zıt boyama yapıldı. Akarsuda 5 dk yıkanan kesitler kapatma solüsyonu (Mounting Medium, LabVision, TA-060-UG) konarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda değerlendirmeye alındı.

### **TUNEL BOYAMA**

Parafin bloklardan lam üzerine alınan 5 µm'lik kesitler 1 gece 37 °C'lik etüvde tutulduktan sonra toluolde 3x5 dk bekletilerek parafinden iyice arındırılarak azalan alkol serilerinden (%100, %95, %70) 3'er dk geçirilip distile suya indirildi. 5 dk distile suda tutulan kesitlere daha sonra antijen iyileştirme amacıyla 15 dk oda ısısında proteinaz K (20 µg/ml, Chemicon, 21627) uygulandı. Distile su ile yıkanan kesitler endojen peroksidazı bloklamak için metanolde hazırlanan %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de 5 dk bekletildi. Distile su ve PBS ile çalkalandıktan sonra lam üzerinde kesitlerin etrafı hidrofobik kalem (Zymed, 00-8899) ile çizilerek havuz oluşturuldu ve kesitlere 5 dk oda ısısında dengeleme tamponu uygulandı. Daha sonra kesitler 37 °C'de TdT enziminde 1 saat bekletildikten sonra durdurma/yıkama tamponuyla 15 saniye çalkalandı ve oda ısısında 10 dk bekletildi. 3 kez PBS'de yıkanan kesitlere antidigoksinin konjüгатı uygulandı ve oda ısısında 30 dk tutuldu. Kesitlere 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dk diamin benzidin (DAB) kromojen solüsyonu (LabVision, TA-002-HAC) uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 10 dk Metil green uygulanarak zıt boyama yapıldı. Distile sudan hızla geçirilen kesitler %100 N-Butanolden de hızla geçirildi. Dehidrate edilen kesitler 3x2 dk toluolde tutulduktan sonra kapatma solüsyonu konarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda değerlendirmeye alındı.

### **İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

#### **Plasenta-Embriyo Ağırlıkları ve Uzunlukları**

Tüm gruplara ait plasenta ve embriyo ağırlıkları hassas terazi ile ölçülüp değerlendirildi.

## **İmmünboyanma ve TUNEL Değerlendirilmesi**

Tüm gruplarda PCNA pozitif hücrelerin immünoboyanma yoğunlukları semikantitatif olarak değerlendirildi. Semikantitatif değerlendirme, aşağıdaki biçimde yapıldı;

-: Negatif, ±: Çok zayıf pozitif, +: Zayıf pozitif, ++: Pozitif, +++: Kuvvetli pozitif, ++++: Çok kuvvetli pozitif X: Bölge mevcut değil.

Ayrıca tüm gruplarda TUNEL pozitif hücre sayıları semikantitatif olarak saptandı. Semikantitatif değerlendirme, aşağıdaki biçimde yapıldı;

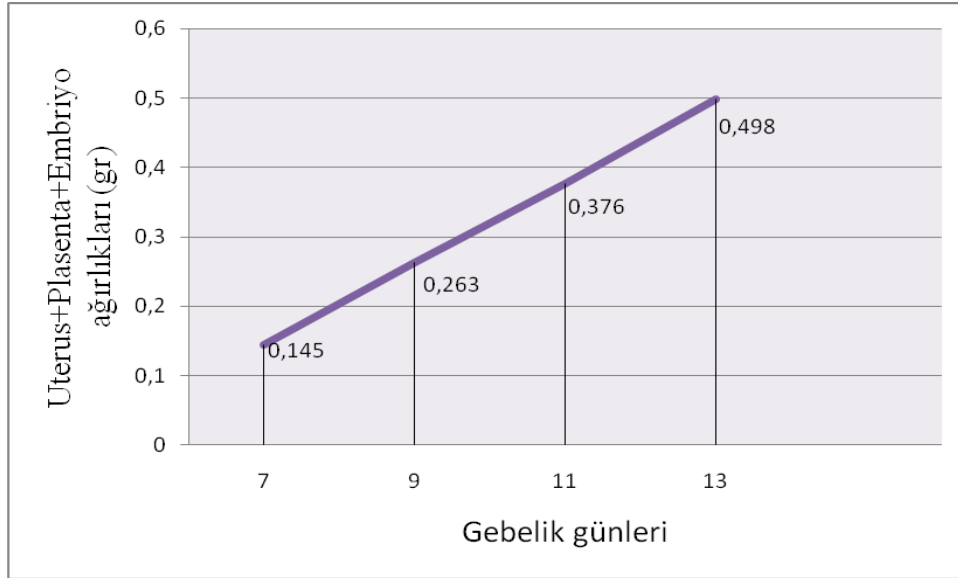
yok (-), nadir (±), az(+), orta (++) , fazla (+++), çok fazla (++++).

Tüm gruplara ait kesitlerde PCNA immünoboyanması pozitif olan hücre sayılarının değerlendirilmesi HSCORE (histolojik skora) ile yapıldı. İmmünohistokimyasal tekniklerle boyanan kesitler özel bir oküler skalası kullanılarak ışık mikroskopunda (Olympus CX31-Japan) değerlendirildi. Tüm gruplar için rastgele üçer kesit seçildi. Her bir kesitte beş bölge X200 büyütmede immünohistokimyasal boyanmanın analizi için değerlendirildi. Boyanmalar, kesitteki özel boyanmanın yoğunluğu temel alınarak semikantitatif olarak skorlandı. Değerlendirme yüzde olarak yapıldı ve alandaki tüm hücreler aşağıda verilen yoğunluk kategorilerinden birisine dahil edildi: 0 (boyanma yok), 1+ (zayıf fakat kontrole göre görülebilir), 2+ (boyanma belirgin), 3+ (boyanma yoğun). Her bir doku için gözlemlenen HSCORE değeri yoğunluk kategorileri ile çarpılarak toplandı [HSCORE=S Pi (i+1), i, yoğunluk skoru ve Pi, hücrelerin yüzde değerleri]. Daha sonra HSCORE değerleri grafiklendirildi. Tüm gruplara ait HSCORE değerlendirilmeleri birbirinden bağımsız iki gözlemci tarafından uygulandı.

## BULGULAR

### UTERUS+PLASENTA+EMBRYO AĞIRLIKLARI

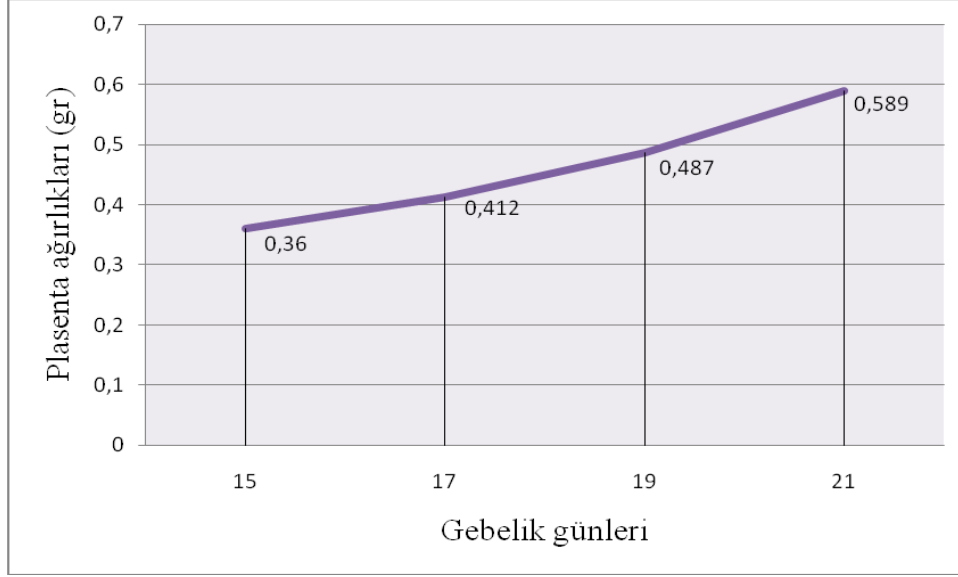
Gebeliğin 7, 9, 11 ve 13. günlerinde plasenta-uterus ayırımı mümkün olmadığı için, bu güne ait örnekler uterus+plasenta+embriyo olarak değerlendirildi. Gebelik yaşının ilerlemesiyle total ağırlığın da arttığı görüldü (Şekil 12).



Şekil 12. Gebeliğin 7, 9, 11 ve 13. günlerine ait uterus+plasenta+embriyo ağırlıkları.

### PLASENTA AĞIRLIKLARI

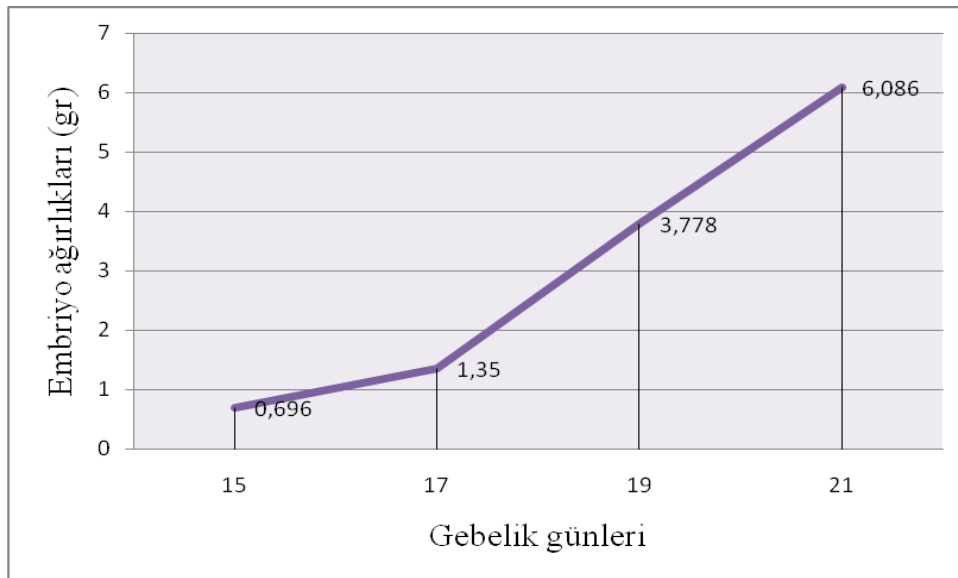
Gebeliğin 15, 17, 19 ve 21. günlerine ait plasentaların ağırlıkları ölçüldü ve gebelik yaşının ilerlemesiyle plaseenta ağırlıklarının da arttığı görüldü (Şekil 13).



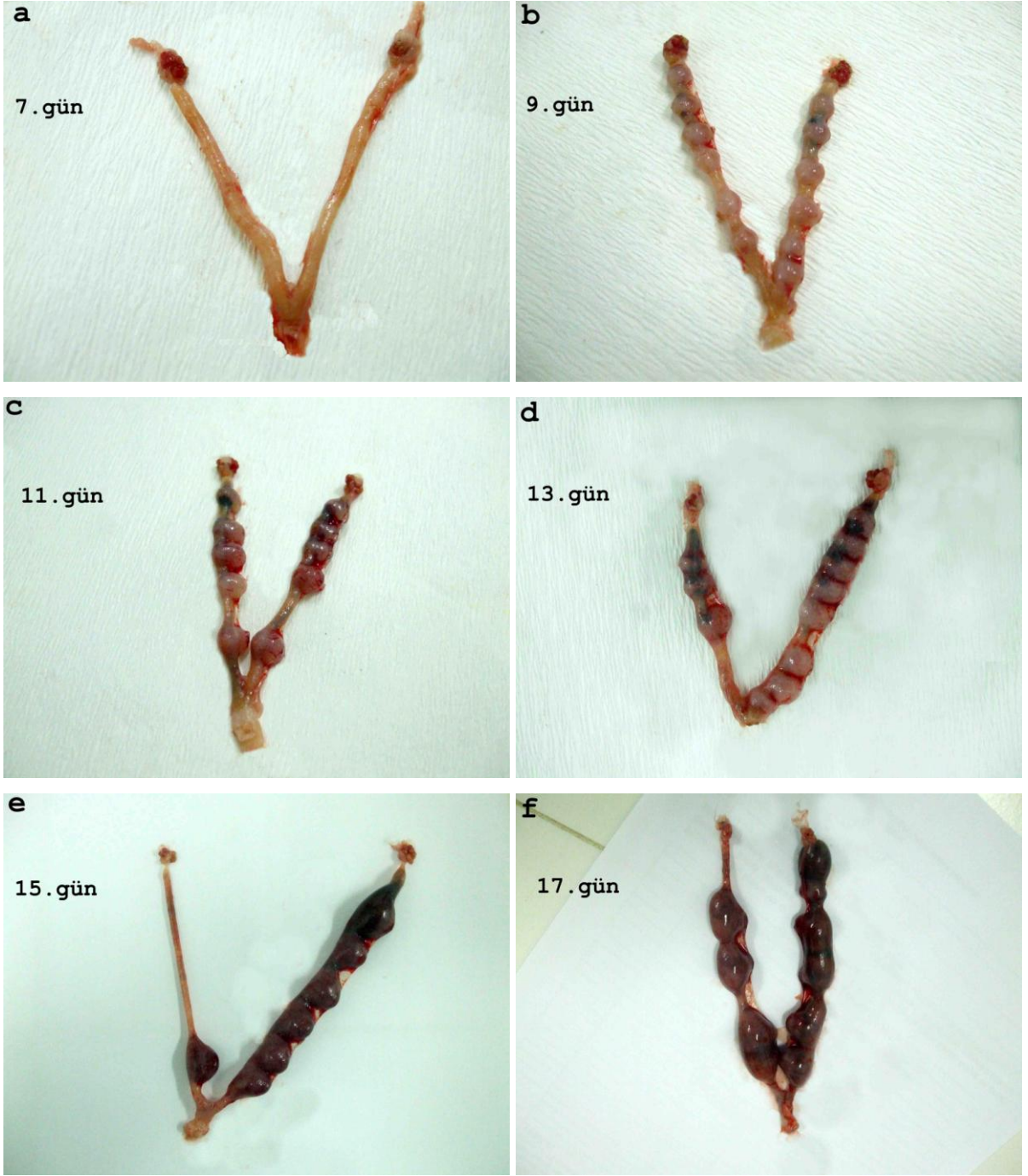
Şekil 13. Gebeliğin 15, 17, 19 ve 21. günlerine ait plaseenta ağırlıkları.

### EMBRİYO AĞIRLIKLARI

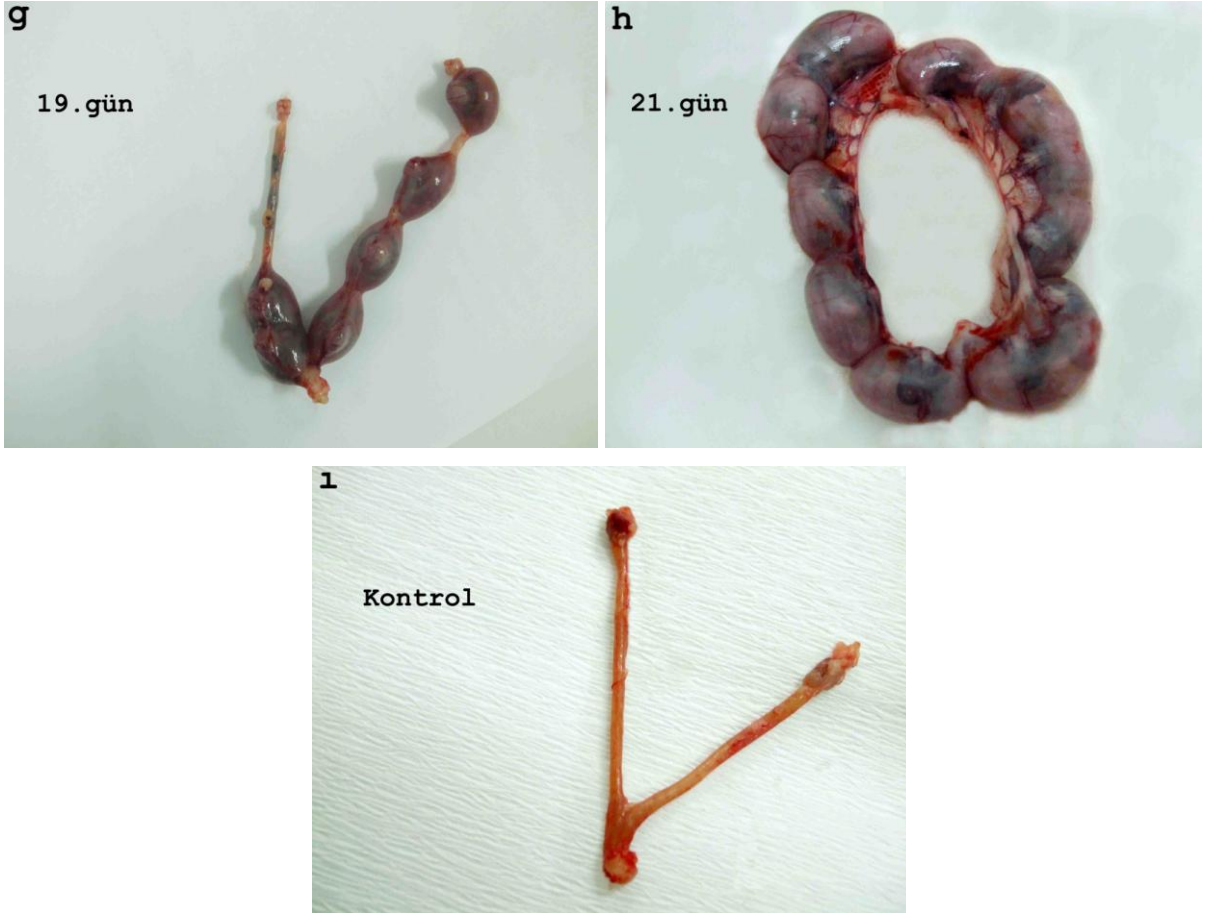
Gebeliğin 15, 17, 19 ve 21. günlerine ait embriyoların ağırlıkları ölçüldü ve gebelik yaşının ilerlemesiyle embriyo ağırlıklarının da arttığı görüldü (Şekil 14).



Şekil 14. Gebeliğin 15, 17, 19 ve 21. günlerine ait embriyo ağırlıkları.



**Resim 1.** Gebeliğin 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 ve 21. günlerine ait uterus+plasenta+embriyo ve normal uterus görünümleri. a: Gebeliğin 7. günündeki uterus. b: Gebeliğin 9. günündeki uterus. c: Gebeliğin 11. günündeki uterus. d: Gebeliğin 13. günündeki uterus. e: Gebeliğin 15. günündeki uterus. f: Gebeliğin 17. günündeki uterus. g: Gebeliğin 19. günündeki uterus. h: Gebeliğin 21. günü. h: Normal uterus.



**Resim 1. 'Devam' Gebeliğin farklı günlerine ait uterus+plasenta+embriyo ve normal uterus görünümleri. a: Gebeliğin 7. günündeki uterus. b: Gebeliğin 9. günündeki uterus. c: Gebeliğin 11. günündeki uterus. d: Gebeliğin 13. günündeki uterus. e: Gebeliğin 15. günündeki uterus. f: Gebeliğin 17. günündeki uterus. g: Gebeliğin 19. günündeki uterus. h: Gebeliğin 21. günü. h: Normal uterus.**

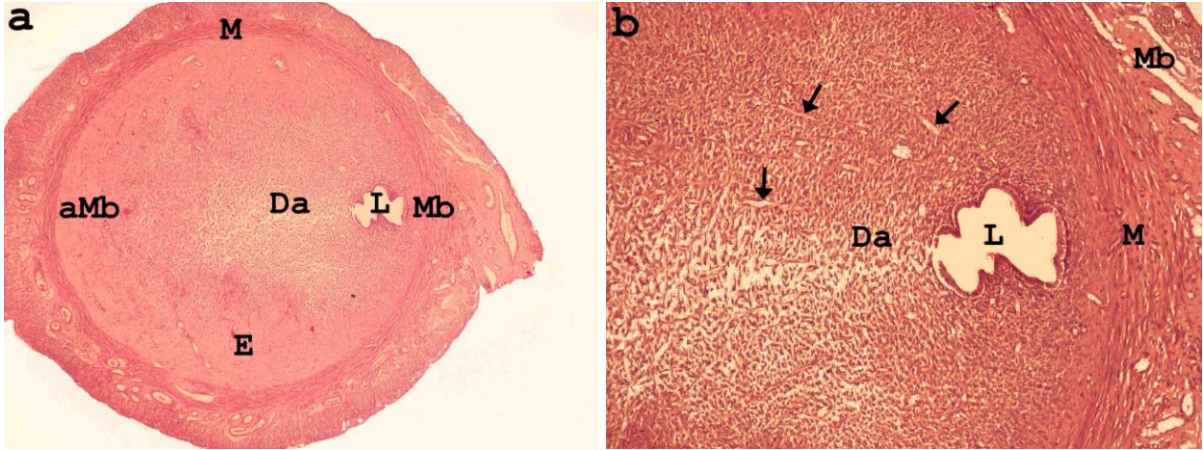


## MORFOLOJİK OLARAK PLASENTAL GELİŞİM

Gebeliğin 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 ve 21. günlerinde elde edilen plasentaların rutin Hematoksilen-Eozin boyaması yapıldı. Işık mikroskobu altında plasentalar incelendi.

### Gelişimin 7. Günü

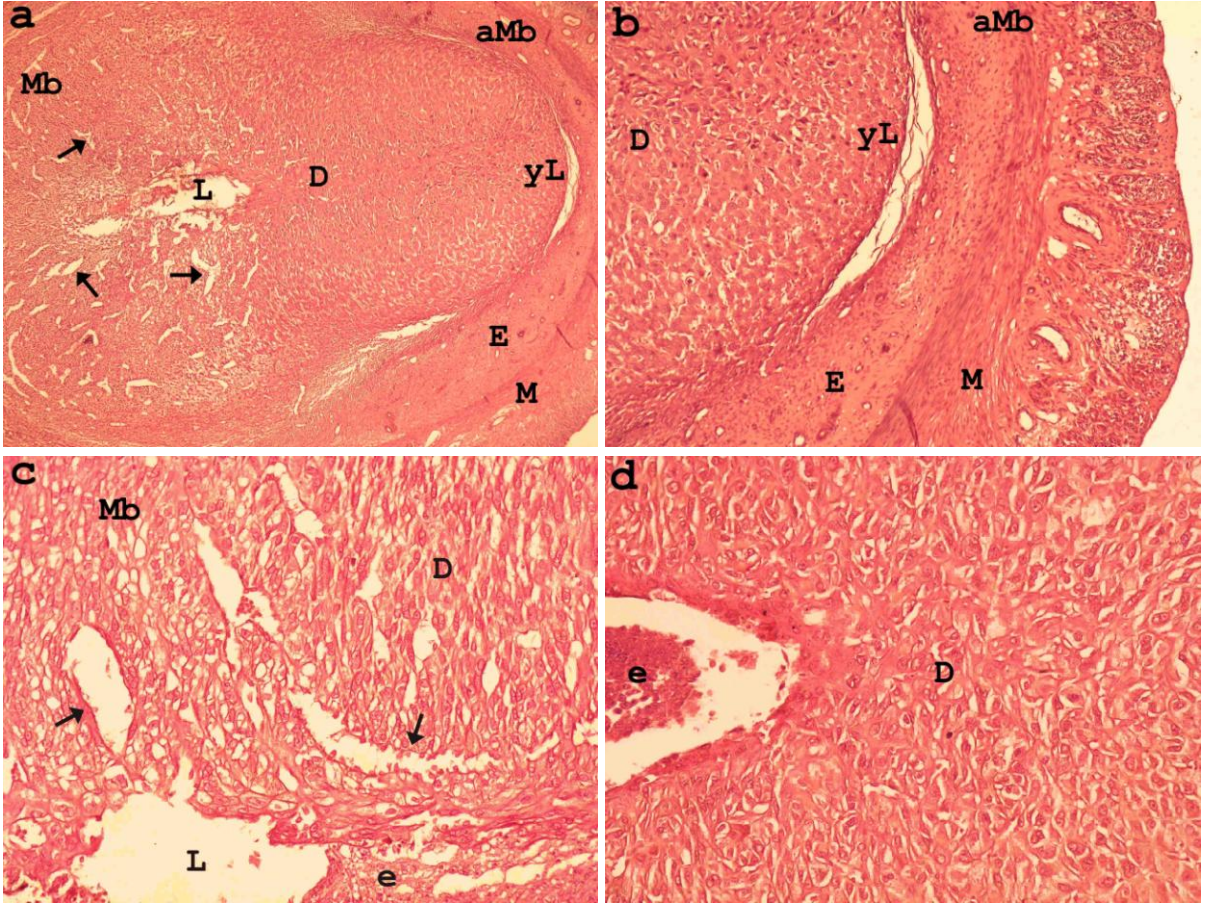
Sıçanlarda gebeliğin 7. gününde, uterusun endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum olmak üzere üç ana katmandan oluştuğu; ayrıca uterusu kan damarlarının girdiği mezometriyal bölge ile bunun karşısında yer alan antimezometriyal bölgenin bulunduğu tesbit edildi. Uterus lümenini döşeyen lamina epitelyalisin etrafında ve daha çok antimezometriyal bölgede olmak üzere bağ dokusu hücrelerinden olan fibroblastların farklılaşmasıyla oluşan desidua hücrelerinin birkaç sıra halinde desiduyu oluşturmaya başladığı gözlemlendi. Oluşan desiduanın endometriyumun orta kısımlarına doğru ilerlemiş olduğu görüldü ve desiduanın, endometriyumun geri kalan kısmıyla belirgin bir şekilde ayrıldığı saptandı. Mezometriyal bölgede ise desiduanın, miyometriyuma oldukça yakın olduğu görüldü. Ayrıca desidual alan içerisinde kan damarlarının varlığı tesbit edildi (Resim 2a,b).



**Resim 2.** Gebeliğin 7. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait H+E boyanmaları. a: Total görünüm. X40. (L: Lümen E: Endometriyum, M: Miyometriyum, Mb: Mezometriyal bölge, aMb: Antimezometriyal bölge, Da: Desidual alan) b: Daha büyük büyütme ile uterus lümeni (L) ve desidual alan (Da) içerisinde oluşan kan damarları (oklar). X100.

### Gelişimin 9. Günü

Sayıları oldukça artan ve genişleyen kan damarları ile birlikte desidua yapının iyice ortaya çıktığı gebeliğin 9. gününde desiduanın, endometriyumun geri kalan kısmından yeniden şekillenen bir lümen ile belirgin bir şekilde ayrıldığı tesbit edildi. Yeni oluşan lümen antimezometriyal bölgede görülmekteydi. Gebeliğin 7. gününe göre de endometriyumun oldukça daraldığı görüldü (Şekil 3a-d).

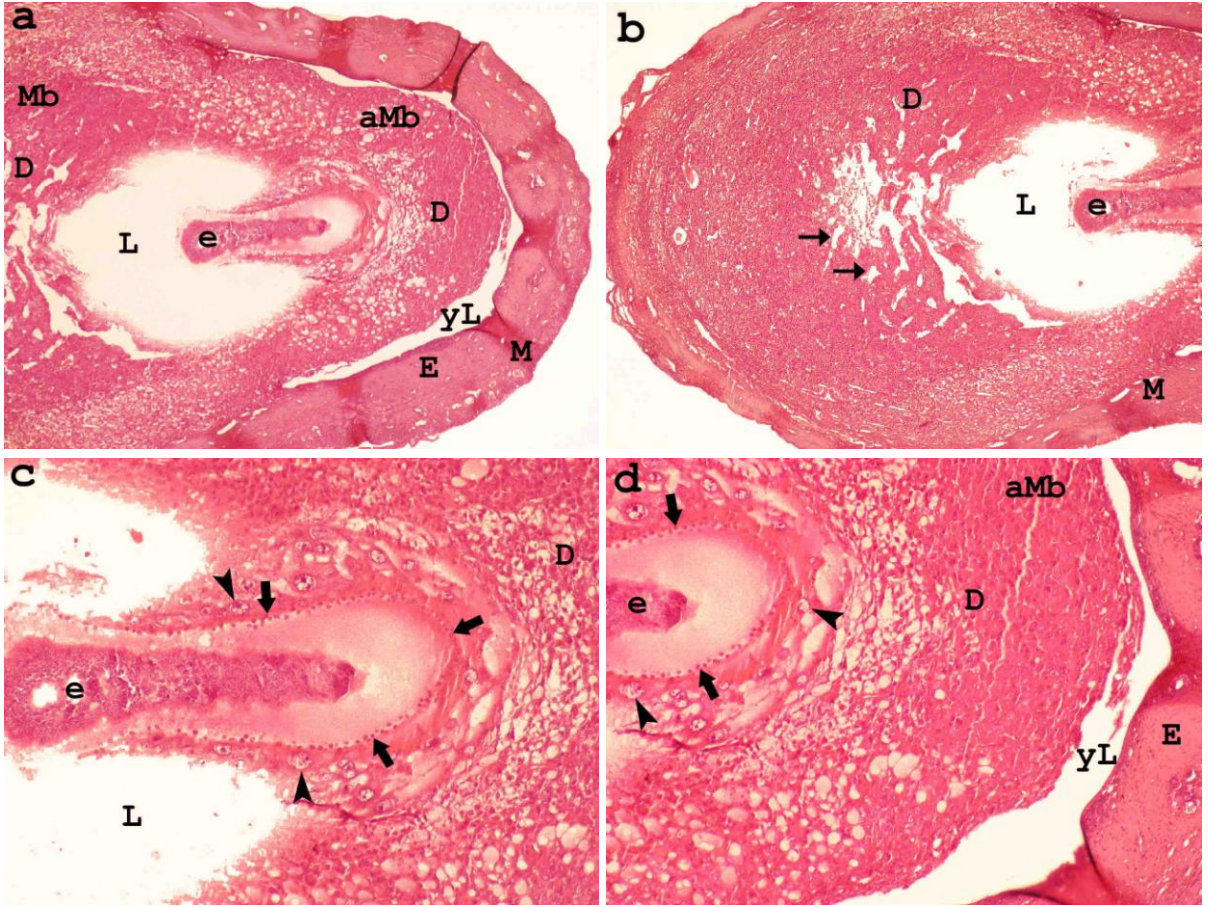


**Resim 3.** Gebeliğin 9. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait H+E boyanmaları. a: Total görünüm. X40. (L: Lümen E: Endometriyum, M: Miyometriyum, Mb: Mezometriyal bölge, aMb: Antimezometriyal bölge, D: Desidua, yL: Yeniden şekillenen lümen, ok: Kan damarları) b: Daha büyük büyütme ile antimezometriyal bölgedeki (aMb) lümen (L), yeniden oluşan lümen (yL), desidua (D), endometriyum (E) ve miyometriyum (M). X100. c: Daha büyük büyütme ile lümen (L) içerisindeki embriyo (e) ve desidua (D) içerisindeki kan damarları (ok). X200. d: Daha büyük büyütme ile embriyo (e) ve antimezometriyal bölgedeki desidua (D). X200.



## Gelişimin 11. Günü

Gebeliğin 11. günündeki sıçan plasentasında mezometriyal ve antimezometriyal bölgede iki ayrı desidual alan görüldü. Mezometriyal bölgede gözlenen ve gelecekte koryoallantoyik plasentayı oluşturacak olan desiduanın, kan damarları bakımından daha zengin olduğu gözlemlendi (Resim 4a,b). Lümen içerisinde embriyo görülmekteydi. İHK içerisinde gelişen primitif endoderm hücrelerinin oluşturduğu pariyetal endoderm hücreleri ve trofoblast dev hücreleri de antimezometriyal bölgede gözlemlendi. (Resim 4c,d).

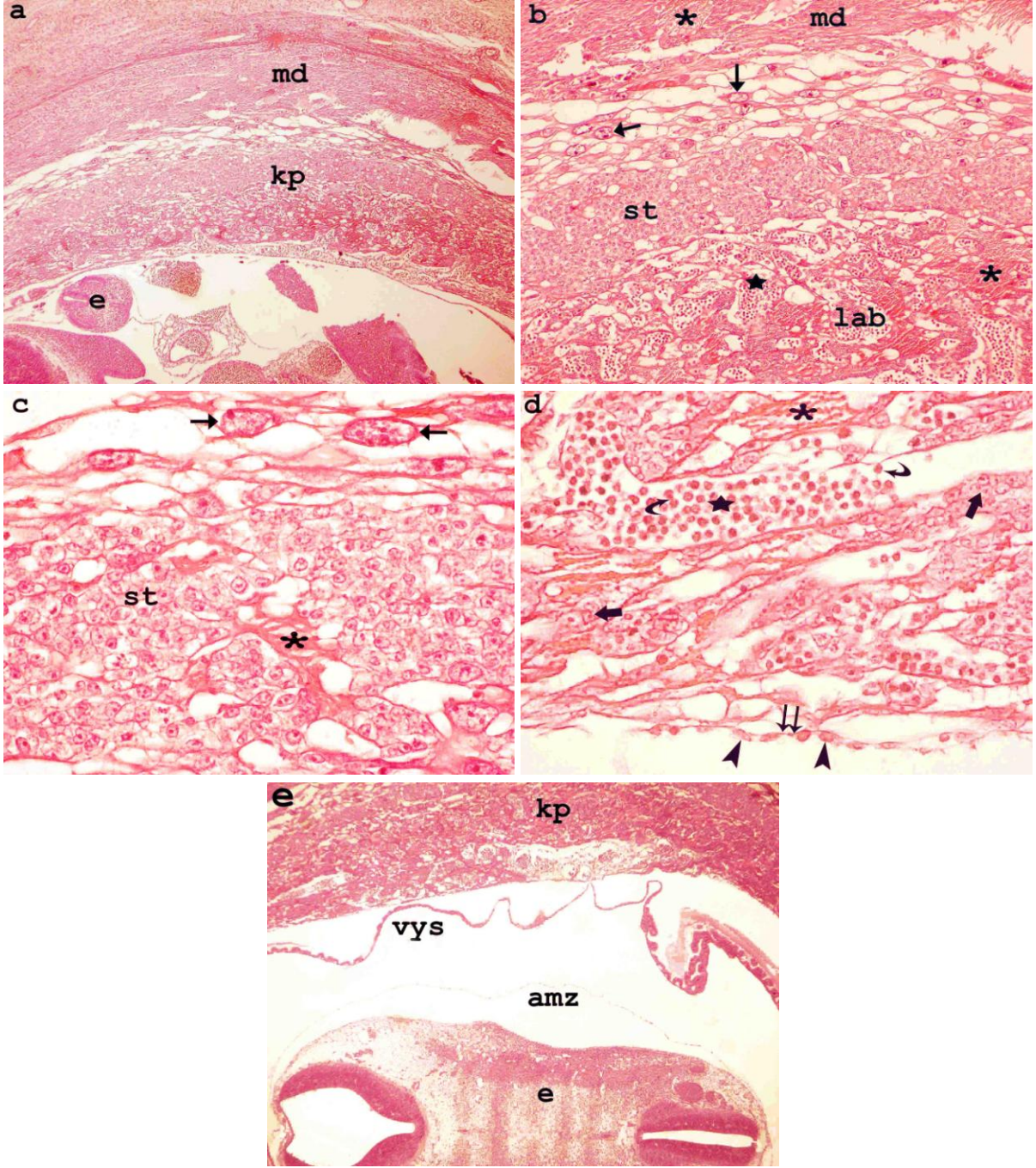


**Resim 4.** Gebeliğin 11. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait H+E boyanmaları. a,b: Total görünüm. X40. (L: Lümen, E: Endometriyum, M: Miyometriyum, Mb: Mezometriyal bölge, aMb: Antimezometriyal bölge, yL: Yeniden şekillenen lümen, D: Desidua, e: Embriyo, İnce ok: Kan damarları) c: Daha büyük büyütmede lümen (L) içerisinde embriyo (e), pariyetal endoderm hücreleri (kalın ok) ve trofoblast dev hücreleri (okbaşı) görülmekte. X200. d: Yine daha büyük büyütmede embriyo (e), antimezometriyal bölgedeki (aMb) yeniden oluşan lümen (yL), endometriyum (E), pariyetal endoderm hücreleri (kalın ok), trofoblast dev hücreleri (okbaşı) görülmekte. X200.

### **Gelişimin 13. Günü**

Gebeliğin 13. gününde sıçan plasentası olgun yapısına ulaşmıştı. Bu günde, maternal desidua katman ile birlikte koryoallantoyik plasentada 3 farklı bölge ayırt ediliyordu. Bu bölgeler dıştan içe doğru trofoblast dev hücre tabakası, bağlantı zonu ve labirent tabakasıydı. (Resim 5a-d). Labirent tabakasının, çekirdekli eritrositler içeren fetal kan adacıkları ve çekirdeksiz eritrositler içeren maternal kan adacıkları içerdiği görüldü. Labirent tabakanın en dış kısmında Reichert membranı ve bu membranın üzerinde pariyetal endodermal hücreler bulunmakta idi. (Resim 5b,d). Bağlantı zonunun, spongiyotrofoblastlar ve maternal kan adacıklarından oluştuğu ve fetal kan adacıkları içermediği görüldü. Maternal kan adacıkları da çekirdeksiz eritrosit içeren yapıları ile kolaylıkla ayırt edilebilmekteydi. (Resim 5b,c). Spongiyotrofoblast ile desidua arasında yer alan trofoblastik dev hücreler koryoallantoyik plasentayı dıştan çevrelemekteydi (Resim 5b). Gebeliğin 13. gününde embriyoyu dıştan saran amniyon zarı ve bu zarın dışında visseral yolk salk gözlendi (Resim 5e).



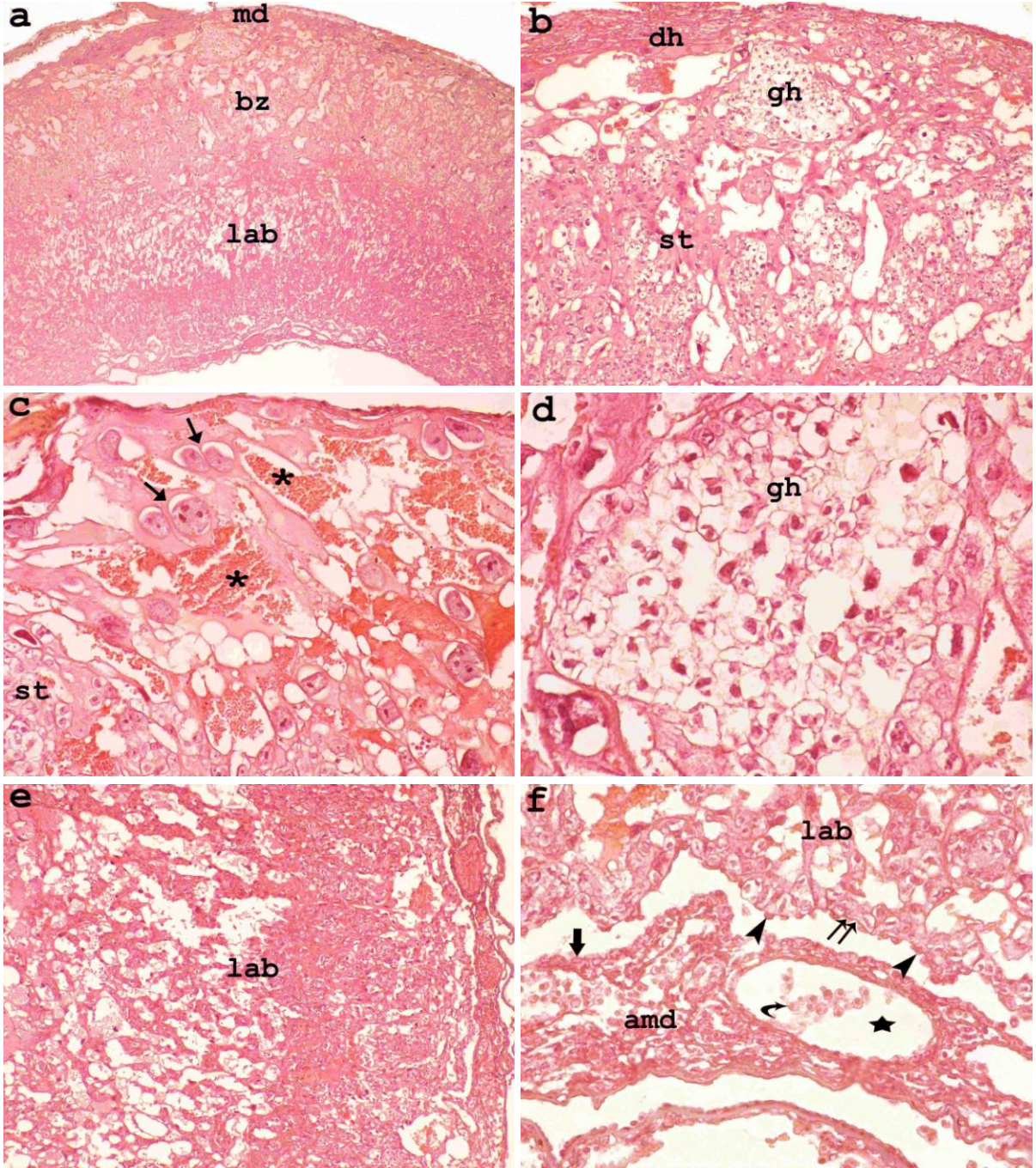


**Resim 5.** Gebeliğin 13. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait H+E boyanmaları. a: Total görünüm. X40. (md: maternal desidua, kp: koryoallantoyik plasenta, e: embriyo) b: Fetal kan adacıkları (yıldız) ve maternal kan adacıkları (\*) içeren labirent tabakası (lab), spongiotrofoblastlar (st), trofoblast dev hücreleri (ince ok) ve maternal kan adacıkları (\*) içeren maternal desidua (md). X100 c: Daha büyük büyütme ile spongiotrofoblastlar (st), maternal kan adacıkları (\*) ve trofoblast dev hücreleri (ince ok). X200. d: Labirent bölgesinde fetal kan damarlarına (yıldız) ait çekirdekli eritrositler (eğik ok), çekirdeksiz eritrositlere sahip maternal kan adacıkları (\*) ve labirent trofoblast hücreleri (kalın ok) görülmektedir. Ayrıca labirent tabakasının dışında üzerinde pariyetal endoderm hücrelerinin (okbaşı) bulunduğu Reichert membranı (çift ok) görülmektedir. X400. e: Koryoallantoyik plasenta (kp), embriyo (e) ve embriyo dıştan komple saran amniyon zarı (amz) ile visseral yolk salkı (vys) görülmektedir. X100.

### **Gelişimin 15. Günü**

Gebeliğin 15. günündeki sıçan plasentasının 13. gündeki plasentaya göre oldukça gelişmiş olduğu görüldü (Resim 6a). Gebeliğin 15. gününde labirent ve spongiyotrofoblast tabakası 13. güne göre daha genişti. Labirent tabakasındaki fõtal eritrositler hala çekirdekliydi. Labirent tabakasının hemen üstünde yer alan spongiyotrofoblast tabakasında, spongiyotrofoblast hücreleri ve önceki gebelik günlerinde gözlenmeyen glikojen hücreleri yer almaktaydı (Resim 6b-d). Spongiyotrofoblast tabakasının üstünde ise dev trofoblast hücreleri mevcuttu (Resim 6b,c). Labirent tabakası ve bağlantı zonu aynı büyüklükteydi. Labirent tabakasında fetal eritroblastlar içeren fetal kan adacıkları ve maternal kan adacıkları vardı. Labirentin en dışı Reichert membranı ve bu membranın üzerindeki pariyetal endoderm hücreleri ile dõşeliydi. Visseral endoderm hücreleri ile çevrilen ve etrafında allantoyik mezenşimal dokunun bulunduğu allantoyik damarlar da bu tabakada görülmekteydi (Resim 6e,f).



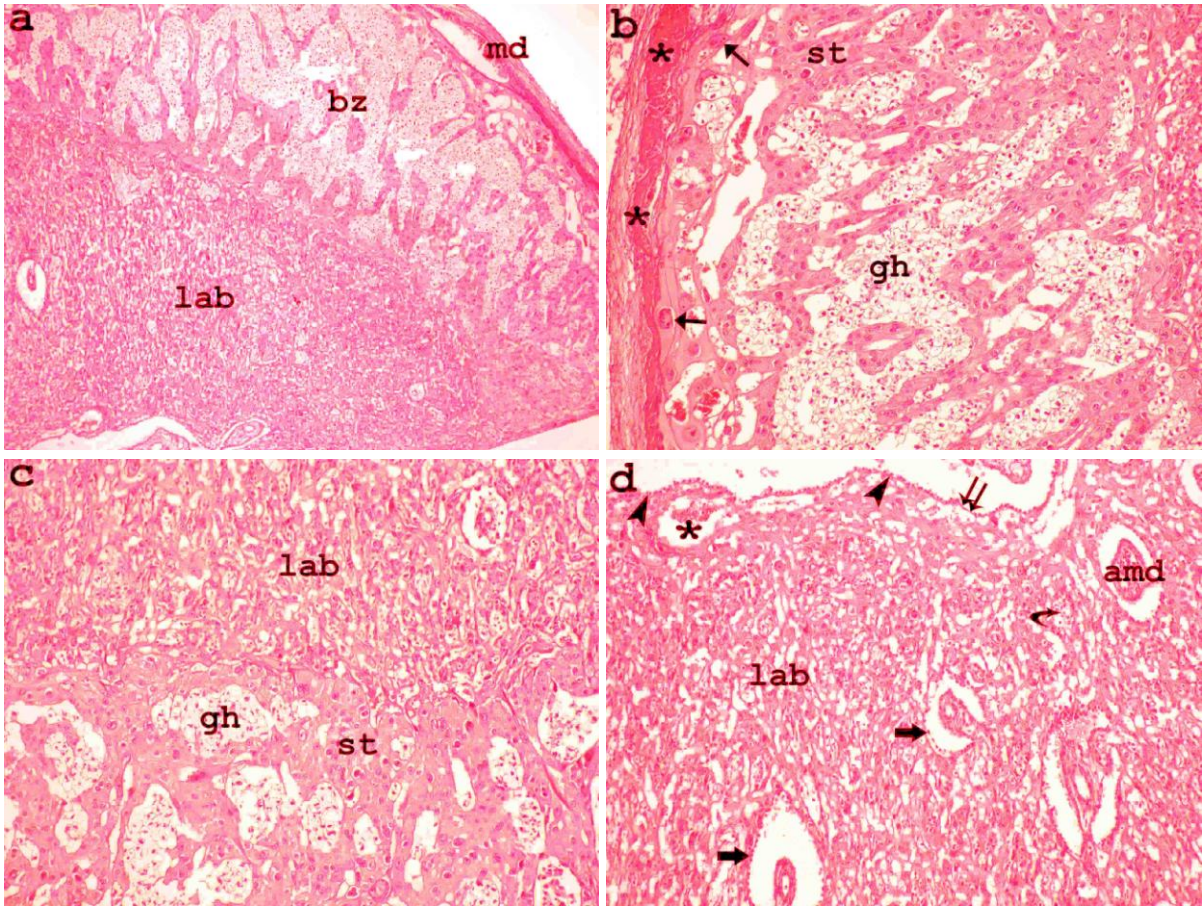


**Resim 6.** Gebeliğin 15. günündeki plasenta kesitine ait H+E boyanmaları. a: Total görünüm. X40. (lab: labirent tabakası, bz: bağlantı zonu, md: maternal desidua) b: Trofoblast dev hücreleri (dh) ile bağlantı zonunda spongiyotrofoblast (st) ve glikojen hücreleri (gh) X100. c: Trofoblastik dev hücreler (ince ok), bağlantı zonundaki spongiotrofoblastlar (st) ve maternal kan adacıkları (\*). X200. d: Glikojen hücreleri (gh). X400. e: Labirent tabakası X100 f: Allantoyisteki kan damarlarına (yıldız) ait çekirdekli eritrositler (eğik ok), Reichert membranı (çift ok) üzerinde uzanan pariyetal endoderm hücreleri (okbaşı) ve allantoyik mezenşimal doku (amd) ile visseral endoderm hücreleri (kalın ok). X400.



## Gelişimin 17. Günü

Gebeliğin 17. günündeki sıçan plasentasının en geniş bölgesini labirent tabakası oluşturmaktaydı (Resim 7a). En dışta yer alan maternal desiduada geniş kan adacıkları göze çarpmaktaydı. Maternal desiduanın hemen altındaysa dev trofoblast hücreleri yer almaktaydı. Dev trofoblast hücrelerinin hemen altında yer alan spongiyotrofoblast tabakasında yer alan glikojen hücrelerinin sayılarının gebeliğin 15. gününe göre oldukça arttığı tesbit edildi (Resim 7b,c). Labirentin en dışı Reichert membranı ve bu membranın üzerindeki pariyetal endoderm hücreleri ile döşeliydi. Yine bu günde visseral endoderm hücreleri ile çevrilen ve etrafında allantoyik mezenşimal dokunun bulunduğu allantoyik damarlar da görülmekteydi (Resim 7d).

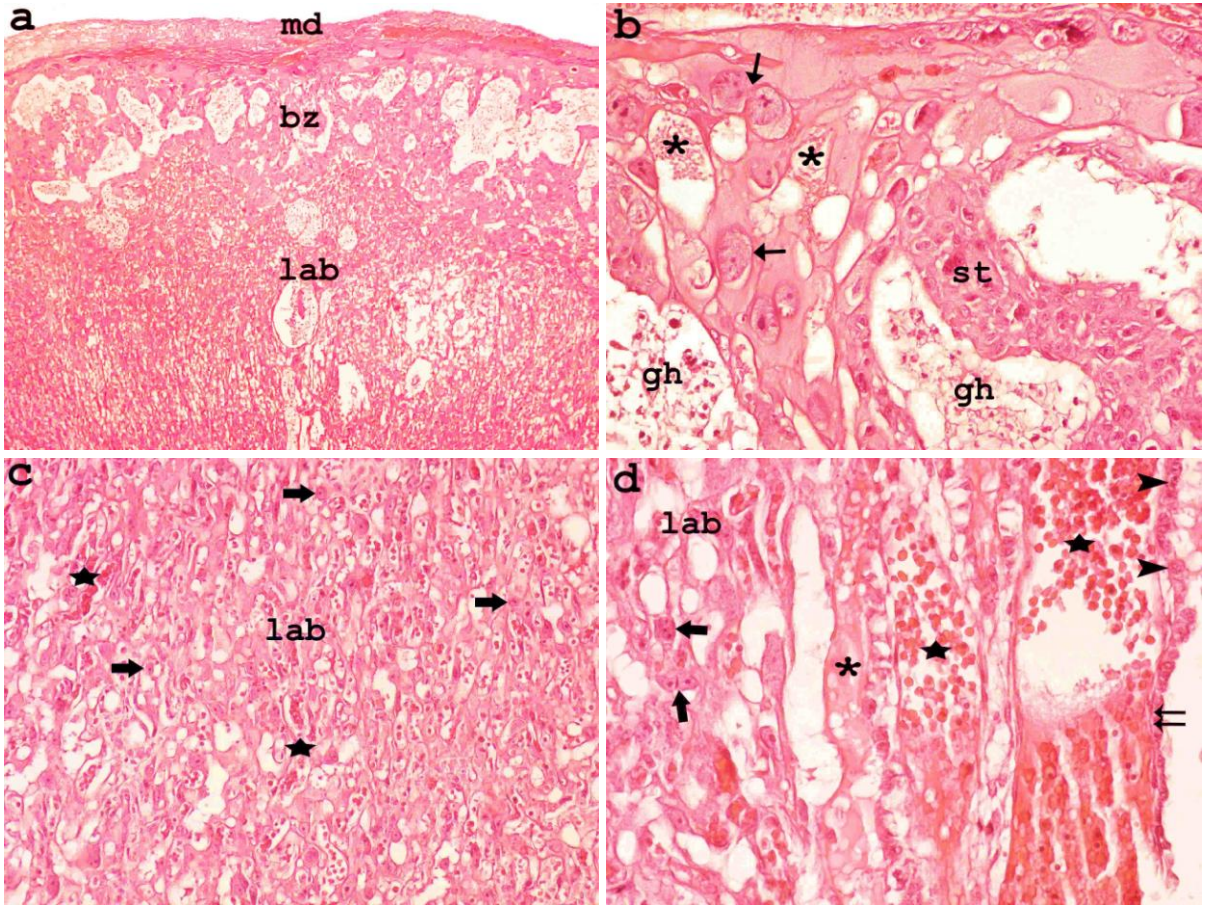


**Resim 7.** Gebeliğin 17. günündeki plasenta kesitine ait H+E boyanmaları. a: Total görünüm. X40. (lab: labirent tabakası, bz: bağlantı zonu, md: maternal desidua) b: Maternal desiduada geniş kan adacıkları (\*), trofoblastik dev hücreler (ince ok) ile bağlantı zonunda spongiyotrofoblast (st) ve glikojen hücreleri (gh). X100. c: Labirent ve bağlantı zonu ayrımı görülmekte X100. d: Labirent tabakasında (lab), fetal kan damarlarına ait çekirdekli eritrositler (eğik ok), Reichert membranı (çift ok) üzerinde uzanan pariyetal endoderm hücreleri (okbaşı) ve allantoyik mezenşimal doku (amd) ile çevrili allantoyik fetal kan damarlarının etrafını çevreleyen visseral endoderm hücreleri (kalın ok) ve maternal kan adacıkları (\*). X100.



### Gelişimin 19. Günü

Gebeliğin 19. günündeki sıçanların plasentalarında labirent tabakasının büyümüş olduğu ve plasentanın büyük bir kısmını kapladığı tespit edildi. Trofoblast dev hücre tabakasının hemen altında gebeliğin 17. gününe nisbeten daha az glikojen hücre kümesi içeren spongiotrofoblast tabakası vardı (Resim 8a,b). Labirent tabakasında bol miktarda çekirdeksiz eritrosit içeren fötal damarlar ve labirent trofoblast hücreleri tesbit edildi (Resim 8c). Labirent tabakasının en dışında ise Reichert membranı ve bu membranın üzerini döşeyen pariyetal endoderm hücreleri görülmekteydi (Resim 8d).

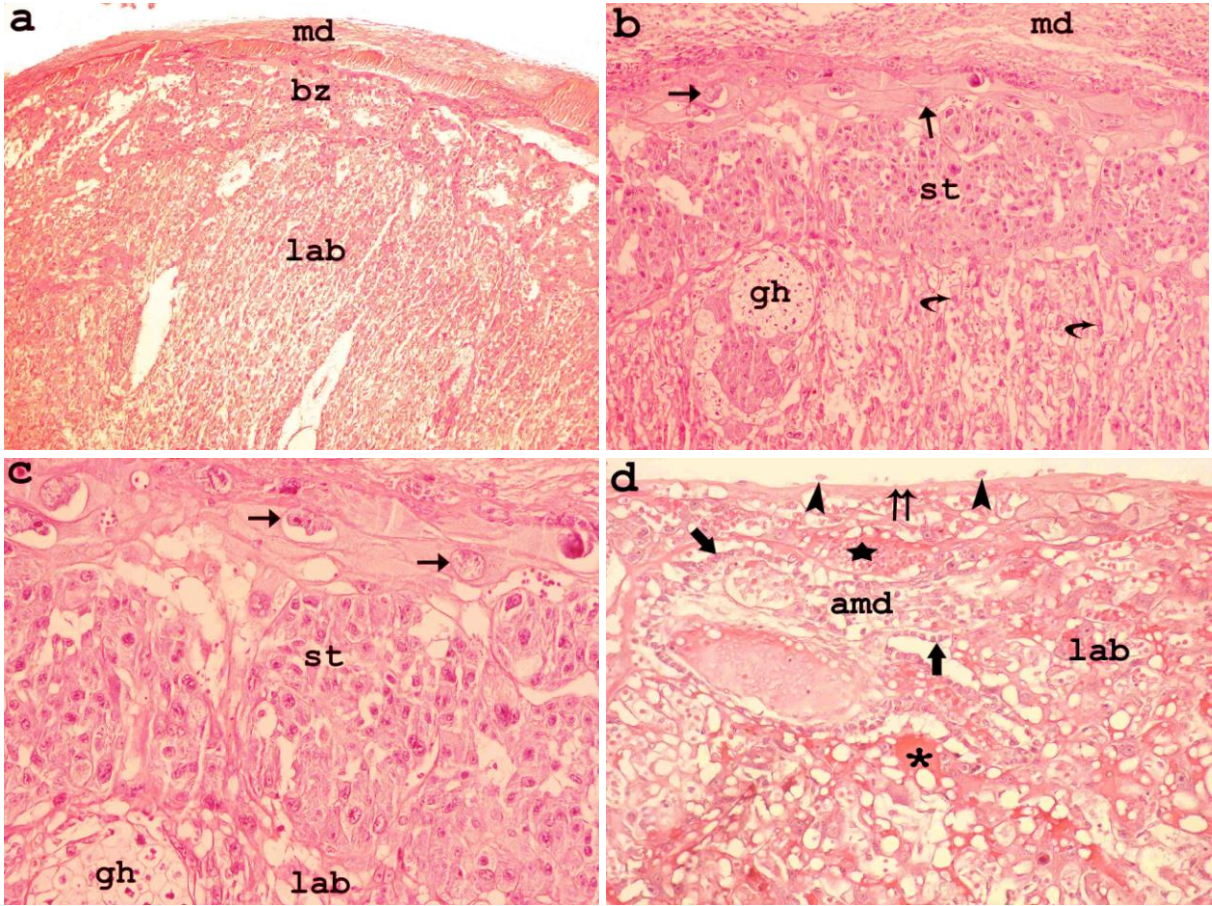


**Resim 8.** Gebeliğin 19. günündeki plasenta kesitine ait H+E boyanmaları. a: Total görünüm. X40. (lab: labirent tabakası, bz: bağlantı zonu, md: maternal desidua) b: Bağlantı zonunda trofoblastik dev hücreler (ince ok), spongiyotrofoblast hücreleri (st) ve glikojen hücreleri (gh) görülmekte. X100. c: Labirent tabakası (lab) içindeki labirent trofoblast hücreleri (kalın ok) ve fötal kan damarları (yıldız). X100. d: Labirent tabakasında (lab), çekirdeksiz eritrosit içeren fötal kan adacıkları (yıldız), maternal kan adacıkları (\*) ve Reichert membranı (çift ok) üzerinde uzanan pariyetal endoderm hücreleri (okbaşı) görülmekte. X400.



## Gelişimin 21. Günü

Gebeliğin 21. günündeki sıçan plasentasının önceki günlere göre oldukça büyüdüğü gözlemlendi. Spongiyotrofoblast tabakası küçülmüş, labirent tabakası da daha fazla genişlemiştir (Resim 9a). Spongiyotrofoblast tabakasında glikojen hücreleri yok denecek kadar azdır. Sadece labirent tabakasında sınırlı bir glikojenik hücre kümesi tespit edildi. Maternal desidua ile spongiyotrofoblast tabakası arasında trofoblast dev hücreleri yer almaktaydı (Resim 9b,c). Labirent tabakası çekirdeksiz eritrosit içeren fetal ve maternal kan adacıklarından zengindir. Üzerinde az miktarda pariyetal endoderm hücreleri sıralanan Reichert membranı, labirent tabakasının en dış kısmında görüldü (Resim 9d).



**Resim 9.** Gebeliğin 21. günündeki plasenta kesitine ait H+E boyanmaları. a: Total görünüm. X40. (lab: labirent tabakası, bz: bağlantı zonu, md: maternal desidua) b: Maternal desiduanın (md) hemen altında trofoblastik dev hücreleri (ince ok) görülmekte. Labirent tabakası (lab) içindeki glikojen hücreleri (gh) ve labirent trofoblast hücreleri (eğik ok) gözlenmektedir. Labirent tabakası ile trofoblastik dev hücrelerinin arasında spongiyotrofoblast hücreleri (st) gözükür. X100. c: Büyük büyütmede resim 9b (lab: labirent tabakası; gh: glikojenik hücreler; st: spongiyotrofoblast hücreleri ve ince ok: trofoblastik dev hücreler). X200. d: Labirent tabakasında (lab), çekirdeksiz eritrosit içeren fetal kan adacıkları (yıldız), maternal kan adacıkları (\*), Reichert membranı (çift ok) üzerinde uzanan az sayıda pariyetal endoderm hücreleri (okbaşı) ve allantojik mezensimal doku (amd) ile çevrili allantojik fetal kan damarlarının etrafını çevreleyen visseral endoderm hücreleri (kalın ok). X400.



## İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

### PCNA İmmünoboyanması

PCNA immünoboyanmaları hücrelerin nükleuslarında gerçekleşti.

Tüm gruplara ait plasenta dokularında PCNA immünoboyanma yoğunluklarının dağılımı semi-kantitatif olarak değerlendirildi ve Tablo 1 ve 2’te gösterildi.

**Tablo 1. Gebeliğin 7, 9 ve 11. günlerindeki sıçan uterusunda PCNA immunoboyanmasının hücresel dağılımı**

| Gebelik günleri | Desidual alana ait hücreler | Desidual alan dışında kalan hücreler |
|-----------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 7               | ++++                        | ±                                    |
| 9               | +++                         | ±                                    |
| 11              | ++                          | ±                                    |

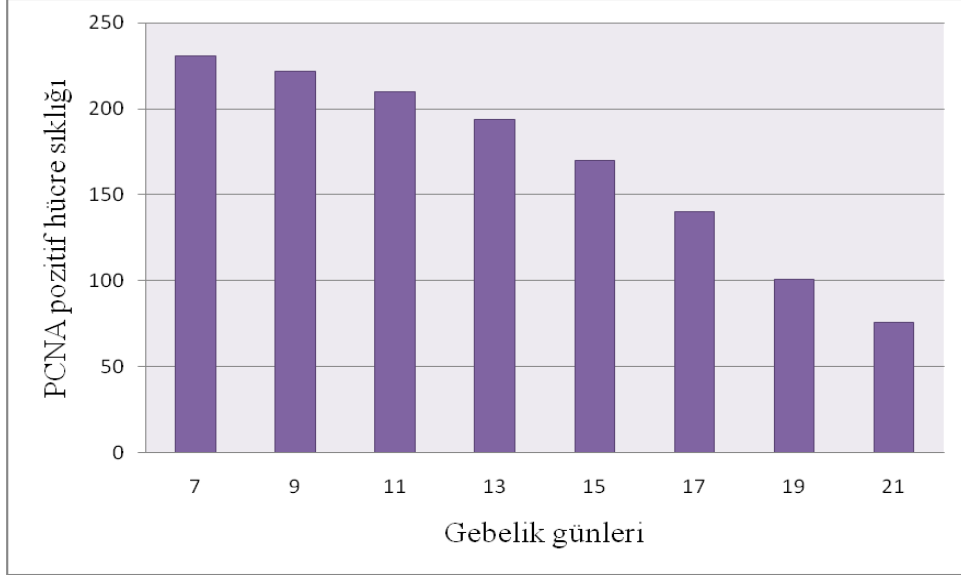
-: Negatif, ±: Çok zayıf pozitif, +: Zayıf pozitif, ++: Pozitif, +++: Kuvvetli pozitif, ++++: Çok kuvvetli pozitif.

**Tablo 2. Gebeliğin 13, 15, 17, 19 ve 21. günlerindeki sıçan plasentalarında PCNA immunoboyanmasının hücresel dağılımı**

| Gebelik günleri | VEH  | PEH  | AMD  | LT   | ST   | GH | DH   |
|-----------------|------|------|------|------|------|----|------|
| 13              | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | X  | ++++ |
| 15              | +++  | +++  | +++  | +++  | ++++ | +  | ++++ |
| 17              | ++   | ++   | +++  | +++  | +++  | ±  | +++  |
| 19              | ++   | +    | ++   | ++   | +++  | -  | ++   |
| 21              | +    | ±    | +    | +    | ++   | -  | +    |

(VEH: visseral endoderm hücresi, PEH: pariyetal endoderm hücresi, AMD: allantoyik mezenşimal doku, LT: labirent trofoblast, ST: spongiyotrofoblast, GH: glikojenik hücre, DH: dev hücre), -: Negatif, ±: Çok zayıf pozitif, +: Zayıf pozitif, ++: Pozitif, +++: Kuvvetli pozitif, ++++: Çok kuvvetli pozitif X: Bölge mevcut değil.

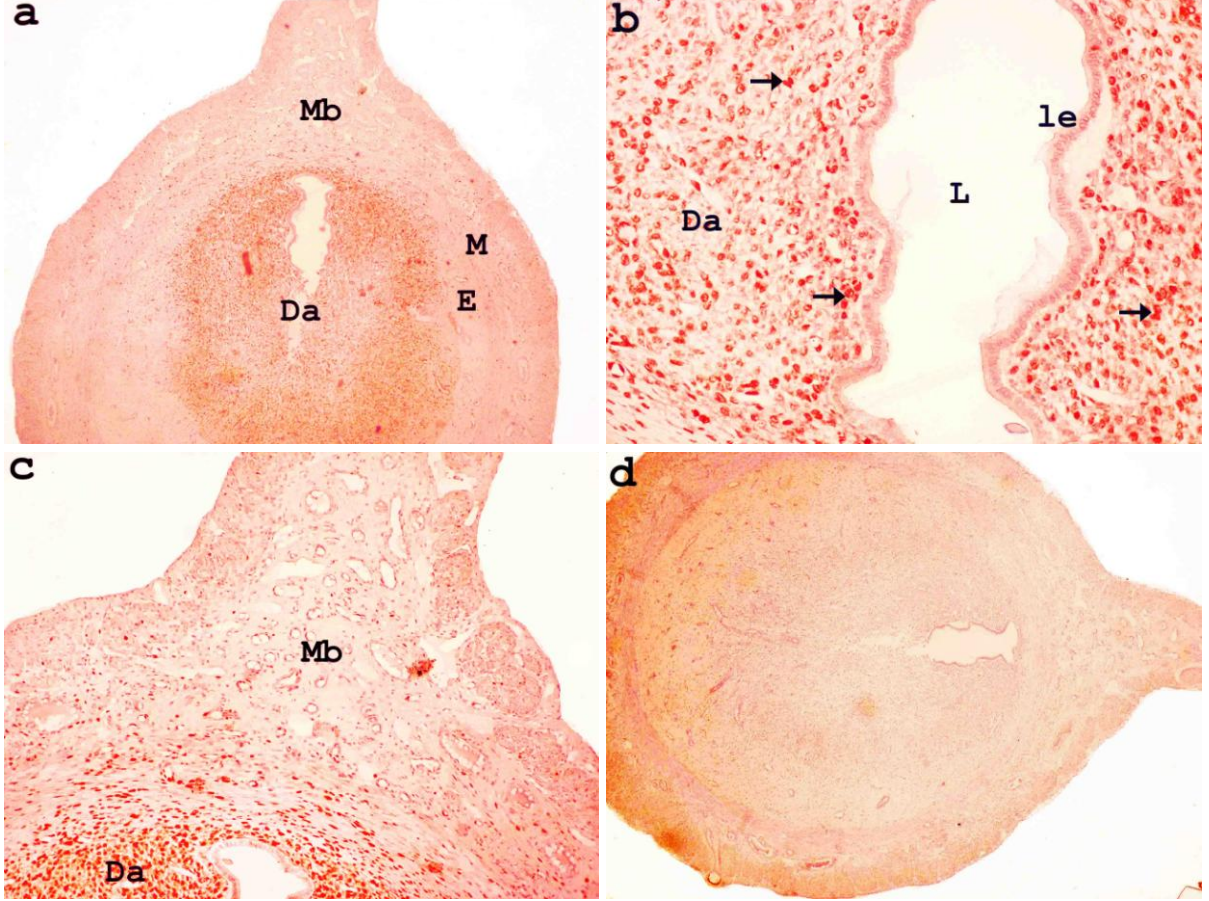
PCNA immünoboyanma pozitif hücre sıklığı HSCORE analizine göre değerlendirildiğinde sıçan plasentalarında gebelik yaşına paralellik gösteren bir azalma görüldü.



**Şekil 15. Gebeliğin 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 ve 21. günlerindeki PCNA pozitif hücre sıklığı**

## Gelişimin 7. Günü

Gebeliğin 7. gününde, uterus lümeninin etrafındaki desidual alandaki hücrelerde çok kuvvetli PCNA pozitivitesi vardı (Resim 10a,b). Ancak desidual alan dışında kalan hücrelerin çok az kısmında çok zayıf PCNA pozitivitesi görülmekteydi (Resim 10c) (Tablo 1).

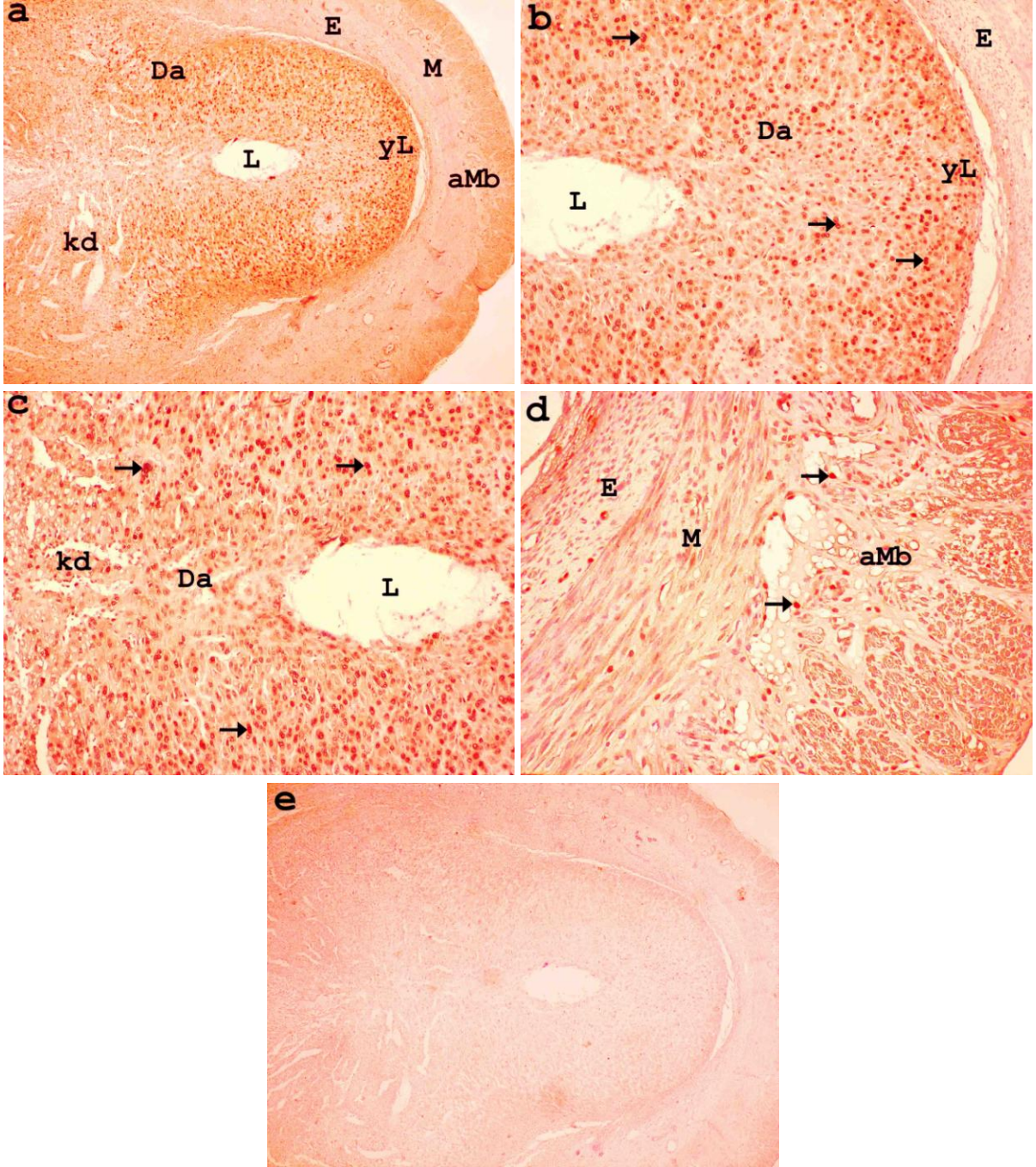


**Resim 10.** Gebeliğin 7. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait PCNA immünboyanması. a: Total görünümde desidual alandaki PCNA pozitif hücre yoğunluğu görülmekte. X40. b: Daha büyük büyütmede desidual alandaki hücrelerin PCNA pozitif boyandığı gözlenirken uterus lümen epiteli PCNA ile boyanmamıştı. X200. c: Desidual alan içerisindeki hücrelerin çok kuvvetli PCNA pozitifliğine karşın desidual alanın dışında kalan az sayıda hücrede ise çok zayıf bir pozitivite görülmektedir. X200. d: Negatif kontrol kesiti. X40. (E: Endometriyum, M: Miyometriyum, Mb: Mezometriyal bölge, Da: Desidual alan, L: Lümen, le: Lümen epiteli, Ok: PCNA pozitif hücreler) İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması.

### **Gelişimin 9. Günü**

Gebeliğin 9. gününde, desidual alandaki hücrelerde 7. güne göre PCNA pozitivitesinde azalma gözlemlendi. (Resim 11a). Yeni oluşan lümen ve kan damarları etrafındaki hücreler de kuvvetli bir şekilde PCNA pozitif boyanmışlardı (Resim 11b,c). Desidual alan dışında kalan hücrelerin ise çok azında çok zayıf PCNA pozitivitesi tesbit edildi (Resim 11d) (Tablo 1).



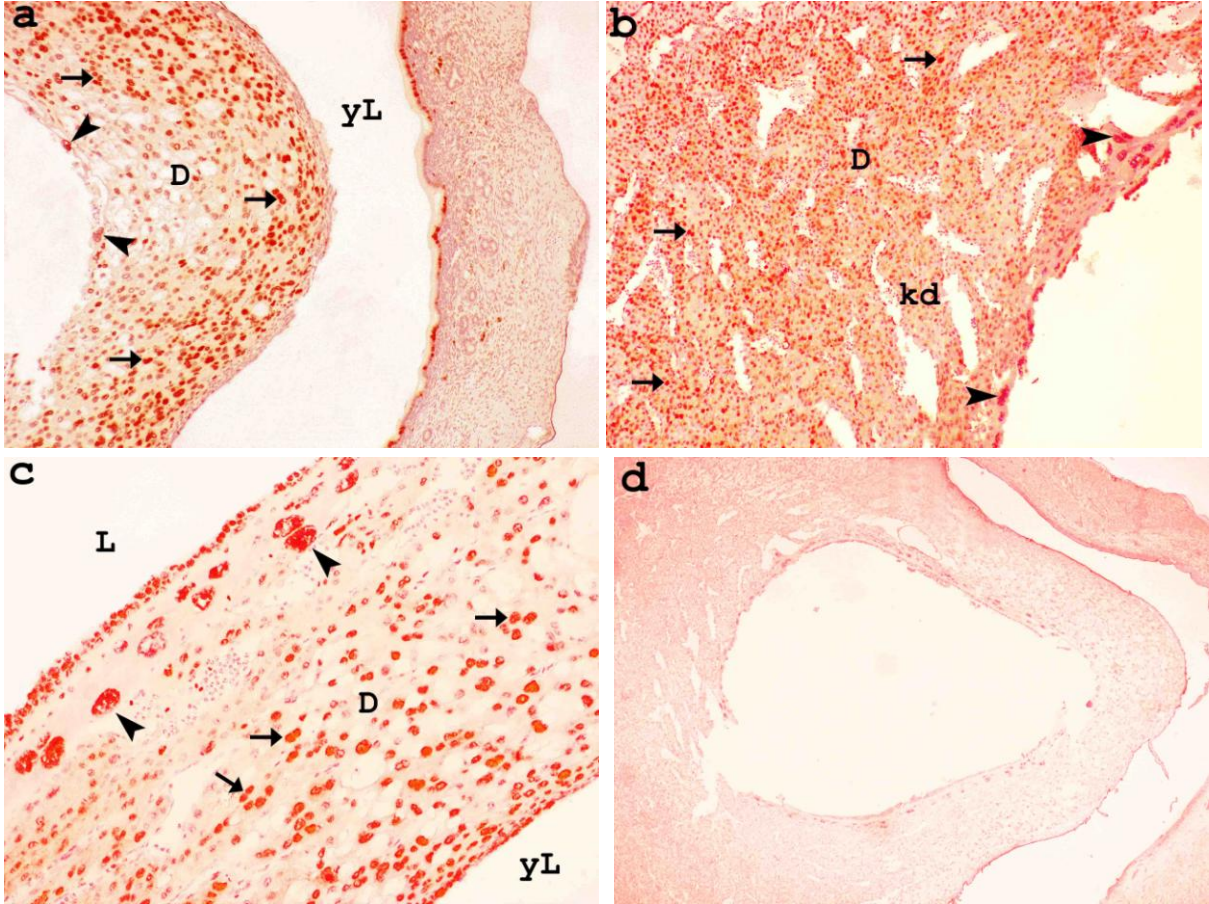


**Resim 11.** Gebeliğin 9. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait PCNA immünboyanması. a: Total görünümde desidual alandaki PCNA pozitif hücre yoğunluğu görülmekte. X40. b: Daha büyük büyütmede lümen ve yeniden oluşan lümen etrafındaki alanda PCNA pozitif hücreler görülmekte. X200. c: Daha büyük büyütmede kan damarları etrafındaki alanda PCNA pozitif hücreler görülmekte. X200. d: Desidual alan dışında kalan hücrelerde çok az sayıda PCNA pozitif hücre görülmekte. X200. e: Negatif kontrol kesiti. X40. (E: Endometriyum, M: Miyometriyum, Mb: Mezometriyal bölge, aMb: Antimezometriyal bölge, Da: Desidual alan, L: Lümen, yL: Yeniden oluşan lümen, kd: Kan damarları, Ok: PCNA pozitif hücreler) İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması.



## Gelişimin 11. Günü

Gebeliğin 11. gününde, desidual alanlardaki PCNA pozitif boyanan hücrelerin sayı ve yoğunluğunun gebeliğin 7 ve 9. günlerine göre düşüş gösterdiği görüldü. Lümeni çevreleyen trofoblast dev hücrelerinde kuvvetli boyanma görüldü. Diğer günlerde olduğu gibi uterus dışında kalan bölgelerdeki pozitif hücre sayısı çok azdı (Resim 12a-c) (Tablo 1).

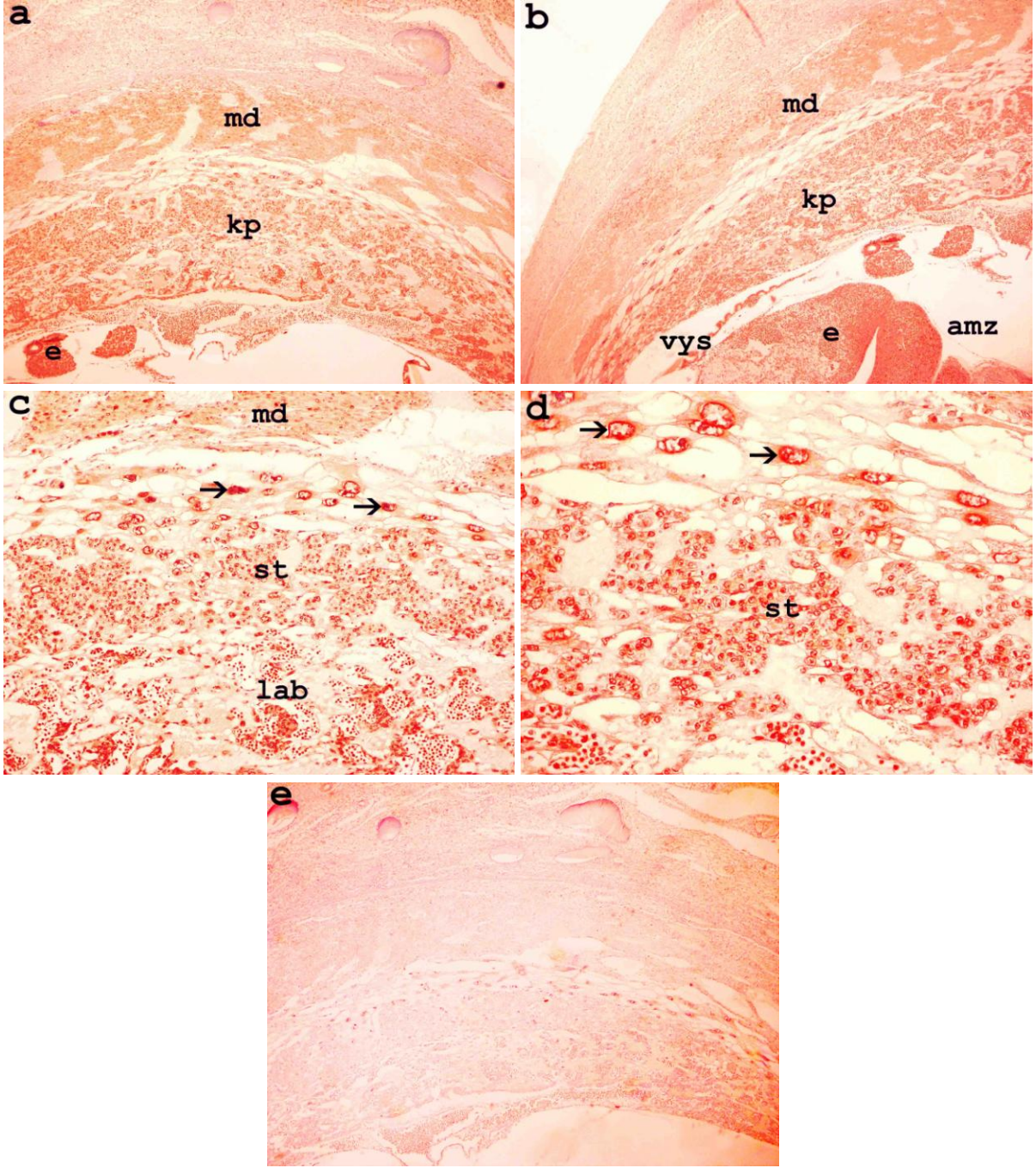


**Resim 12.** Gebeliğin 11. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait PCNA immünboyanması. a: Desidua ve uterus lümenini çevreleyen trofoblast dev hücrelerinde PCNA pozitif boyanma gözlenirken, desidual alan dışında kalan bölgelerde ise çok az sayıda hücrede pozitivite görülmekte. X100. b: Desidual alan, kan damarlarının etrafı ve lümeni çevreleyen trofoblast dev hücrelerindeki yoğun PCNA pozitif boyanma görülmekte. X100. c: Resim 11a'nın büyütülmüş şekli. X200. d: Negatif kontrol kesiti. X40. (E: Endometriyum, M: Miyometriyum, aMb: Antimezometriyal bölge Da: Desidual alan, L: Lümen, yL: Yeniden oluşan lümen, kd: Kan damarları, İnce ok: PCNA pozitif desidua hücreleri, Kalın ok: PCNA pozitif trofoblast dev hücreleri) İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması.

### **Gelişimin 13. Günü**

Gebeliğin 13. gününde, plasentanda bulunan allantoyik mezenşimal doku, pariyetal ve visseral endoderm hücreleri, dev hücreler, labirent trofoblastlar ve spongiyotrofoblastlarda çok kuvvetli PCNA pozitivitesi gözlemlendi. Aynı zamanda maternal desiduada da PCNA pozitif boyanan hücre sayısının fazla olmasına karşılık bu alan dışındaki hücrelerde kayda değer bir pozitivite görülmedi. Lümen içersindeki embriyoda çok yoğun bir boyanma gözlenirken onu saran amniyon zarında ise boyanma gözlenmedi. Ancak amniyon zarının dışında bulunan visseral yolk salk ve bu membranın üstündeki visseral endoderm hücrelerinde çok kuvvetli bir pozitivite görüldü (Resim 13a,b). Dev trofoblast hücrelerinde, spongiyotrofoblastlarda ve labirent tabakasındaki hücrelerde çok kuvvetli bir pozitivite tesbit edildi (Resim 13c,d) (Tablo 2).



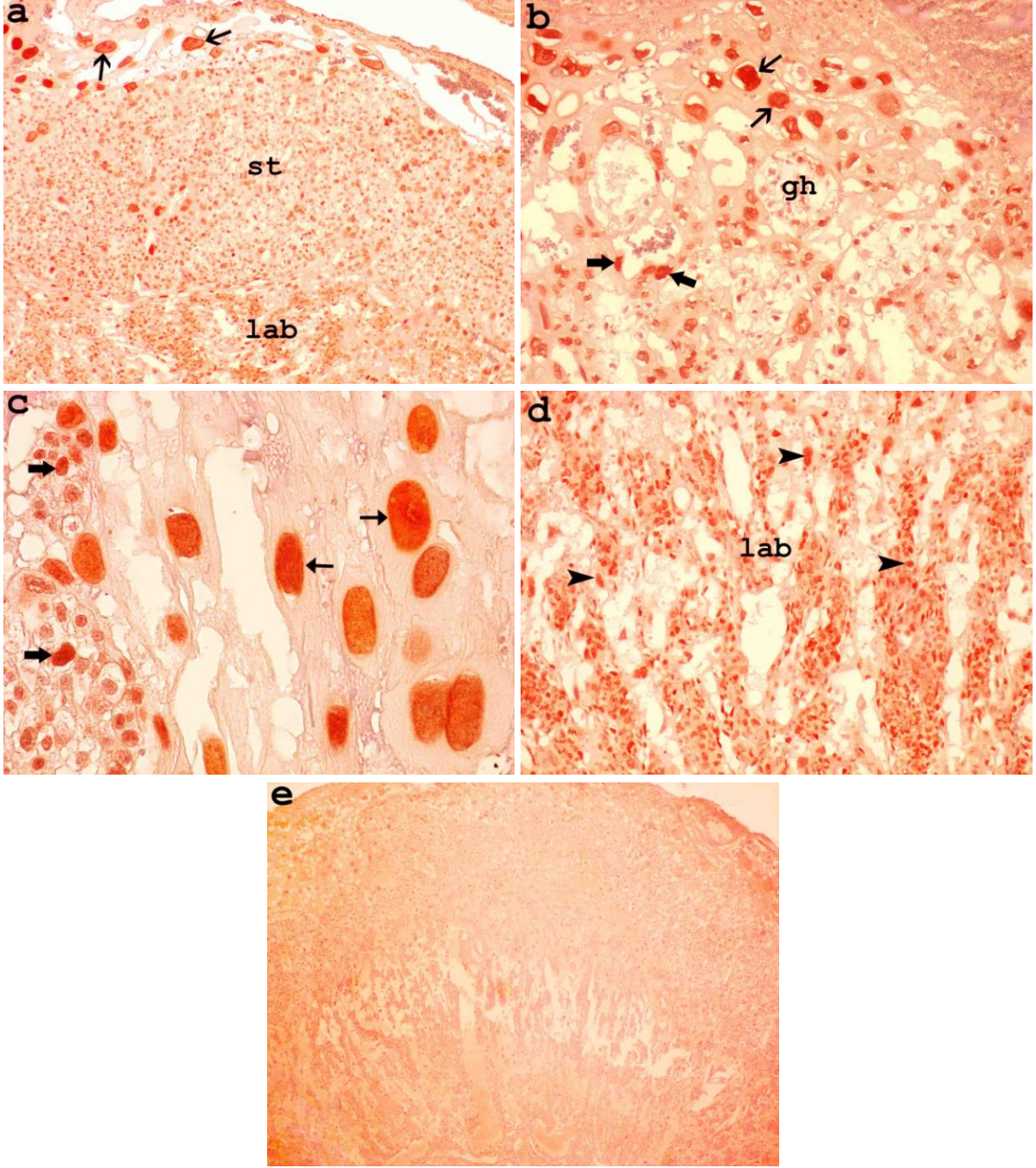


**Resim 13.** Gebeliğin 13. günündeki plasenta kesitine ait PCNA immünboyanması. a: Genel görünüm. X40. b: Genel görünümde embriyo, amniyon zarı ve visseral yolk salk. X40. c: Çok kuvvetli pozitif boyanan labirent trofoblastları, spongiyotrofoblastlar, dev hücreler ve maternal desidua. X100. d: Daha büyük büyütme ile dev hücreler ve spongiyotrofoblastlardaki yoğun PCNA pozitif boyanma görülmekte. X200. e: Negatif kontrol kesiti. X40. (md: maternal desidua, kp: koryoallantoyik plasenta, e: embriyo, vys: visseral yolk salk, amz: amniyon zarı, st: spongiyotrofoblastlar, lab: labirent, Ok: PCNA pozitif trofoblast dev hücreleri) İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması.



### **Gelişimin 15. Günü**

Gebeliğin 15. günündeki PCNA immünboyanmasında, spongiyotrofoblastlar ve dev hücrelerde çok kuvvetli pozitivite şiddetini korurken, labirent trofoblastlar, visseral ve pariyetal endoderm hücreleri ve allantoyik mezenşimal dokuda ise kuvvetli pozitivite görüldü. Gebeliğin 15. gününde görülmeyen glikojen hücrelerinde ise zayıf pozitif PCNA immünboyanması gözlemlendi. (Resim 14a-d) (Tablo 2).

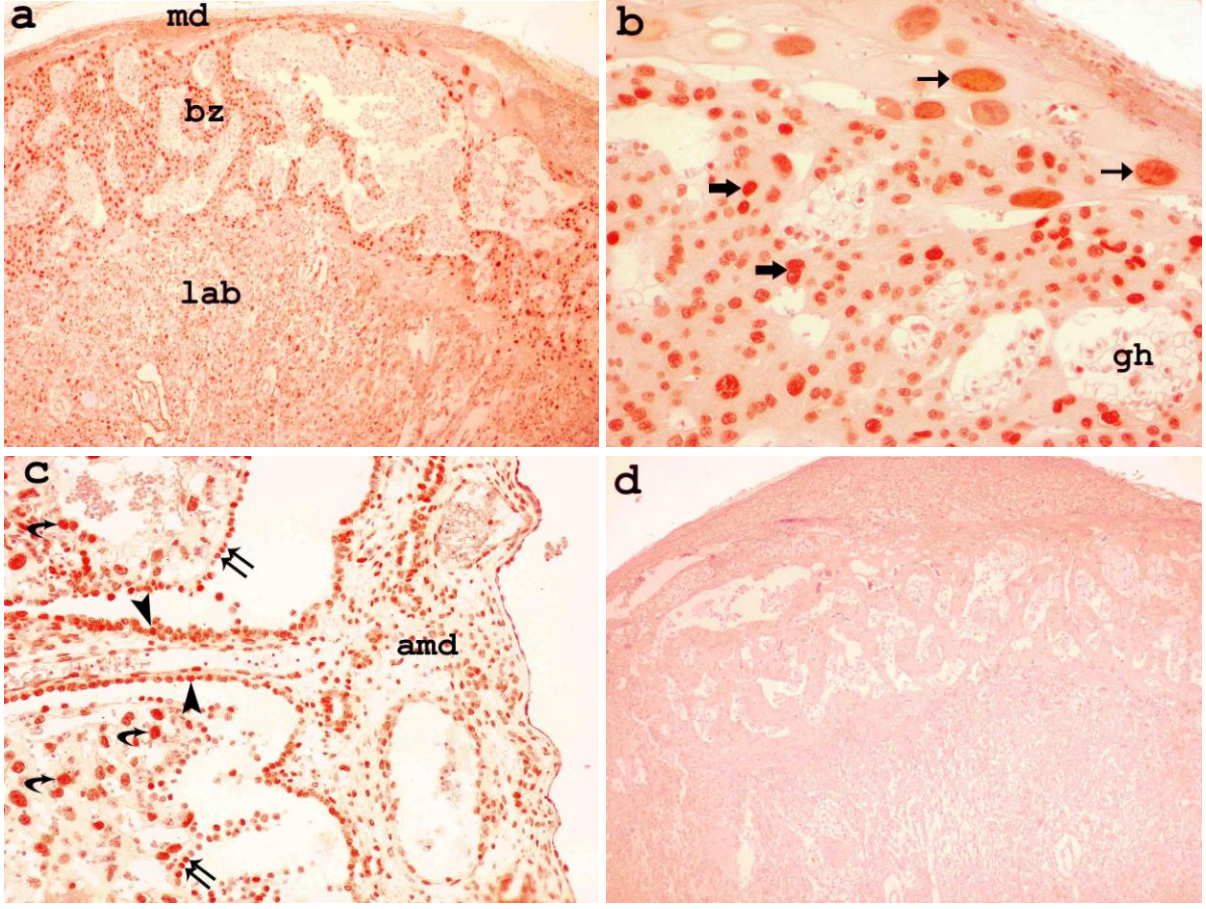


**Resim 14. Gebeliğin 15. günündeki plasenta kesitine ait PCNA immünboyanması. a: Genel görünüm. X40. b: Bağlantı zonundaki PCNA pozitif trofoblastik dev hücreler, spongiyotrofoblastlar ve glikojen hücreleri. X100. c: Daha büyük büyütmede PCNA pozitif trofoblastik dev hücreler ve spongiyotrofoblastlar. X200. d: Labirent tabakasındaki PCNA pozitif boyanan labirent trofoblastlar görülmekte. X100. e: Negatif kontrol kesiti. X40. (st: spongiyotrofoblastlar, lab: labirent, gh: glikojen hücreleri, İnce ok: PCNA pozitif trofoblast dev hücreleri, Kalın ok: PCNA pozitif spongiyotrofoblastlar, Okbaşı: PCNA pozitif labirent trofoblastlar) İmmünoperoksidaz, hematoxilen zıt boyaması.**

### **Gelişimin 17. Günü**

Gebeliğin 17. günündeki sıçan plasentalarındaki PCNA immünboyanması dev hücreler, spongiyotrofoblastlar, labirent trofoblast hücreleri ve allantoyik mezenşimal dokuda kuvvetli pozitivite gösterirken glikojen hücrelerindeki ise çok zayıf pozitivite gözlendi. (Resim 15a,b). Visseral ve pariyetal endoderm hücrelerindeki pozitivite ise 15. güne göre azalma gösterdi. (Resim 15a,c) (Tablo 2).

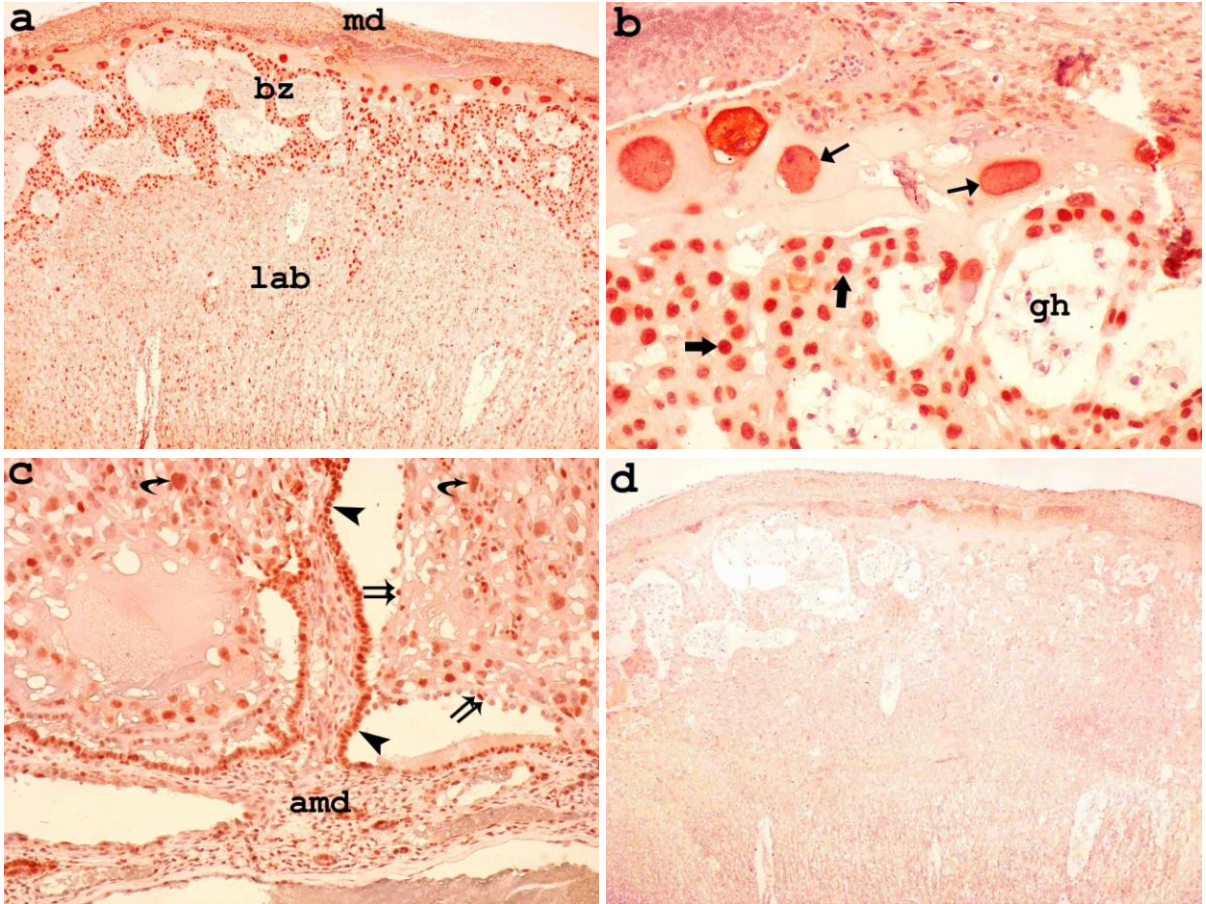




**Resim 15. Gebeliğin 17. günündeki plasenta kesitine ait PCNA immünboyanması. a: Genel görünüm. X40. b: Bağlantı zonundaki PCNA pozitif trofoblastik dev hücreler, spongiyotrofoblastlar ve glikojen hücreleri. X200. c: Allantoyisteki PCNA pozitif visseral endoderm hücreleri ve allantoyik mezenşimal doku ile labirenti dıştan saran PCNA pozitif pariyetal endoderm hücreleri ve PCNA pozitif labirent trofoblastlar. X100. d: Negatif kontrol kesiti. X40. (md: maternal desidua, bz: bağlantı zonu, lab: labirent, gh: glikojen hücreleri, amd: allantoyik mezenşimal doku, İnce ok: PCNA pozitif trofoblast dev hücreleri, Kalın ok: PCNA pozitif spongiyotrofoblastlar, Okbaşı: PCNA pozitif visseral endoderm hücreleri, Çift ok: PCNA pozitif pariyetal endoderm hücreleri, Eğik ok: PCNA pozitif labirent trofoblastlar). İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması.**

### Gelişimin 19. Günü

Gebeliğin 19. günündeki sıçan plasentalarındaki PCNA immünboyanması spongiyotrofoblastlar ve visseral endoderm hücrelerinde şiddetini korurken, parietal endoderm hücreleri, allantoyik mezenşimal doku, labirent trofoblastlar ve dev hücrelerde azalma gösterdi. Glikojen hücrelerinde ise immünoreaktivitenin ortadan kalktığı gözlemlendi (Resim 16a,c) (Tablo 2).

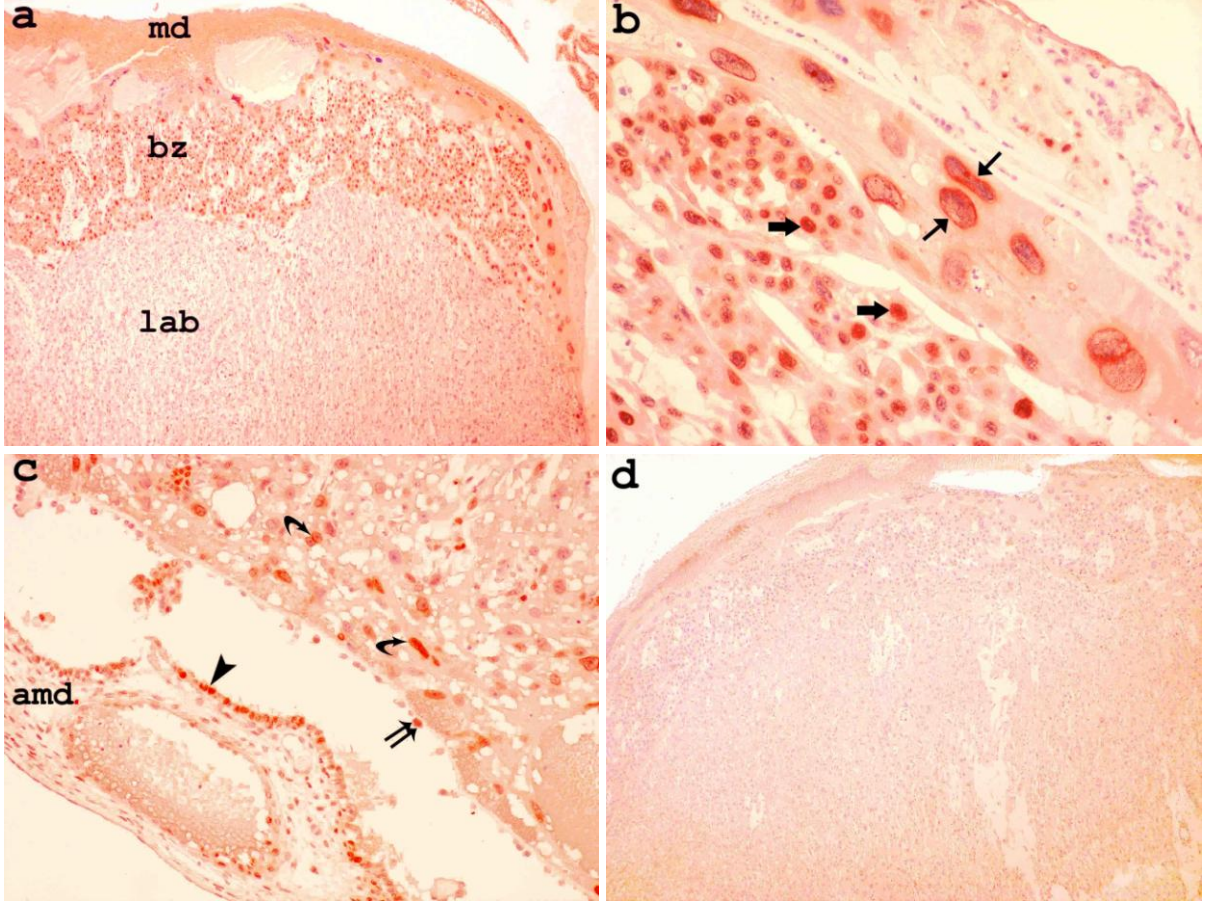


**Resim 16.** Gebeliğin 19. günündeki plasenta kesitine ait PCNA immünboyanması. a: Genel görünüm. X40. b: Bağlantı zonundaki PCNA pozitif trofoblastik dev hücreler, spongiyotrofoblastlar ile PCNA boyanmayan glikojen hücreleri. X200. c: Allantoyisteki PCNA pozitif visseral endoderm hücreleri ve allantoyik mezenşimal doku ile labirenti dıştan saran PCNA pozitif parietal endoderm hücreleri ve PCNA pozitif labirent trofoblastlar. X100. d: Negatif kontrol kesiti. X40. (md: maternal desidua, bz: bağlantı zonu, lab: labirent, gh: glikojen hücreleri, amd: allantoyik mezenşimal doku, İnce ok: PCNA pozitif trofoblast dev hücreleri, Kalın ok: PCNA pozitif spongiyotrofoblastlar, Okbaşı: PCNA pozitif visseral endoderm hücreleri, Çift ok: PCNA pozitif parietal endoderm hücreleri, Eğik ok: PCNA pozitif labirent trofoblastlar) İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması.



## Gelişimin 21. Günü

Gebeliğin 21. gününde plasentadaki bütün hücre tiplerinde PCNA immünboyanmasının şiddetinin azaldığı görüldü. Dev hücreler, labirent trofoblastlar, allantoyik mezenşimal doku ve visseral endoderm hücrelerinde zayıf pozitivite görülürken pariyetal endoderm hücrelerinde çok zayıf pozitivite gözlemlendi. Glikojen hücrelerinde ise 19. güne benzer olarak boyanma gözlenmedi (Resim 17a,c) (Tablo 2).



**Resim 17.** Gebeliğin 21. günündeki plasenta kesitine ait PCNA immünboyanması. a: Genel görünüm. X40. b: Bağlantı zonundaki PCNA pozitif trofoblastik dev hücreler, spongiyotrofoblastlar. X200. c: Allantoyisteki PCNA pozitif visseral endoderm hücreleri ve allantoyik mezenşimal doku ile PCNA pozitif pariyetal endoderm hücreleri ve PCNA pozitif labirent trofoblastlar. X100. d: Negatif kontrol kesiti. X40. (md: maternal desidua, bz: bağlantı zonu, lab: labirent, gh: glikojen hücreleri, amd: allantoyik mezenşimal doku, İnce ok: PCNA pozitif trofoblast dev hücreleri, Kalın ok: PCNA pozitif spongiyotrofoblastlar, Okbaşı: PCNA pozitif visseral endoderm hücreleri, Çift ok: PCNA pozitif pariyetal endoderm hücreleri, Eğik ok: PCNA pozitif labirent trofoblastlar) İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması.

## TUNEL BOYANMASI

Tüm gruplara ait plasenta dokularında TUNEL pozitif hücre sayıları semikantitatif olarak saptandı (Tablo 3, 4).

**Tablo 3. Gebeliğin 7, 9 ve 11. günlerindeki sıçan uterusunda TUNEL pozitif hücrelerin semikantitatif değerlendirmesi**

| Gebelik günleri | Desidual alana ait hücreler | Desidual alan dışında kalan hücreler |
|-----------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 7               | +++                         | +++                                  |
| 9               | ++                          | ++                                   |
| 11              | +                           | +                                    |

**Hücre sayısı: yok (-), nadir ( $\pm$ ), az(+), orta (++) , fazla (+++), çok fazla (++++).**

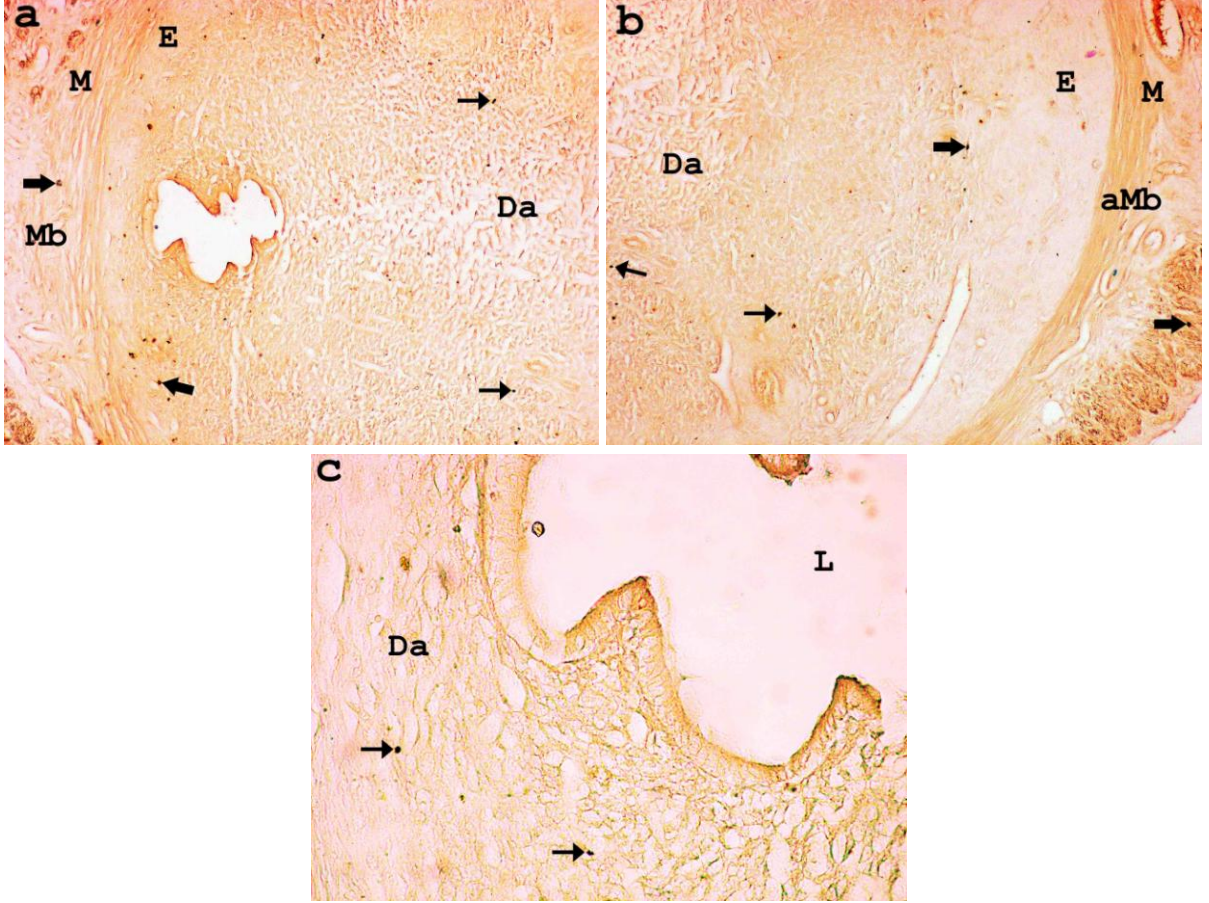
**Tablo 4. Gebeliğin 13, 15, 17, 19 ve 21. günlerindeki sıçan plasentalarında TUNEL pozitif hücrelerin semikantitatif değerlendirmesi**

| Gebelik günleri | TUNEL pozitif hücreler |
|-----------------|------------------------|
| 13              | +                      |
| 15              | $\pm$                  |
| 17              | $\pm$                  |
| 19              | $\pm$                  |
| 21              | $\pm$                  |

**Hücre sayısı: yok (-), nadir ( $\pm$ ), az(+), orta (++) , fazla (+++), çok fazla (++++).**

### Gelişimin 7. Günü

Gebeliğin 7. gününde, desidual alanda ve desidual alan dışında kalan bölgelerde fazla sayıda TUNEL pozitif hücre gözlemlendi (Resim 18) (Tablo 3).

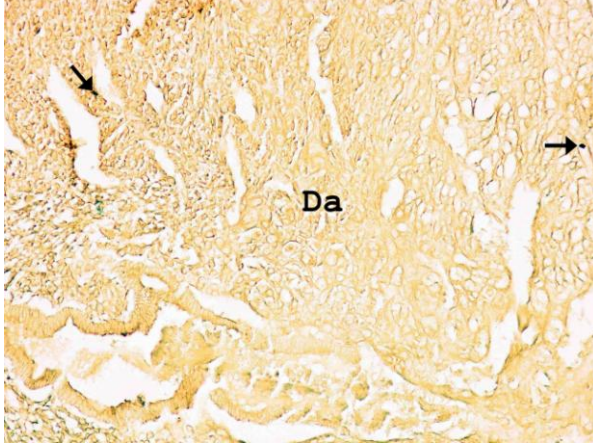


**Resim 18.** Gebeliğin 7. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait TUNEL boyanması. a: Mezometriyal bölgede, desidual alandaki TUNEL pozitif hücreler (ince ok) ile desidual alan dışında kalan bölgedeki TUNEL pozitif hücreler (kalın ok). X100. b: Antimezometriyal bölgede, desidual alandaki TUNEL pozitif hücreler (ince ok) ile desidual alan dışında kalan bölgedeki TUNEL pozitif hücreler (kalın ok). X100. c: Lümen (L) etrafında, desidual alan içerisindeki TUNEL pozitif hücreler (ince ok). X200.



### **Gelişimin 9. Günü**

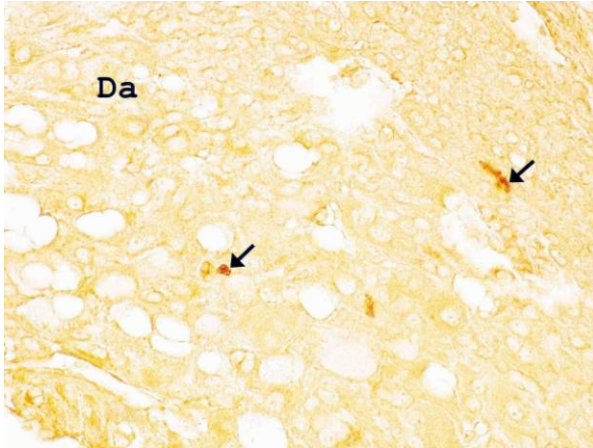
Gebeliğin 9. gününde, desidual alanda ve desidual alan dışında kalan bölgelerde fazla olmayan sayıda TUNEL pozitif hücre gözlemlendi (Resim 19) (Tablo 3).



**Resim 19. Gebeliğin 9. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait TUNEL boyanması. Desidual alandaki TUNEL pozitif hücreler (ok). X200.**

### **Gelişimin 11. Günü**

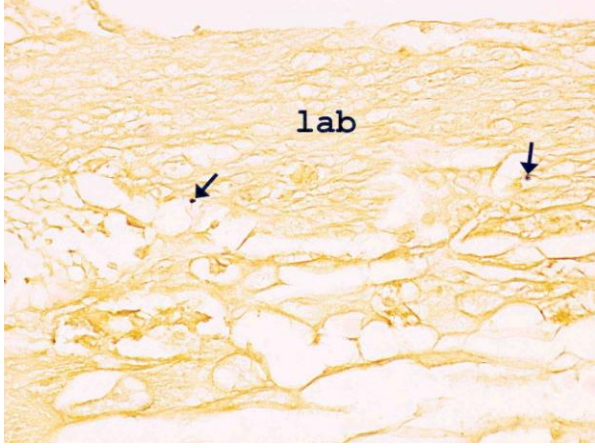
Gebeliğin 7. gününde, desidual alanda ve desidual alan dışında kalan bölgelerde az sayıda TUNEL pozitif hücre gözlemlendi (Resim 20) (Tablo 4).



**Resim 20. Gebeliğin 11. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait TUNEL boyanması. Desidual alandaki TUNEL pozitif hücreler (ok). X200.**

### **Gelişimin 13. Günü**

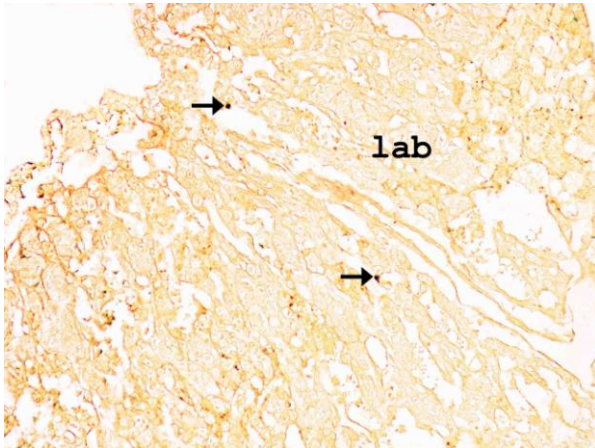
Gebeliğin 13. günündeki sıçan plasentasında az sayıda TUNEL pozitif hücre görüldü (Resim 21) (Tablo 4).



**Resim 21. Gebeliğin 13. günündeki plasenta kesitine ait TUNEL boyanması. Labirent tabakasındaki (lab) TUNEL pozitif hücreler (ok). X100.**

### **Gelişimin 15. Günü**

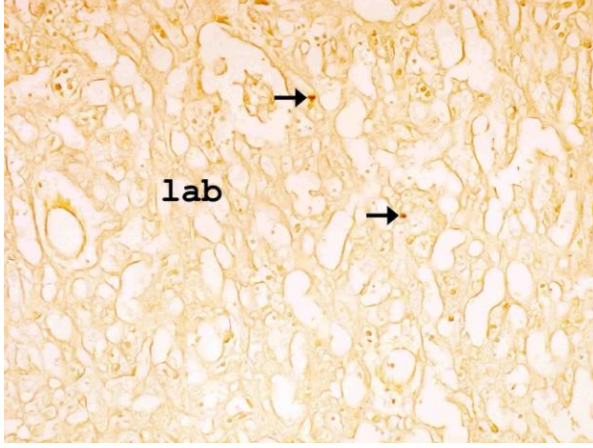
Gebeliğin 15. günündeki sıçan plasentasında nadir sayıda TUNEL pozitif hücre görüldü (Resim 22) (Tablo 4).



**Resim 22. Gebeliğin 15. günündeki plasenta kesitine ait TUNEL boyanması. Labirent tabakasındaki (lab) TUNEL pozitif hücreler (ok). X100.**

### **Gelişimin 17. Günü**

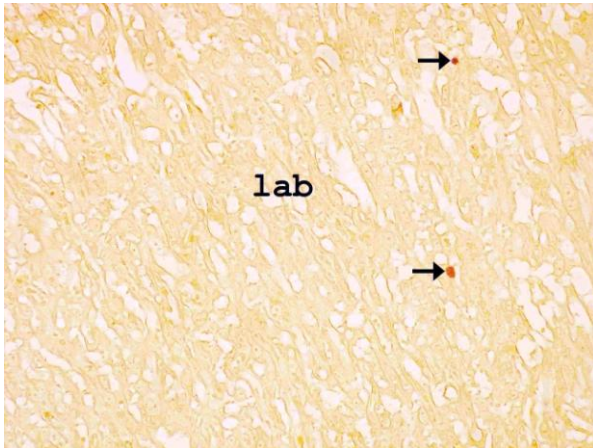
Gebeliğin 17. günündeki sıçan plasentasında nadir sayıda TUNEL pozitif hücre görüldü (Resim 23) (Tablo 4).



**Resim 23. Gebeliğin 17. günündeki plasenta kesitine ait TUNEL boyanması. Labirent tabakasındaki (lab) TUNEL pozitif hücreler (ok). X200.**

### **Gelişimin 19. Günü**

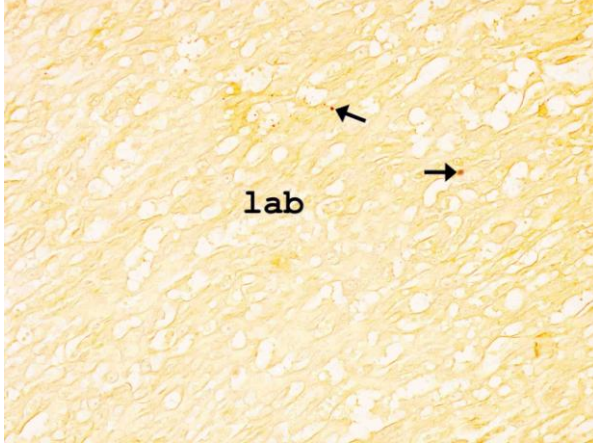
Gebeliğin 19. günündeki sıçan plasentasında nadir sayıda TUNEL pozitif hücre görüldü (Resim 24) (Tablo 4).



**Resim 24. Gebeliğin 19. günündeki plasenta kesitine ait TUNEL boyanması. Labirent tabakasındaki (lab) TUNEL pozitif hücreler (ok). X100.**

### **Gelişimin 21. Günü**

Gebeliğin 21. günündeki sıçan plasentasında nadir sayıda TUNEL pozitif hücre görüldü (Resim 25) (Tablo 4).



**Resim 25. Gebeliğin 21. günündeki plasenta kesitine ait TUNEL boyanması. Labirent tabakasındaki (lab) TUNEL pozitif hücreler (ok). X100.**

## TARTIŞMA

İnsan embriyo ve fôtüs'ünün uterusdaki gelişimini sağlıklı tamamlayabilmesi için anne ve fôtüsa ait genetik ve çevresel etkenlerin eksiksiz bir uyum içinde olmaları gerekir. Anne ile bebek arasındaki ilişkiyi sağlayan, gelişmekte olan fôtüsün tüm gereksinimlerini karşılayacak şekilde düzenlenmiş bir yapı olan plasenta, besin maddeleri, oksijen, elektrolitler, büyüme faktörleri gibi insanın oluşumunda gerekli sayısız maddelerin anne ile fôtüs arasındaki alışverişini ve yapımını düzenler. Fôtüs'ün metabolik artıklarının anne kanına verilerek uzaklaştırılması da yine plasentanın işlevlerindedir. Plasenta bu işlevleri yerine getirerek fôtüs'ün sağlığı için anahtar rol oynar (93).

Plasenta, büyüme hormonları ve büyümeyi düzenleyici hormonlar üreterek fôtal büyümeyi düzenler. Örneğin; insan plasental laktojen hormonu plasentanın sinsityotrofoblast hücreleri tarafından salgılanarak fôtüste insülin benzeri büyüme faktörü üretimini uyarır ve fôtal dokulara besin ulaşımını artırır, böylelikle fôtal büyümeyi düzenler (94).

Maternal ve fôtal yapılarıdaki gebeliğe bağlı düzenlenmeler trofoblast hücrelerinin endokrin fonksiyonu tarafından organize edilir, trofoblast hücreleri farklılaştıkça hormonları, sitokinleri ve büyüme faktörlerini üretme kapasitesi kazanırlar (95,96).

Pek çok türde olduğu gibi sıçanlarda da fôtüs boyutu plasenta boyutuyla orantılıdır. Maternal yanlış beslenmede ya da plasental kan akışındaki bir anormallikten dolayı plasenta boyutu küçük kalırsa fôtüs te küçük kalır. Küçük kalmış ya da fonksiyon bozukluğu gösteren bir plasenta düşük doğum ağırlığı ile ilişkilendirilir (97).

Plasentanın işlevlerini bir arada ya da ayrı ayrı olarak etkileyen fôtal, maternal, çevresel ya da bilinmeyen etkenler fôtal büyümeyi ve yeni doğanın doğum kilosunu etkiler. Beklenen ağırlığının %10 altında kiloya sahip yeni doğanlar uterus içi büyüme geriliği ya da

gebelik yaşına göre küçük bebekler olarak adlandırılır (98). Aynı zamanda plasentanın yetersiz gelişimi uterus içi büyüme geriliği, preeklampsi ve diğer gebelik patolojilerine sebebiyet verir. (99-103).

Sıçanlarda blastosist, gebeliğin 5. gününde uterusun antimezometriyal bölgesine implante olur, olgun plasenta ise mezometriyal bölgeye doğru oluşur ve o bölgede varlığını sürdürür. İmplantasyondan sonra uterustaki stromal hücrelerde desidualizasyon görülür. Uterus stromasında desidualizasyon fibroblastların desidua hücrelerine dönüşmesiyle başlar (49).

Koç ve Kanter (104) yaptıkları bir çalışmada implantasyonun 3. gününe gelen gebeliğin 7. gününde uterus lümeni etrafında oluşan desidual alanı ve bu alan içerisindeki kan damarlarını göstermişlerdir. Gebeliğin ilerleyen günlerinde desidual alanın iyice genişlediği, endometriyumun daraldığı, kan damarlarının sayısının ve genişliklerinin arttığını da saptamışlardır. Ayrıca gebeliğin 9. gününde antimezometriyal bölgede yeni bir lümenin oluştuğu ve 10. günde bu lümenin daha da genişlediğini göstermişlerdir. Yine yapılan başka çalışmalarda (105-107) gebeliğin 7-11. günleri arasında uterus lümeni etrafında oluşan desidual alan, kan damarları ve yeniden oluşan lümen gösterilmiştir.

Welsh ve Enders (108), desidualizasyonun gebeliğin 6. gününde antimezometriyal bölgede lümen epiteline komşu küçük bir alanda sınırlı kaldığını ifade ederlerken, Kramer (109) hormonların etkisi altında gelişen sıçan endometriyumunda desidual hücrelerin ilk olarak gebeliğin 4.ve 5. gününden itibaren görüldüğünü, 4.5-6.5. günlerde de stromal dokuda desidual reaksiyonun yaygınlaştığını bildirmiştir. Ayrıca yeni lümenin gebeliğin 12. gününde oluşmaya başladığını da rapor etmişlerdir. Kayışlı ve ark. (107) ise yeni lümenin 8. günün sonunda oluşmaya başladığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda gebeliğin 7, 9 ve 11. günlerinde desidual alan ve bu alan içindeki kan damarları tesbit edildi. Bu desidual alanın gebeliğin ilerlemesiyle birlikte ışmsal bir şekilde büyüme gösterdiğini gözlemledik. Yine kan damarlarının sayısı ve genişliğinin gebelik yaşıyla birlikte arttığını tesbit ettik. Ayrıca 9. günde oluşan yeni lümenin 11. günde daha da büyüdüğü gözlemlendi.

Daha önce yapılan çalışmalarda (110,111) gebeliğin 13. günündeki sıçan plasentasının, labirent tabakası, bağlantı zonu ve dev trofoblast tabakası olmak üzere 3 tabakadan oluştuğu rapor edilmiştir. Ayrıca bağlantı zonunda sadece maternal kan adacıkları, labirent tabakasında ise hem fetal hem de maternal kan adacıklarının bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da gebeliğin 13. günündeki sıçan plasentasının labirent tabakası, bağlantı zonu ve dev trofoblast tabakasından oluştuğu gösterilmiştir. Labirent tabakasının çekirdekli



eritrositler içeren fetal kan adacıkları ve çekirdeksiz eritrositler içeren maternal kan adacıkları, bağlantı zonunun ise çekirdeksiz eritrosit içeren maternal kan adacıkları içerdiğini tesbit ettik.

Witlin ve ark. (112) yaptıkları çalışmada sıçan plasentasında 15 ve 17. günde maternal desiduanın altında bulunan trofoblast dev hücreleri ve bağlantı zonu ile plasentanın içteki tabakası olan labirent tabakasını göstermişlerdir. Acar (110) 17. günde plasentanın en geniş bölgesinin labirent tabakası olduğunu, fetal damarlarda yer alan fetal eritrositlerin bir kısmının çekirdeklerini kaybettiğini ve labirentin en dışının Reichert membranı ile döşeli olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada da gebeliğin 15 ve 17. günlerinde literatürle uyumlu olarak plasental tabakalar tesbit edildi. Gebeliğin 15. gününde, 13. güne göre plasentanın oldukça geliştiği, labirent tabakasının bağlantı zonu ile aynı büyüklüğe ulaştığı ve labirent tabakasının en dışında Reichert membranı ve bu membranın üzerinde pariyetal endoderm hücreleri olduğu gösterildi. Gebeliğin 17. gününde ise plasentanın en geniş bölgesini labirent tabakasının oluşturduğunu gözlemledik.

Daha önce yapılan bir çalışmada (113) gebeliğin son günleri olan 19, 20 ve 21. günlerde bağlantı zonunun oldukça küçüldüğü, plasentanın neredeyse tamamını labirent tabakasının oluşturduğu ve labirent tabakasındaki fetal damarlara ait eritrositlerin çekirdeklerini kaybettikleri rapor edilmiştir. Çalışmamızda da literatüre uygun olarak gebeliğin son günlerinde labirent tabakasının plasentanın büyük bir kısmını oluşturduğu ve labirent tabakasındaki fetal damarlara ait eritrositlerin çekirdeklerini kaybettikleri tesbit edildi.

Plasentadaki glikojenik hücre varlığı Özmen (103) tarafından ilk olarak gebeliğin 14. gününde tesbit edilmiş ve gebelik ilerledikçe de glikojen hücre sayısında azalma olduğu rapor edilmiştir. Yapılan başka çalışmalarda da (61,110,114) gebeliğin ilerlemesiyle glikojen hücre sayısının azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada ise ilk olarak glikojenik hücre varlığı gebeliğin 15. gününde tesbit edilmiştir. Ancak önceki çalışmalarla farklı olarak glikojenik hücreler en yoğun olarak 17. günde görülmüştür. 17. günden sonra ise sayılarında düzenli bir azalmanın olduğu gösterilmiştir.

PCNA çekirdek içi bir antijendir ve DNA polimeraz gamma'nın alt birimi olarak hücre döngüsünde rol oynar (86). Geç G1 evresinde, DNA replikasyonundan hemen önce, bu proteinin miktarında artış gözlenir. Artış S evresine kadar sürer. G2 ve M evresinde ise PCNA miktarı düşer. PCNA bu özellikleri nedeniyle bir proliferasyon belirleyicisi olarak kullanılır. G1 evresinden S evresine geçen hücrelerde PCNA ekspresyonu çekirdekte belirlenerek bir hücrenin mitotik erki izlenebilir (115).

PCNA'nın insan plasentasında erken gebelik döneminde en fazla, orta gebelik döneminde daha az ve termde de en az düzeyde eksprese edildiği bildirilmiştir (116). Kanashiro ve ark., (117) kemiricilerin en irisi olan kapibara'da yaptıkları bir çalışmada plasentanın labirent bölgesinde ve allantoyik mezodermdaki PCNA dağılımını göstermişlerdir.

Yoshie ve ark. (118) sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada, gebeliğin 7 ve 9. günlerinde uterusun desidual bölgesinde geniş bir PCNA pozitif hücre dağılımı tesbit etmişlerdir. Yine Correia-da-Silva ve ark. (119) yaptıkları bir çalışmada, sıçanlarda desidualizasyon boyunca implantasyon bölgesinde yoğun bir PCNA aktivitesi olduğunu belirtmişlerdir. Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada da gebeliğin 8 ve 10. günlerinde desidual alanda PCNA pozitivitesi belirtilirken uterus lümen epitelinde ise PCNA pozitivitesi gözlenmediği rapor edilmiştir. Gebeliğin ilerleyen günlerindeki PCNA pozitivitesine ilişkin yapılan bir çalışmada (120), plasentada gebeliğin 11 ve 13. günündeki yoğun PCNA pozitivitesinin 17 ve 21. günlerde azaldığı rapor edilmiştir.

Çalışmamızda desidual alan ve plasentada bulunan allantoyik mezenşimal doku, pariyetal ve visseral endoderm hücreleri, dev hücreler, labirent trofoblastlar ve glikojenik hücrelerdeki PCNA immunboyanma yoğunluklarının gebelik yaşına paralel olarak azalma gösterdiği görüldü. Çalışmamızda ayrıca PCNA immunopozitif hücre sayısı da bu yoğunluğa paralel olarak gebeliğin 7. gününden 21. gününe kadar bir düşüş gösterdi. Tüm bu bulgularımız, plasentanın terme yaklaştıkça proliferatif özelliğinin azaldığı bilgisini desteklemektedir (116).

Apoptozis; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Bazı hücreler yıllarca yaşarken bir kısmı sadece birkaç saat yaşarlar. Deri, gastrointestinal sistem ve immün sistem gibi pek çok dokuda devamlılık apoptozis ve hücre yenilenmesine bağlıdır (76).

Fizyolojik bir işlem olarak apoptoz, normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybindan sorumludur. Apoptotik hücre sayısı kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirlediğinden, apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur (121). Bu da demektir ki; apoptoz oranının azalması ile hücre sayısı artar aksine eğer apoptoz oranı artarsa hücre sayısı azalır ve istenmeyen doku tahribatı meydana gelir. Günümüzde insanı da içeren memeliler



grubunda üretkenliğin dengelenmesinde apoptozun önemli rol oynadığına dair önemli kanıtlar vardır (122). Ayrıca birçok hastalığın genetiğinde de bu değişimler söz konusudur (123).

İnsanda ilk ve son trimester normal gebeliklerden alınan plasenta örneklerinde tüm hücre tiplerinde apoptozis gösterilmiş ve apoptotik hücrelerin büyük kısmının (>%50) trofoblastlara ait olduğu ortaya konulmuştur. Yine ilk trimester plasenta örnekleri ile kıyaslandığında son trimester örneklerinde apoptozis insidansının anlamlı oranda arttığı farkedilmektedir. Gebelik ilerledikçe gözlenen artmış apoptozisin doku yaşlanmasının doğal bir sonucu olduğu ve yaşlanan dokuların apoptotik uyarılara daha hassas oldukları şeklinde bir görüş belirmiştir (82). Gebelik haftası ilerledikçe plasental yaşlanma ile birlikte artan apoptozisin plasentanın yeniden yapılanması için bir mekanizma sağladığı, sitotrofoblastlarda gözlenen apoptozis alanlarının plasentada transportu daha kolay hale getirdiği ve aynı zamanda 9/1 olan sinsitsiyotrofoblast/sitotrofoblast oranını koruduğu iddia edilmektedir (80).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada (124) gebeliğin 5,5. gününde endometriyal stromal hücrelerde apoptotik hücre varlığı tesbit edilmiştir. Yine sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada (113) gebeliğin 20. gününde plasentanın fetal ve maternal kısmında TUNEL pozitif hücreler sayılmıştır. Maternal kısımdaki apoptozise uğrayan hücre sayısının fetal kısımdan daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Perez ve ark. (125) yaptıkları çalışmada sıçanlarda gebeliğin 14. günündeki normal plasentada apoptotik hücrelerin görülmediği bildirilmiştir. Başka bir çalışmada (126) ise gebeliğin 18. günündeki sıçan plasentasında apoptotik hücrelerin çok nadir bulunduğu bildirilmektedir. Sıçan plasentasında yapılan başka çalışmalarda da apoptotik hücre sayısının dışarıdan yapılan bir uygulama sonucu ya da plasenta ve embriyonun sağlığını etkileyen olaylar sonucunda arttığı rapor edilmiştir (127-130).

Bizim çalışmamızda gebeliğin ilk günlerinde yüksek olan apoptozisin desidualizasyon ve plasental gelişimde önemli rol oynadığını düşünmekteyiz. Literatürle uyumlu olarak gebeliğin sonlarında doğru plasentada nadir sayıda TUNEL pozitif hücre tesbit ettik. Plasentanın şekillenmesi ile birlikte apoptozisin de azaldığı kanaatindeyiz.

## SONUÇLAR

Bu çalışmada, sıçanlarda gebeliğin 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 ve 21. günlerinde plasentanın gelişimi morfolojik olarak incelendi ve bu günlerdeki sıçan plasentasında trofoblast proliferasyonu ve differensiyasyonunda mitotik ve apoptotik aktivite immünohistokimyasal ve TUNEL teknikleriyle gösterildi.

Gebeliğin 7, 9 ve 11. günlerindeki desidualizasyon sonrasında gebeliğin 13. gününde plasentanın olgun yapısına ulaştığını tespit ettik. 13. günden sonra da plasentanın devamlı bir büyüme içerisinde olduğunu saptadık.

Sıçan plasentasında gebelik yaşı ilerledikçe PCNA immünoboyanması yoğunluğu ve PCNA pozitif hücre sıklığının azalma gösterdiği tespit edildi. Gebeliğin ilk günlerinde yüksek olan apoptozisin ise plasentanın şekillenmesi ile azaldığını gözlemledik.

Sonuç olarak çalışmamız; gebelik süresince plasentanın gelişimini morfolojik olarak ortaya koymuştur. Çalışmamızdan elde edilen verilerin literatüre kazandırılmasının sonraki yapılacak çalışmalara da katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

## ÖZET

Plasenta, gebelik süresince embriyo gelişimini sağlayan, içinde gelişmekte olan embriyoyu koruyan ve uterus ile embriyo arasındaki metabolizma olaylarının gerçekleşmesi için gerekli bağlantıyı sağlayan bir organdır. 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. Embriyonun sağlıklı gelişmesi, doğru ve tam plasental gelişim ile doğrudan ilişkilidir. Nitekim erken embriyonik ölümlerin en büyük nedenlerinden birisi de anormal plasental gelişimlerdir.

Bu çalışmada, sıçanlarda gebeliğin farklı günlerinde plasentanın gelişiminin morfolojik olarak incelenmesi ile birlikte trofoblast proliferasyonu ve differensiyasyonunda mitotik ve apoptotik aktivitenin immünohistokimyasal ve TUNEL teknikleriyle gösterilmesi amaçlandı.

Çalışmada gebe dişilerin, plasental gelişimin gerçekleştiği gebeliğin 7, 9, 11 ve 13. günlerinde anestezi altında plasenta, uterus ve embriyoları birlikte, 15, 17, 19 ve 21. günlerde ise embriyo ve plasentaları ayrı ayrı alındı ve alınan plasentalar mikroskopik incelemeler için işlemlendirildi.

Gebeliğin 7, 9 ve 11. günlerinde, uterustaki endometriyal stromal hücrelerin farklılaşması ile oluşan desidual yapı izlendi. Plasentanın olgun yapısına, artan trofoblast proliferasyonu ve differensiyasyonu ile birlikte gebeliğin 13. gününde ulaştığı ve bu günden sonra da devamlı bir büyüme içerisinde olduğu görüldü. Prolifere hücre nükleer antijen immünoboyanması yoğunluğu ve proliferasyonlu hücre nükleer antijen pozitif hücre sıklığının

gebelik yaşına paralel olarak azalma gösterdiği, gebeliğin erken dönemlerinde fazla olan apoptotik hücre sayısının ise olgun plasentanın oluşması ile azaldığı görüldü.

Sonuç olarak; sıçan plasentasında gebeliğin erken günlerinde artan proliferasyon ve apoptozis ile birlikte gebeliğin 13. gününde plasentanın olgun yapısına ulaştığı; gebelik yaşının artmasına paralel plasentadaki proliferasyon ve apoptozisin azaldığı görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Plasental gelişim, apoptozis, PCNA, sıçan.

# **MORPHOLOGICAL EXAMINATION OF PLACENTAL DEVELOPMENT IN RATS**

## **SUMMARY**

Placenta is an organ that has a vital part in the development of the embryo, which is protected by the placenta itself, apart from meeting the need for the activation of the metabolism procedures between the uterus and embryo. Peculiar to mammals only, the placenta, effectively protects the embryo developing in the uterus, as well as providing such protective substances as anticorps and nourishment from the mother that are essential to the development of the embryo. A healthy development of the embryo is very closely related to a proper placental development, because an abnormal placenta could play a chief role in early embryonic deaths, which is not an uncommon case across the world.

The present study aims to show apoptotic and mitotic activities in differentiation and proliferation of the trophoblast through the techniques of immunohistochemical and TUNEL, apart from achieving a morphological examination of the development in the placenta of rats on varying days.

The placenta, uterus and the embryo were altogether removed from the pregnant rats that were anesthetized during the placental development on the 7th, 9th, 11th and 13th days of pregnancy in Group 1, while the embryo and placenta were removed separately on the 15th, 17th, 19th and 21st days of pregnancy in Group 2. The samples cultivated from these rats were processed for purposes of microscobic analysis.

The decidual structure resulting from the differentiation of the endometrial stromal cells in the uterus on the 7th, 9th and 11th days of the pregnancy has been determined. Our observation was that the placenta with an increasing trophoblast proliferation and differentiation matures on the 13th day of the pregnancy, after which time the growth seems to be permanent. Density of proliferating cell nuclear antigen positive cells and proliferating cell nuclear antigen immunostaining was observed to decrease in parallel with the age of pregnancy. The excessive amount of apoptotic cells that comes out during the early periods of pregnancy tends to diminish as the placenta matures.

As a result, we speculate that the placenta matures enough on the 13th day of pregnancy considering apoptosis and the rise in proliferation in the placenta of the rats on the first days of the pregnancy, both of which cases appear to slow down with the increasing age of pregnancy.

**Keywords:** Placental development, apoptosis, PCNA, rat

## KAYNAKLAR

1. Page NM, Kemp CF, Butlin DJ, Lowry PJ. Placental peptides as markers of gestational disease. *Reproduction* 2002;123(4):487-95.
2. Waddell BJ, Hisheh S, Dharmarajan AM, Burton PJ. Apoptosis in rat placenta is zone-dependent and stimulated by glucocorticoids. *Biol Reprod* 2000;63(6):1913-7.
3. Forbes K, Westwood M. The IGF axis and placental function [a mini review]. *Horm Res* 2008;69(3):129-37.
4. Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, Dixon G. Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta* 1981;2(1):71-91.
5. Handwerger S, Freemark M. 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):343-56.
6. Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming [Review]. *J Physiol* 2006;572(Pt 1):25-30.
7. Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from Mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2001;2(7):538-48.
8. Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda)* 2005;20:180-93.
9. Wooding FBP, Filint APF. Placentation. Fourth Edition ed. In *Marshall's Physiology Reproductin*. New York: Chapman and Hall; 1994. p.25-30.
10. Cross J, Baczyk D, Dobric N, Hemberger M, Hughes M, Simmons DG et al. Genes, development and evolution of the placenta. *Placenta* 2003;24(2-3):123-30.
11. Grotta LJ, Ader R. Continuous recording of maternal behaviour in *Rattus norvegicus*. *Animal Behaviour*, 1969;17(4):722-29.



12. Ma GT, Soloveva V, Tzeng SJ, Lowe LA, Pfendler KC, Iannaccone PM et al Nodal regulates trophoblast differentiation and placental development. *Dev Biol* 2001;236(1):124-35.
13. Davies J, Glasser SR. Histological and fine structurel observations on the placenta of the rat. *Acta Anat* 1968;69:542-608.
14. Jollie WP, Craig SS. The fine structure of placental junctional zone cells during prolonged pregnancy in rats. *Acta Anat* 1979;105:386-400.
15. Padykula HA, Richardson D. A correlated histochemical and biochemical study of glycogen storage in the rat placenta. *Am J Anat* 1963;112:215-41.
16. Blandau RJ. Embryo-endometrial interrelationships in the rat and guinea pig. *Anat Rec* 1949;104:331-51.
17. Erdoğan B. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi* 2003;4:165-74.
18. Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 1995;136(6):2770-5.
19. Takahashi T, Caviness VS Jr. PCNA-binding to DNA at the G1/S transition in proliferating cells of the developing cerebral wall. *J Neurocytol* 1993;22(12):1096-102.
20. Danova M, Riccardi A, Giordano M, Girino M, Mazzini G, Dezza L et al. Cell cycle-related proteins: a flow cytofluorometric study in human tumors. *Biol Cell* 1988;64(1):23-8.
21. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 1997;14(6):629-40.
22. Sugden MC, Langdown ML. Possible involvement of PKC isoforms in signalling placental apoptosis in intrauterine growth retardation. *Mol Cell Endocrinol* 2001;185(1-2):119-26.
23. Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG, Guilbert LJ. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gammainterferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 1994;15(8):819-35.
24. Pridjian G. Fetomaternal interactions: placental physiology and its role as a go-between. In: Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG, eds. *Neonatology: Pathophysiology and Management of the Newborn.*, 5th Ed. Philadelphia: Lippincott Co; 1994. p.126-43.
25. Spencer TE, Bazer FW. Trophoblast Biology: Forum Introduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:45.
26. Desoye G, Shafrir E. The human placenta in diabetic pregnancy. *Diabetes Reviews* 1996;4:70-89.

27. Hassa O ve Aşti RN. Embriyoloji. Ankara, 1997. s.77-93.
28. <http://www.embryology.ch/dutch/fplacenta/type01.html> adlı web sayfasından yararlanılmıştır. (Nisan, 2010)
29. Knipp GT, Audus KL, Soares MJ. Nutrient transport across the placenta. *Adv Drug Deliv Rev* 1999;38(1):41-58.
30. Demir R. İnsan gelişimi ve implantasyon biyolojisi. Türkiye, Ankara: Palme Yayıncılık; 1995.
31. Moore KM, Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. 6. İngilizce Baskıdan Çeviri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2002. s: 47-59, 129-164, 230-233.
32. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji 9. İngilizce Baskıdan Çeviri. Ankara: Palme Yayıncılık; 2005.
33. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 2004;14(6):744-54.
34. Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function [Review]. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;5:6.
35. Enders AC. Trophoblast-uterine interactions in the first days of implantation: models for the study of implantation events in the human. *Semin Reprod Med* 2000;18(3):255-63.
36. Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod* 1995;10(6):1579-602.
37. Sharkey AM, Smith SK. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003;17(2):289-307.
38. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001;345(19):1400-8.
39. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, von Wolff M. The human endometrium as a fertility determining factor. *Hum Reprod Update* 2006;12(5):617-30.
40. Hess AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegard M, Nayak N et al. Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol Reprod* 2007;76(1):102-17.
41. Tarrade A, Lai Kuen R, Malassiné A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M et al. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest* 2001;81(9):1199-211.
42. Babawale MO, Mobberley MA, Ryder TA, Elder MG, Sullivan MH. Ultrastructure of the early human fetal-maternal interface co-cultured in vitro. *Hum Reprod* 2002;17(5):1351-7.

43. Chan S, Kachilele S, McCabe CJ, Tannahill LA, Boelaert K, Gittoes NJ et al. Early expression of thyroid hormone deiodinases and receptors in human fetal cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res.* 2002;138(2):109- 16.
44. Anin SA, Vince G, Quenby S. Trophoblast invasion. *Hum Fertil (Camb)* 2004;7(3):169-74
45. Benirschke K, Kaufmann P. *The Pathology of the Human Placenta*, 3rd Ed. New York: Springer-Verlag; 1995.
46. Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erben T, Kotowski A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat* 1989;136:190-203.
47. Kaufmann P, Kingdom J. Development of the placenta and its circulation. In Rodeck CH ve Whittle MJ (eds). *Fetal Medicine Basic Science and Clinical Practice*. London: Churchill and Livingstone; 1999. p 93-110.
48. Carlson B.M. *Human Embryology and Developmental Biology*. Third edition. USA Philadelphia: Mosby Inc; 2004.
49. Hebel RS, Stromberg MW. *Anatomy and Embryology of The Laboratory Rat*. BioMed Verlag 1986;231-252.
50. Enders AC, Schlafke S, Welsh AO. Trophoblastic and uterine luminal epithelial surfaces at the time of blastocyst adhesion in the rat. *Am J Anat* 1980;159(1):59-72.
51. <http://placentation.ucsd.edu/rat.html> adlı web sayfasından yararlanılmıştır. (Mayıs, 2010)
52. Pijnenborg R, Vercruyse L, Mathias Duval on placental development in mice and rats. *Placenta* 2006;27(2-3):109-18.
53. Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M et al. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 2002;187(1-2):207-12.
54. Parast MM, Aeder S, Sutherland AE. Trophoblast giant-cell differentiation involves changes in cytoskeleton and cell motility. *Dev Biol* 2001;230(1):43-60.
55. Enders AC, Blankenship TN. Comparative placental structure. *Adv Drug Deliv Rev* 1999;38(1):3-15.
56. Hogan BL, Barlow DP, Kurkinen M. Reichert's membrane as a model for studying the biosynthesis and assembly of basement membrane components. *Ciba Found Symp*1984;108:60-74.
57. Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 2002;23(1):3-19.
58. Jollie WP. Fine structure changes in the junctional zone of the rat placenta with increasing gestational age. *J Ultrastructure Research* 1965;12:420-38.

59. Achen MG, Gad JM, Stacker SA, Wilks AF. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor are co-expressed during early embryonic development. *Growth Factors* 1997;15(1):69-80.
60. Teesalu T, Masson R, Basset P, Blasi F, Talarico D. Expression of matrix metalloproteinases during murine chorioallantoic placenta maturation. *Dev Dyn* 1999;214(3):248-58.
61. Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Dev Dyn* 2006; 235(12):3280-94.
62. Georgiades P, Watkins M, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Roles for genomic imprinting and the zygotic genome in placental development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(8):4522-7.
63. Simmons DG, Fortier AL, Cross JC. Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. *Dev Biol* 2007;304(2):567-78.
64. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 1994;266(5190):1508-18.
65. Linzer DI, Fisher SJ. The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy. *Mol Endocrinol* 1999;13:837-40.
66. Carter AM. Placental Circulation. In *Comparative Placentation*. Academic Press: London; 2000. p.108-60.
67. Steven D. Anatomy of the Placental Barrier. In *Comparative Placentation*. Academic Press: London; 2000. p.25-57.
68. Redline RW, Chernicky CL, Tan HQ, Ilan J, Ilan J. 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):121-9.
69. Cross JC. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2000;11(2):105-13.
70. al-Lamki RS, Skepper JN, Burton GJ. Are human placental bed giant cells merely aggregates of small mononuclear trophoblast cells? An ultrastructural and immunocytochemical study. *Hum Reprod* 1999;14(2):496-04.
71. Nakayama H, Scott IC, Cross JC. The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev Biol* 1998;199(1):150-63.
72. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-57.
73. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982;17:229-59.

74. [http://en.wikibooks.org/wiki/Human\\_Physiology/Development:\\_birth\\_through\\_death](http://en.wikibooks.org/wiki/Human_Physiology/Development:_birth_through_death) adlı web sayfasından yararlanılmıştır. (Nisan 2010)
75. Kutmar Cotran Robbins: Basic Pathology, sixth edition. Cell Injury Death And Adaptation, 1997, p. 3-25.
76. Cohen JJ. Apoptosis. To be or not to be. Postgraduate Syllabus (AAAA-I) 1998;1:1-19.
77. Wright SC, Wei QS, Kinder DH, Larrick JW. Biochemical pathways of apoptosis; nicotinamide adenine dinucleotide-deficient cells are resistant to tumor necrosis factor or ultraviolet light activation of the 24-kd apoptotic protease and DNA fragmentation. *J Exp Med* 1996;183:463-71.
78. Galle PR. Apoptosis in liver disease. *Journal of Hepatology* 1997;27:405-12.
79. Staley K, Blaschke AJ, Chun J. Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. *Cell Death and Differentiation* 1997;4:66-75.
80. Stephen CS, Philip N. Baker DM, E. Malcolm Symonds: Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:57-65.
81. Rogers BB, Bloom SL, Leveno KJ: Atherosclerosis Revisited: Current Concepts On The Pathophysiology Of Implantation Site Disorders. *J. Obstet Gynecol Survey* March 1999;54(3):189-95.
82. Attanasio A, Schiffer D. Ultrastructural detection of DNA strand breaks by in situ end-labelling techniques. *J Pathol* 1990;176:27-35.
83. Chapman RS, Chresta CM, Herberg AA, Bere HM, Heer S, Whetton AD et al. Further characterization of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drug sensitive leukemia cells. *Cytometry* 1995;20:245-56.
84. Sgonc R, Wick G. Methods for the detection of apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;105:327.
85. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi (Türkçe çeviri)*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006.
86. Çoğulu Ö, Alpman A, Durmaz B, Özkinay F. Mitoz ve mayozun moleküler temelleri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007;27:725-37.
87. Kelman Z, Hurwitz J. Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism? *Trends Biochem Sci* 1998;23(7):236-38.
88. Tsurimoto T. PCNA binding proteins. *Front Biosci* 1999;4:D849-D858.
89. Bravo R, Frank R, Blundell Pa, Macdonald- Bravo H, 1987. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 326 (6112):515-517.

90. Fernandez EB, Sesterhenn IA, McCarthy WF, Mostofi FK, Moul JW. Proliferating cell nuclear antigen expression to predict occult disease in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors. *J Urol* 1994;152(4):1133-8.
91. Jaskulski D, deRiel JK, Mercer WE, Calabretta B, Baserga R. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science* 1988;240(4858):1544-6.
92. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidinbiotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-80.
93. James JL, Stone PR, Chamley LW. Cytotrophoblast differentiation in the first trimester of pregnancy: evidence for separate progenitors of extravillous trophoblasts and syncytiotrophoblast. *Reproduction*. 2005;130(1):95-103.
94. Hay WW Jr, Catz CS, Grave GD, Yaffe SJ. Workshop summary: fetal growth: its regulation and disorders. *Pediatrics* 1997;99(4):585-91.
95. Soares, M. Linzer D. Rodent prolactin family and pregnancy. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers. 2001. p.139-167.
96. Soares MJ. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2: 51.
97. Ain R, Canham LN, Soares MJ. 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):253-63.
98. Battistelli M, Burattini S, Pomini F, Scavo M, Caruso A, Falcieri E. Ultrastructural study on human placenta from intrauterine growth retardation cases. *Microsc Res Tech* 2004;65(3):150-8.
99. Brosens JJ, PijnenborgR, Brosens IA. Themyometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:1416- 23.
100. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93:1049- 59.
101. Romo A, Carceller R, Tobajas J. Intrauterine growth retardation (IUGR): epidemiology and etiology. *Pediatr Endocrinol Rev* 2009;6 Suppl 3:332-6.
102. Jansson T. Powell TL. IFPA 2005 Award in Placentology Lecture. Human placental transport in altered fetal growth: does the placenta function as a nutrient sensor? [a review]. *Placenta* 2006;27 Suppl A:91-7.
103. Özmen A. Diyabetik Ve Büyüme Geriliği Oluşturulmuş Sıçan Plasentalarının Gelişiminde Akt Ve Erk1/2 Proteinlerinin Rollerinin İmmünohistokimya Ve Western Blot Metodlarıyla Belirlenmesi (tez). Antalya: Akdeniz Üniversitesi; 2009.

- 104.Koç A, Kanter M. Sıçanlarda implantasyonda endometriyum dokusunun hücrel ve sıvısal savunma sistemi hücreleri üzerinde histokimyasal ve histometrik araştırmalar I. Hücrel savunma sistemi hücreleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2000;6(1-2):122-30.
- 105.Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Taylor AH, Konje JC, Bell SC, Teixeira NA. Spatio-temporal expression patterns of anandamide-binding receptors in rat implantation sites: evidence for a role of the endocannabinoid system during the period of placental development. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009;7:121
- 106.Simmons DG, Cross JC. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. *Dev Biol* 2005;284(1):12-24.
- 107.Kayışlı ÜA, Asar M, Demir R. Ratlarda Desidualizasyon Süresince Ekstrasellüler Matriksin Yeniden Modellenmesinde Laminin ve Fibronektin ile Reseptör Altbirimleri Integrin b4 ve a5'in Dağılımları ve Muhtemel Rollerini. *Turk J Biol* 2000;24:379-95.
- 108.Welsh AO, Enders AC. Occlusion and reformation of the rat uterine lumen during pregnancy. *Am J Anat* 1983;167:463-77.
- 109.Kramer B. Changes in vascular permeability and desiduoma formation during the peri-implantation period of the rat in response to exogenous gonadotropins. *Anat Rec* 1997;242:20-4.
- 110.Acar N. Gebeliğin Belirli Evrelerinde Normal ve Diyabetik Sıçan Plasentasında Hücre Siklusu Regülatörlerinin Dağılımı (tez). Antalya: Akdeniz Üniversitesi; 2005.
- 111.Vercruyse L, Caluwaerts S, Luyten C, Pijnenborg R. Interstitial Trophoblast Invasion in the Decidua and Mesometrial Triangle During the Last Third of Pregnancy in the Rat. *Placenta* 2006;27:22-33.
- 112.Witlin AG, Li ZY, Wimalawansa SJ, Grady JJ, Grafe MR, Yallampalli C. Placental and Fetal Growth and Development in Late Rat Gestation is Dependent on Adrenomedullin. *Biol Reprod* 2002;67:1025-31.
- 113.Er H. Normal Ve Dekametazon Verilen Sıçan Plasentasında Hücre Siklusu Proteinlerinden Siklin-E, PCNA Ve P27' nin Dağılımı (tez). Antalya: Akdeniz Üniversitesi; 2007.
- 114.Kanter M, Yoruk M, Koc A, Meral I, Karaca T. Effects of cadmium exposure on morphological aspects of pancreas, weights of fetus and placenta in streptozotocin-induced diabetic pregnant rats. *Biol Trace Elem Res* 2003;93(1-3):189-200.
- 115.<http://www.labvision.com/ab.cfm?first=AntiBody&second=%20106> adlı web sayfasından yararlanılmıştır. (Nisan 2010)
- 116.Maruo T, Ishihara N, Samoto T, Murakoshi H, Laoag-Fernandez Jb, Matsuo H. Regulation of human trophoblast proliferation and apoptosis during pregnancy. *Early Pregnancy* 2001;5(1):28-29.



117. Kanashiro C, Santos TC, Miglino MA, Mess AM, Carter AM. Growth and development of the placenta in the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:57.
118. Yoshie M, Tamura K, Kogo H. Differential localization of decidual stathmin during pregnancy in rats. *Placenta* 2004;25(5):449-55.
119. Correia-da-Silva G, Bell SC, Pringle JH, Teixeira NA. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy. *Placenta* 2004;25(6):538-47.
120. Acar N, Korgun ET, Cayli S, Sahin Z, Demir R, Ustunel I. Is there a relationship between PCNA expression and diabetic placental development during pregnancy? *Acta histochem* 2008;110:408-17.
121. Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol* 1994;8:665-73.
122. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Review* 1993;14:133-50.
123. Ballian N, Hu M, Liu SH, Brunicardi FC. Proliferation, hyperplasia, neogenesis, and neoplasia in the islets of Langerhans. *Pancreas*. 2007;35(3):199-06.
124. Xia HF, Sun J, Sun QH, Yang Y, Peng JP. Implantation-associated gene-1 (Iag-1): a novel gene involved in the early process of embryonic implantation in rat. *Hum Reprod* 2008;23(7):1581-93.
125. Perez MJ, Macias RI, Marin JJ. Maternal cholestasis induces placental oxidative stress and apoptosis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *Placenta* 2006;27(1):34-41.
126. Chauhan M, Yallampalli U, Reed L, Yallampalli C. Adrenomedullin Antagonist Infusion to Rats During Midgestation Causes Fetoplacental Growth Restriction Through Apoptosis. *Biol Reprod* 2006;75(6):940-7.
127. Antipatis C, Ashworth CJ, Riley SC, Hannah L, Hoggard N, Lea RG. Vitamin A Deficiency During Rat Pregnancy Alters Placental TNF- $\alpha$  Signalling and Apoptosis. *Am J Reprod Immunol* 2002;47(3):151-8.
128. Katayama K, Ueno M, Takai H, Ejiri N, Uetsuka K, Nakayama H et al. Ethylnitrosourea induces apoptosis and growth arrest in the trophoblastic cells of rat placenta. *Biol Reprod* 2002;67(2):431-5.
129. Furukawa S, Usuda K, Abe M, Hayashi S, Ogawa I. Busulfan-induced apoptosis in rat placenta. *Exp Toxicol Pathol* 2007;59(2):97-103.
130. Yamauchi H, Katayama K, Ueno M, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K. Involvement of p53 in 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced trophoblastic cell apoptosis and impaired proliferation in rat placenta. *Biol Reprod* 2004;70(6):1762-7.

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|   | <b>Sayfa No</b> |
|---|-----------------|
| <b>Şekil 1.</b> Villus organizasyonuna göre plasenta tiplerinin canlı örnekleri.....                          | 6               |
| <b>Şekil 2.</b> Hemomonokoryal ve hemotrikoryal tip plasentalarda trofoblastik hücre katı<br>görünümleri..... | 7               |
| <b>Şekil 3.</b> Sıçan plasenta gelişiminin erken safhaları.....   | 13              |
| <b>Şekil 4.</b> Sıçan plasentasının gelişimi.....   | 13              |
| <b>Şekil 5.</b> Sıçanda plasental gelişim.....  | 14              |
| <b>Şekil 6.</b> Sıçanlarda term plasentanın genel görünümü.....   | 15              |
| <b>Şekil 7.</b> Üç sıra halinde düzenlenmiş labirent trofoblast hücreleri.....                                | 16              |
| <b>Şekil 8.</b> Gebeliğin 17.gününde labirentin detaylı görünümü.....   | 16              |
| <b>Şekil 9.</b> Gebeliğin 17. gününde spongiyotrofoblast ve dev hücre tabakasının detaylı görünümü<br>.....   | 18              |
| <b>Şekil 10.</b> Sıçan ve insan plasentalarının karşılaştırılması.....  | 20              |
| <b>Şekil 11.</b> Apoptoza maruz kalan bir hücrede hücre ölümünün aşamaları.....                               | 21              |
| <b>Şekil 12.</b> Gebeliğin 7, 9, 11 ve 13. günlerine ait uterus+plasenta+embriyo ağırlıkları.....             | 29              |

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 13.</b> Gebeliğin 15, 17, 19 ve 21. günlerine ait plasenta ağırlıkları.....                        | 30 |
| <b>Şekil 14.</b> Gebeliğin 15, 17, 19 ve 21. günlerine ait embriyo ağırlıkları.....                         | 30 |
| <b>Şekil 15.</b> Gebeliğin 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 ve 21. günlerindeki PCNA pozitif hücre sıklığı<br>..... | 44 |

### **Resimler**

|   |    |
|---|----|
| <b>Resim 1.</b> Gebeliğin 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 ve 21. günlerine ait uterus+plasenta+embriyo ve normal uterus görünümleri.....                   | 31 |
| <b>Resim 2.</b> Gebeliğin 7. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait H+E boyanmaları görünümleri.....  | 33 |
| <b>Resim 3.</b> Gebeliğin 9. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait H+E boyanmaları görünümleri.....  | 34 |
| <b>Resim 4.</b> Gebeliğin 11. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait H+E boyanmaları görünümleri.....                                       | 35 |
| <b>Resim 5.</b> Gebeliğin 13. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait H+E boyanmaları görünümleri.....                                       | 37 |
| <b>Resim 6.</b> Gebeliğin 15. günündeki plasenta kesitine ait H+E boyanmaları görünümleri.....  | 39 |
| <b>Resim 7.</b> Gebeliğin 17. günündeki plasenta kesitine ait H+E boyanmaları görünümleri.....  | 40 |
| <b>Resim 8.</b> Gebeliğin 19. günündeki plasenta kesitine ait H+E boyanmaları görünümleri.....  | 41 |
| <b>Resim 9.</b> Gebeliğin 21. günündeki plasenta kesitine ait H+E boyanmaları görünümleri.....  | 42 |
| <b>Resim 10.</b> Gebeliğin 7. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait PCNA immünboyanması, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması.....  | 45 |
| <b>Resim 11.</b> Gebeliğin 9. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait PCNA immünboyanması, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması.....  | 47 |
| <b>Resim 12.</b> Gebeliğin 11. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait PCNA immünboyanması, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması..... | 48 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Resim 13.</b> Gebeliğin 13. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait PCNA immünboyanması, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması ..... | 50 |
| <b>Resim 14.</b> Gebeliğin 15. günündeki plasenta kesitine ait PCNA immünboyanması, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması .....                | 52 |
| <b>Resim 15.</b> Gebeliğin 17. günündeki plasenta kesitine ait PCNA immünboyanması, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması .....                | 54 |
| <b>Resim 16.</b> Gebeliğin 19. günündeki plasenta kesitine ait PCNA immünboyanması, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması .....                | 55 |
| <b>Resim 17.</b> Gebeliğin 21. günündeki plasenta kesitine ait PCNA immünboyanması, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması .....                | 56 |
| <b>Resim 18.</b> Gebeliğin 7. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait TUNEL boyanması .....   | 58 |
| <b>Resim 19.</b> Gebeliğin 9. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait TUNEL boyanması .....   | 59 |
| <b>Resim 20.</b> Gebeliğin 11. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait TUNEL boyanması .....  | 59 |
| <b>Resim 21.</b> Gebeliğin 13. günündeki uterus+plasenta+embriyo kesitine ait TUNEL boyanması .....  | 60 |
| <b>Resim 22.</b> Gebeliğin 15. günündeki plasenta kesitine ait TUNEL boyanması.....  | 60 |
| <b>Resim 23.</b> Gebeliğin 17. günündeki plasenta kesitine ait TUNEL boyanması.....  | 61 |
| <b>Resim 24.</b> Gebeliğin 19. günündeki plasenta kesitine ait TUNEL boyanması.....  | 61 |
| <b>Resim 25.</b> Gebeliğin 21. günündeki plasenta kesitine ait TUNEL boyanması.....  | 62 |
| <b><u>Tablolar</u></b>   |    |
| <b>Tablo 1.</b> Gebeliğin 7, 9 ve 11. günlerindeki sıçan uterusunda PCNA immunoboyanmasının hücresel dağılımı .....                                  | 43 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tablo 2.</b> Gebeliğin 13, 15, 17, 19 ve 21. günlerindeki sıçan plasentalarında PCNA immunoboyanmasının hücrel dağılımı.....                 | 43 |
| <b>Tablo 3.</b> Gebeliğin 7, 9 ve 11. günlerindeki sıçan uterusunda TUNEL pozitif hücrelerin semikantitatif değerlendirmesi.....                | 57 |
| <b>Tablo 4.</b> Gebeliğin 13, 15, 17, 19 ve 21. günlerindeki sıçan plasentalarında TUNEL pozitif hücrelerin semikantitatif değerlendirmesi..... | 57 |

## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Ankara'da doğdum. Ortaöğretimimi İstanbul Bahçelievler Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2004 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimime başladım. 2008 yılında Biyolog ünvanını alarak mezun oldum ve aynı yıl Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.



## **EKLER**

# Ek 1

T.C.

## TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

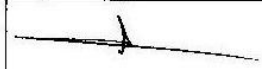
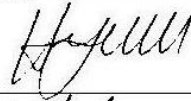
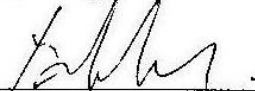
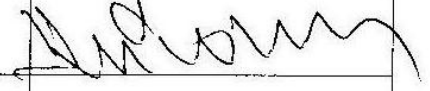


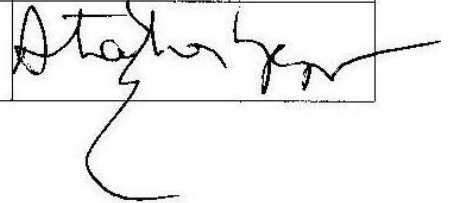
### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı:10

Karar Tarihi: 17.12.2009

KARAR NO: 2009/10.03

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet Kanter'in yaptığı Biol. Mustafa Erboğa yüksek lisans tezi olarak planlanan TÜHDYEK- 2009/073 protokol nolu "Sığırcılarda Plasenta Gelişiminin Morfolojik Olarak İncelenmesi" başlıklı çalışma görüşüldü; araştırmacının amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

| Ünvanı/Adı/Soyadı   | Araştırma ile İlişki  | Toplantı Katılımı  | İmza  |
|---|---|--|---|
| Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi              | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet<br><input checked="" type="checkbox"/> hayır |  |
| Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA<br>Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi    | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet<br><input type="checkbox"/> hayır |  |
| Vet.Hek. Ziya ÇUKUR<br>Veteriner Hekim                              | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet<br><input checked="" type="checkbox"/> hayır |  |
| Hüseyin KOÇ<br>Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye                  | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet<br><input checked="" type="checkbox"/> hayır |  |
| İlyas ÖZMEN<br>Sivil Üye  | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet<br><input checked="" type="checkbox"/> hayır |   |
| Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN<br>Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet<br><input type="checkbox"/> hayır |  |
| Yrd.Doç.Dr. S. Arzu VARDAR<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi           | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet<br><input checked="" type="checkbox"/> hayır |   |
| Doç. Dr. Nilda TURGUT<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi                | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet<br><input type="checkbox"/> hayır |  |
| Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAŞ<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi         | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet<br><input checked="" type="checkbox"/> hayır |   |
| Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi          | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet<br><input type="checkbox"/> hayır |  |