

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS)

**TROFOBlastLARIN OKSİDATİF STRESE YANITINDA
ROL OYNAYAN MEKANİZMALAR**

ERENGÜL TOKAY

**DANIŞMAN
PROF. DR. MERAL KOYUTÜRK**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2013

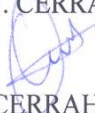
TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında Erengül Tokay tarafından hazırlanan Trofoblastların Oksidatif Strese Yanıtında Rol Oynayan Mekanizmalar başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

17 / 09 / 2013

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

1.PROF. DR. MERAL KOYUTÜRK (İ.Ü. CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ. HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI) 

2.PROF. DR. İSMAİL SEÇKİN (İ.Ü. CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ. HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI) 

3.PROF. DR. SİBEL ÖZYAZGAN (İ.Ü. CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ. TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI) 

4.

5.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ERENGÜL TOKAY

İTHAF

Değerli fikirleriyle beni yetiştiren, benim ben olmamdaki en önemli temelleri atan çok değerli ‘Annem ve Babama’ ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tez çalışmamın her aşamasında hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, bilimsel katkı ve önerileri ile bana yol gösteren, çalışmamı yürütme ve sonuçlandırma konusunda olumlu eleştirileri ile beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK'e teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ihtiyaçlarımı karşılayan ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, sevgili annem Sevgin TOKAY'a, babam Selim TOKAY'a, kardeşlerim Dt. Elvedin TOKAY ve Rebiye TOKAY'a teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Manevi desteğini yüksek lisansım boyunca hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Şenol ERTÜRKÖĞLU'na teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim..

Yüksek lisans eğitimime katkıları olan hocalarım, başta Sayın Prof. Dr. İsmail SEÇKİN'e, Sayın Prof. Dr. Faruk ALKAN'a, Sayın Doç. Dr. Elif GÜZEL'e, Sayın Prof. Dr. Oktay ARDA'ya ve Sayın Prof. Dr. Mustafa TAŞYÜREKLİ'ye, tek tek teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü problemimde sabırla yanımda olan ve bana her zaman her türlü desteği veren sevgili uzmanlarım Araş. Gör. Gamze TANRIVERDİ ve Araş. Gör. Murat BAŞAR'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Manevi destekleri ve yardımlarını esirgemeyen Msc. Mediha ESER'e, Azize GÜMÜŞYAZICI'ya Msc. Sibel DEMİRCİ'ye, Msc. Özgür D. DEMİRKİRAN'a, Araş. Gör. Tuba EKİZ'e, Dok.öğr. Belisa KALLECI'ye ve bölümdeki tüm diğer uzman, teknisyen, doktora ve yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İlerde çok değerli bir akademisyen olabileceğini düşündüğüm ve bilimsel açıdan sonsuz yardım aldığım arkadaşım Elif YAPRAK SARAÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisansım boyunca yardımlarını ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan ev arkadaşım Aslı GÜMÜŞEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez aşamam sırasında gece gündüz demeden beni asla yalnız bırakmayan ve sabır kaynağım olan Shaban VAROLLİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İMPLANTASYON	4
2.2. PLASENTA	5
2.3. PLASENTANIN OLUŞUM AŞAMALARI	6
2.3.1. Prelaküner Dönem.....	6
2.3.1.1. Villöz Trofoblastlar	8
2.3.1.2. Ekstravillöz Trofoblastlar.....	9
2.3.2. Laküner Dönem.....	9
2.3.3. Erken Villus Dönemleri	10
2.3.4. Villus Tipleri	11
2.4. PLASENTANIN YAPISI	13
2.4.1. Term (miyadında) Plasenta	13
2.4.2. Desidua.....	13
2.4.2.1. Desidua Bazalis.....	13
2.4.2.2. Desidua Kapsülaris.....	14
2.4.2.3. Desidua Pariyetalis.....	14
2.4.3. Koryon Plağı	14
2.5. PLASENTANIN FONKSİYONLARI.....	15
2.6. PLASENTAL BARİYER	15

2.7. PLASENTAL BOZUKLUKLAR.....	16
2.7.1. Preeklampsi.....	16
2.7.2. Preeklampsi Patofizyolojisi.....	17
2.7.3. Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri	18
2.7.4. Oksidatif Stres ve Preeklampsi	19
2.8. TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR ALFA (TNF- α)	20
2.8.1. TNF- α ve Oksidatif Stres	22
2.8.2. TNF- α ve Apoptoz	22
2.8.3. TNF- α ve Preeklampsi	23
2.8.4. TNF- α ve Pentoksifilin	23
2.9. NÜKLEAR FAKTÖR KAPPA B (NF- κ B).....	24
2.10. APOPTOZ	27
2.10.1. Apoptotik Hücrelerde Gözlenen Morfolojik Değişiklikler.....	28
2.10.2. Apoptozun Moleküler Düzenleyicileri	29
2.11. KASPAZLAR	29
2.12. HÜCRE PROLİFERASYONU	31
2.12.1. Hücre Siklusu.....	31
2.13. HÜCRE PROLİFERASYONUNUN GÖSTERİLMESİ.....	32
2.13.1. PCNA Ekspresyonu	32
2.14. JAR HÜCRE SOYU	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. GEREÇLER.....	34
3.1.1. Alet ve Teçhizat	34
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	34
3.1.3. Cihazlar	35
3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ	36
3.2.1. Doz ve Zaman Belirleme Deneyleri.....	36
3.3. İMMÜNOSİTOKİMYA YÖNTEMLERİ	37
3.3.1. NF- κ B, Kaspaz-8 ve PCNA İmmünohistokimyası	37
3.3.2. İmmünohistokimyasal Analiz	38
3.4. HÜCRE ÖLÜMÜNÜN DAPI BOYANMASI İLE GÖSTERİLMESİ.....	38
3.5. WESTERN BLOT ANALİZİ	38
3.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	39

4. BULGULAR.....	40
4.1. TNF- α DOZ VE ZAMAN BELİRLEME DENEYLERİ	40
4.2. İMMÜNOSİTOKİMYASAL NF- κ B İMMÜNREAKTİVİTESİ.....	40
4.3. NF- κ B/PTX İMMÜNREAKTİVİTESİ	45
4.4. İMMÜNOSİTOKİMYASAL KASPAZ-8 İMMÜNREAKTİVİTESİ.....	50
4.5. HÜCRE ÖLÜMÜNÜN DAPI BOYANMASI İLE GÖSTERİLMESİ	55
4.5.1. Apoptotik Hücre Oranlarının Belirlenmesi.....	55
4.6. PROLİFERASYONUN İMMÜNOSİTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ	58
4.7. WESTERN BLOT	63
5. TARTIŞMA	64
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	86

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 4.2-1: Kontrol ve deney gruplarına ait NF- κ B immünreaktivitesinin nükleer ve sitoplazmik ortalama ve standart sapmasını gösteren tablo.....	41
Tablo 4.3-1: Kontrol ve deney gruplarına ait PTX ve PTX+TNF- α 'nın 1, 10, 20 mM PTX doz aralıklarında nükleer ve sitoplazmik NF- κ B immünreaktivitesinin ortalama ve standart sapmasını gösteren tablo.	45
Tablo 4.4-1: Kontrol ve deney gruplarına ait kaspaz-8 immünreaktivitesinin istatistiksel olarak ortalama ve standart sapmasını gösteren tablo.	50
Tablo 4.5-1: Kontrol ve 24 saatlik deney grubuna ait apoptotik hücre oranlarının istatistiksel analizini gösteren tablo.	55
Tablo 4.6-1: Kontrol ve deney gruplarına ait proliferasyonun PCNA ile ortalama ve standart sapmalarının istatistiksel analizini gösteren tablo.	58

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1-1: Blastokist gelişim aşamaları.....	5
Şekil 2.2-1: Uterus endometriyumunda plasenta.....	6
Şekil 2.3-1: Villöz ve ekstrasvillöz trofoblastlardan oluşan hücre kolonları.....	8
Şekil 2.3-2: Erken villus döneminde primer, sekonder ve tersiyer koryonik villusların gelişim aşamaları.....	10
Şekil 2.3-3: 1. , 2. ve 3. trimestirde plasental villus oluşumunun şematik görünümü....	11
Şekil 2.4-1: Desidua kısımları	14
Şekil 2.7-1: Preeklampside spiral arterlerin hasarlı trofoblast invazyonu	17
Şekil 2.8-1: PTX'in kimyasal yapısı.....	24
Şekil 2.9-1: NF- κ B'nin klasik ve klasik olmayan sinyal yolları.....	26
Şekil 2.10-1: Apoptotik hücrelerde gözlenen morfolojik değişiklikler	28
Şekil 2.12-1: Hücre siklusu.....	31
Şekil 4.2-1: Tüm deney gruplarında NF- κ B immünreaktivite sonuçları	41
Şekil 4.2-2: NF- κ B immünreaktivitesi için negatif kontrol örneği (X40).	42
Şekil 4.2-3: JAR hücrelerinde kontrol grubuna ait sitoplazmik ve nükleer NF- κ B immünreaktivitesi (X40).....	42
Şekil 4.2-4: 1 saatlik TNF- α uygulaması sonucunda sitoplazmik ve nükleer NF- κ B immünreaktivitesi (X40).....	43
Şekil 4.2-5: 6 saatlik TNF- α uygulaması sonucunda sitoplazmik ve nükleer NF- κ B immünreaktivitesi (X40).....	43
Şekil 4.2-6: 12 saatlik TNF- α uygulaması sonucunda sitoplazmik ve nükleer NF- κ B immünreaktivitesi (X40).....	44
Şekil 4.2-7: 24 saatlik TNF- α uygulaması sonucunda sitoplazmik ve nükleer NF- κ B immünreaktivitesi (X40).....	44
Şekil 4.3-1: 1, 10, 20 mM PTX uygulanan hücrelerde NF- κ B nükleer ve sitoplazmik immünreaktivitesi.	46
Şekil 4.3-2: PTX uygulaması için negatif kontrol örneği (X40).	46
Şekil 4.3-3: 1mM PTX uygulanan hücrelerde NF- κ B immünreaktivitesi (X40).	47
Şekil 4.3-4: 1mM PTX+TNF- α uygulanan hücrelerde NF- κ B immünreaktivitesi (X40).....	47

Şekil 4.3-5: 10 mM PTX uygulanan hücrelerde NF- κ B immünreaktivitesi (X40).	48
Şekil 4.3-6: 10 mM PTX+TNF- α uygulanan hücrelerde NF- κ B immünreaktivitesi (X40).	48
Şekil 4.3-7: 20 mM PTX uygulanan hücrelerde NF- κ B immünreaktivitesi (X40)	49
Şekil 4.3-8: 20 mM PTX+TNF- α uygulanan hücrelerde NF- κ B immünreaktivitesi (X40)	49
Şekil 4.4-1: Tüm deney gruplarına ait kaspaz-8 immünreaktivitesinin sonuçları	51
Şekil 4.4-2: Kaspaz-8 uygulaması için negatif kontrol örneği (X40).	51
Şekil 4.4-3: Kontrol grubuna ait sitoplazmik ve nükleer kaspaz-8 immünreaktivitesi (X40).	52
Şekil 4.4-4: 1 saatlik TNF- α uygulanan grupta kaspaz-8 immünreaktivitesi (X40).	52
Şekil 4.4-5: 6 saatlik TNF- α uygulanan grupta kaspaz-8 immünreaktivitesi (X40).	53
Şekil 4.4-6: 12 saatlik TNF- α uygulanan grupta kaspaz-8 immünreaktivitesi (X40).	53
Şekil 4.4-7: 24 saatlik TNF- α uygulanan grupta kaspaz-8 immünreaktivitesi (X40).	54
Şekil 4.5-1: Kontrol ve 24 saatlik deney grubuna ait apoptotik hücre oranları	56
Şekil 4.5-2: JAR hücrelerinde kontrol grubuna ait nükleuslar (ok) izlenmekte (X100).	56
Şekil 4.5-3: 24 saatlik TNF- α uygulanan deney grubunda nükleer fragmentasyon (yıldız) izlenmekte (X100).	57
Şekil 4.5-4: 24 saatlik TNF- α uygulanan deney grubunda kondanse olmuş (yıldız) ve yarım ay (ok başı) görüntüsüne sahip nükleuslar izlenmekte (X100)	57
Şekil 4.6-1: Kontrol ve deney gruplarına ait proliferatif hücre oranlarının yüzdesi.	59
Şekil 4.6-2: PCNA immünreaktivitesine ait negatif kontrol örneği (X40).	59
Şekil 4.6-3: 6 saatlik kontrol grubuna ait PCNA immünreaktivitesi, PCNA pozitif hücre nükleusları kırmızı renkte izlenmekte, Hematoksilen (H) (X40).	60
Şekil 4.6-4: 6 saatlik TNF- α uygulanan gruba ait PCNA immünreaktivitesi, H (X40)... ..	60
Şekil 4.6-5: 12 saatlik kontrol grubuna ait PCNA immünreaktivitesi, H (X40).	61
Şekil 4.6-6: 12 saatlik TNF- α uygulanan gruba ait PCNA immünreaktivitesi, H (X40).	61
Şekil 4.6-7: 24 saatlik kontrol grubuna ait PCNA immünreaktivitesi, H (X40).	62
Şekil 4.6-8: 24 saatlik TNF- α uygulanan gruba ait PCNA immünreaktivitesi, H (X40).	62

Şekil 4.7-1: 100 ng TNF- α uygulanan deney gruplarında zamana bağlı NF- κ B düzeylerine ait protein bantları	63
--	----

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- AEC:** Aminoetilkarbazol
BSA: Sığır serum albumin
CARD: Kaspaz toplama bölgeleri
Cdk: Siklin bağımlı kinaz
CKI: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
Cyc: Siklin
DAPI: 4-6-diamidino-2-fenilindol
DD: Ölüm bölgeleri
DED: Efektör ölüm bölgeleri
DMEM: Dulbeko'nun modifiye edilmiş Eagle medyumunu
DMSO: Dimetilsülfoksit
FBS: Fetal Sığır Serumunu
H: Hematoksilen
hCG: İnsan koryonik gonadotropin
H₂O₂: Hidrojen peroksit
IκB: Nf-kappa B'nin inhibitörü
IKK: IκB kinaz kompleks
MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinazlar
MnSOD: Mangan süperoksit dismutaz
NEMO: NF-κB esansiyel modülatör
NF-κB: Nüklear faktör kappa B
NIK: NF-κB tetikleyici kinaz
NLS: Nüklear lokalizasyon sinyali
O₂⁻: Süperoksit anyonu
OH: Hidroksil radikali
PBS: Fosfat tamponu çözeltisi
PCNA: Prolifere hücre çekirdek antijeni
PTX: Pentoksifilin
RHD: Rel homoloji alt birimi
ROT: Reaktif oksijen türevleri

SDS: Sodyum dodesil Sülfat

T-PBS: Tween-Fosfat tamponu çözeltisi

TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa

TNFR 1: Tümör nekroz faktör reseptör I

TNFR 2: Tümör nekroz faktör reseptör II

ÖZET

Tokay, E. (2013). Trofoblastların oksidatif strese yanıtında rol oynayan mekanizmalar. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul

İnsan plasentasının gelişiminin temeli, trofoblast hücrelerinin çoğalmasına ve farklılaşmasına bağlıdır. Trofoblastların fonksiyon yetersizliğinin preeklampsi benzeri patolojilerin gelişiminde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. Ancak ilişkili mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamıştır. Çalışmamızda, JAR hücre soyu kullanarak oluşturulan in vitro modelde trofoblast hücrelerinin TNF- α aracılı oksidatif strese yanıtı incelenerek preeklampsi benzeri plasental patolojilere yeni yaklaşımlar kazandırılması amaçlanmıştır. Oksidatif stres modeli TNF- α sitokininin farklı zaman ve dozlarda JAR hücrelerine uygulanması ile oluşturuldu. TNF- α 'nın sinsisyotrofoblast hücrelerinde NF- κ B sinyal yolağı, hücre proliferasyonu ve apoptotik hücre ölümü üzerine etkileri ve pentoksifilin (PTX) TNF- α aracılı NF- κ B sinyal yolağı üzerine etkisi incelendi. NF- κ B immünreaktivitesi, ön çalışmalar sonucunda belirlenen 100 ng TNF- α 'nın, 1, 6, 12 ve 24 saatlik sürelerde uygulanmasıyla oluşturulan deney gruplarında immünohistokimyasal ve western blot işaretleme yöntemleri ile incelendi. PCNA immünreaktivitesi ile hücre proliferasyonu oranı 6, 12 ve 24 saat'lik deney gruplarında değerlendirildi. Anti kaspaz-8 ve DAPI nükleer işaretlemeleri ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi 24 saatlik deney grubunda gerçekleştirildi. İmmünreaktivite sonuçları H skorlama yapılarak değerlendirildi. Hücre proliferasyonu ve apoptoz oranları işaretli hücre yüzdelerinin belirlenmesi ile saptandı. TNF- α uygulanarak oluşturulan in vitro stres koşullarında immünohistokimyasal işaretleme ile NF- κ B immünreaktivitesinin hem nükleer hem de sitoplazmik olarak anlamlı artış gösterdiğini ancak bu reaktivitenin TNF- α uygulama saatlerine göre değişiklik gösterdiğini tespit ettik. JAR hücrelerinde PTX'in (1,10,20mM) NF- κ B immünreaktivitesi üzerine etkisini, immünohistokimyasal olarak inceledik. 10 mM PTX+TNF- α grubunda nükleer NF- κ B düzeylerinin yalnız TNF- α uygulanan grupla karşılaştırıldığında azaldığını gördük. Yalnızca PTX uygulanan gruplarda ise JAR hücrelerinde mevcut nükleer NF- κ B immünreaktivitesinin izlenmediğini gördük. TNF- α 'nın zamana bağlı olarak proliferasyonu baskılayıcı etki gösterdiğini tespit ettik. Kaspaz-8 pozitif JAR hücrelerinde TNF- α 'nın immünreaktivite artışına neden olduğu izlendi. DAPI işaretli apoptotik hücrelerin de 24 saatte anlamlı artış gösterdiği tespit edildi. Elde ettiğimiz bulgular, oksidatif stres kaynağı TNF- α 'nın JAR hücrelerinde bir stress kaynağı olarak önemli rol oynadığını, PTX'in bu stres modelinde NF- κ B immünreaktivitesini etkilediğini ve bir terapötik olarak rolünün ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Plazenta, Trofoblast, Oksidatif stres, TNF- α , Preeklampsi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22830.

ABSTRACT

Tokay, E. (2013). The mechanisms involved in the response of trophoblasts against oxidative stress. Istanbul University the Institute of Health Science, Histology and Embryology Department, Master Thesis. İstanbul

The development of human placenta depends on the proliferation and differentiation of trophoblastic cells. Deficiencies in trophoblastic functions are known to have a critical role in progression preeclampsia like pathogenes. However, the mechanisms have not been explained yet. In this study, establishing in vitro model of JAR cell line, the response of trophoblast cells against TNF- α mediated oxidative stress was searched and it is aimed to represent new approaches in preeclampitic like placental pathologies. An oxidative stress model of TNF- α cytokine was established by application on JAR cells in different periods and dosages. The effects of TNF- α on NF- κ B pathway, cell proliferation and apoptotic cell death of syncytiotrophoblasts and the effect of pentoxifylline on TNF- α mediated NF- κ B pathway were investigated. NF- κ B immunoreactivity was examined by immunocytochemical and western blot techniques on experimental groups generated by applying 100 ng TNF- α dose, determine by preliminary studies, for 1, 6, 12 and 24 hour periods. PCNA immunoreactivity of cell proliferation rate was evaluated in experimental groups of 6, 12 and 24 hours. Determination of apoptotic cells by anti-caspase-8 and DAPI nuclear staining was performed in 24 hour-experimental group. Results of immunoreactivities were evaluated bu H-score. The ratio of cell proliferation and apoptosis was calculated by cell percentages. As a result of immunocytochemical staining, we determined that NF- κ B immunoreactivity was significantly increased in both nuclear and cytoplasmic levels in vitro stress conditions constituted by TNF- α application; however, this reactivity was changed according to application time of TNF- α . The effect of PTX (1, 10, 20 mM) on NF- κ B immunoreactivity of JAR cells was also investigated immunocytochemically. Nuclear NF- κ B levels in the group of 10 mM PTX+ TNF- α was decreased more than sole TNF- α applied group. In sole PTX applied groups, there was no nuclear NF- κ B immunoreactivity in JAR cells. We concluded that TNF- α has an inhibitory effect on time dependent cell proliferation. TNF- α was shown to cause an increased in immunoreactivity in caspase-8 positive JAR cells. Moreover, apoptotic cells stained with DAPI was determined to increased significantly in 24 hours. Our findings presented that TNF- α which leads oxidative stress has a significant role as a stress source in JAR cells; PTX affects NF- κ B immunoreactivity in this stress model and its therapeutic role needs to be explained by advanced researches.

Key words: Placenta, Trophoblasts, Oxidative Stress, TNF- α , Preeclampsia.

This study was supported by Istanbul University the Department of Scientific Research Projects, Project No: 22830.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Plasenta; dallanmış koryonik villus yapısıyla, sinsisyotrofoblastlar üzerinden maternal ve fetal dolaşımlar arasında değişimi sağlayan bir organdır (1, 2). Maternal ve fetal iki parçadan oluşan plasentanın maternal parçası desidua bazalisten, fetal parçası ise koryonik villuslardan meydana gelir (3).

İnsan plasentası hemokoryal tipte bir plasentadır. Hemokoryal tip plasentanın 2 ana özelliği vardır; fetal ve maternal dolaşımlar birbirinden tamamen ayrıdır, birbirine karışmazlar ve maternal kan direk olarak trofoblastlar ile temas halindedir (1,4). İnsan plasentasının gelişiminin temeli, trofoblast olarak isimlendirilen hücrelerin çoğalmasına ve farklılaşmasına bağlıdır. Farklılaşma sonucu trofoblastlardan sitotrofoblastlar ve sinsisyotrofoblastlar oluşur. Sitotrofoblastlar ve sinsisyotrofoblastlar plasentanın yapısını oluşturarak villusları çevreler, ancak sitotrofoblastlar ilerleyen süreçte kaybolurlar (1, 2). Sinsisyotrofoblast hücreleri invazif özelliğe sahip hücrelerdir, implantasyon bölgesinde ürettikleri matriks metalloproteinazları ve benzeri enzimlerle endometriyum içerisine (desidua bazalis) invazyon gösterirler (5).

Plasental gelişim kusurları ve fonksiyonlarındaki yetersizlikler fetal gelişimle sıkı bir korelasyon gösterir. Plasental yetmezlik intrauterin gelişim geriliği, tekrarlayan düşükler, fetal ölüm ve plasental aborsiyonla sonuçlanmaktadır. Plasental patolojiler; iskemi, vaskulit, tromboz ve trofoblast invazyon yetersizliği gibi tablolar ile ilişkilendirilmiştir (6).

Preeklamps, gebeliklerin %2-8'inde görülen fetal, neonatal ve maternal mortaliteye yol açan nedenlerden biridir (7, 8, 9). Preeklamps; gebeliğin 20. haftasından sonra görülen, hipertansiyon ve proteinüri ile karakterize gebeliğin sık görülen ve oldukça tehlikeli bir komplikasyonudur. Sebebi büyük ölçüde bilinmemekte ancak oksidatif stres ve genel yangısal olayların maternal sendromla ilişkili olduğu bilinmektedir (10, 11). Plasental ve maternal oksidatif stres preeklampsinin komponentleri olup, doğal sistemik maternal yangı aktivasyonuna katkıda bulunur (12).

Spiral arterlerin gebelikle ilişkili yeniden düzenlenmesi invaziv sinsisyotrofoblastlar aracılığıyla olur. Trofoblastların bu fonksiyonlardaki yetersizliği preeklampsinin başlamasında kritik bir rol oynar (13). Preeklampside trofoblastların yetersiz invazyonu sonucu uteroplazental dolaşımın bozulduğu (14), endometriyum

spiral arterlerinin yetersiz invazyonu sonucu musküler tabakasının korunduğu ve konstriksiyon geliştiği bildirilmiştir (10,15,16).

Reaktif oksijen türevlerinin (ROT) sentezindeki artış, bozulan antioksidan mekanizmayla dengelenememekte ve oksidatif stres gelişmektedir (17). Oksidatif stres basit bir şekilde, vücudun antioksidan savunması ile serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir (18). Oksidatif stresle ilişkili sinyal yollarının devreye girmesiyle plasental fonksiyonlar bozulmaktadır (17). Oksidatif stresin, preeklampsî patogeneğinde kesin rolü tam olarak anlaşılamamış olsa da anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir (19).

Oksidatif stres, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve aktive eden protein 1 (AP-1) sinyal transdüksiyon yollarını aktive eder. NF- κ B; transkripsiyon faktörü olan bir protein kompleksidir. NF- κ B molekülleri, I κ B (nf-kappa B'nin inhibitörü)'ye bağlı inaktif halde sitoplazmada tutulmaktadır. Sitokinler (inflamatuvar) ile uyarılma olursa, IKK (I κ B kinaz) kompleksi aktive edilir. Tümör nekroz faktör- α (TNF- α) proinflamatuvar bir sitokindir. TNF- α , mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B) sinyal yollarını aktive ederek inflamasyon öncülleri ve koruyucu antioksidan genlerin ekspresyonunu düzenler (20, 21).

Preeklampside artan TNF- α düzeylerinin sinsisyotrofoblast apoptozuyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. TNF- α , gebelik uterusunda tanımlanmış, hücresel gelişim düzenlenmesi ve çeşitli hücre yüzey ve sekresyon moleküllerinin sentezini düzenleyen bir polipeptittir (23,24).

Pentoksifilin (PTX) metilksantin türevi bir farmakolojik ajandır. Hücresel düzeyde pek çok fizyolojik etkisi tanımlanmıştır. Pentoksifilinin, TNF- α 'nın inhibitörü olduğu ayrıca yangısal yanıtları etkileyen diğer sitokinler üzerinde düzenleyici rol oynadığı bildirilmiştir (25, 26).

Sinsisyotrofoblastların rolüne ilişkin in-vitro araştırmalarda primer kültürden elde edilen hücreler dışında koryokarsinomalardan elde edilen hücre soyları da yaygın olarak kullanılmaktadır. JAR hücre soyu da 1971 yılında Pattillo ve arkadaşları tarafından elde edilmiş olup günümüzde tercih edilen modellerden birini oluşturmaktadır (27, 28, 29).

Çalışmamızın amacı, trofoblast hücrelerinin oksidatif strese yanıtlarının incelenerek preeklampsî benzeri plasental yetersizliklerle ilişkili mekanizmanın anlaşılması ve tedavi edici yaklaşımlar geliştirilmesine katkı sağlamaktır. Bu amaçla

planlanan araştırmamız, JAR hücre soyunun kullanıldığı in-vitro deney modelinde gerçekleştirildi. Plasental patolojilerin gelişiminde rol oynayan oksidatif stres modeli TNF- α sitokininin farklı zaman ve dozlarda JAR hücrelerine uygulanması ile oluşturuldu. Deney modelinde TNF- α 'nın sinsisyotrofoblast hücrelerinde NF- κ B sinyal yolağı, hücre proliferasyonu ve apoptotik hücre ölümü üzerine etkileri ve pentoksifilinin TNF- α aracılı NF- κ B sinyal yolağı üzerine etkisi incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

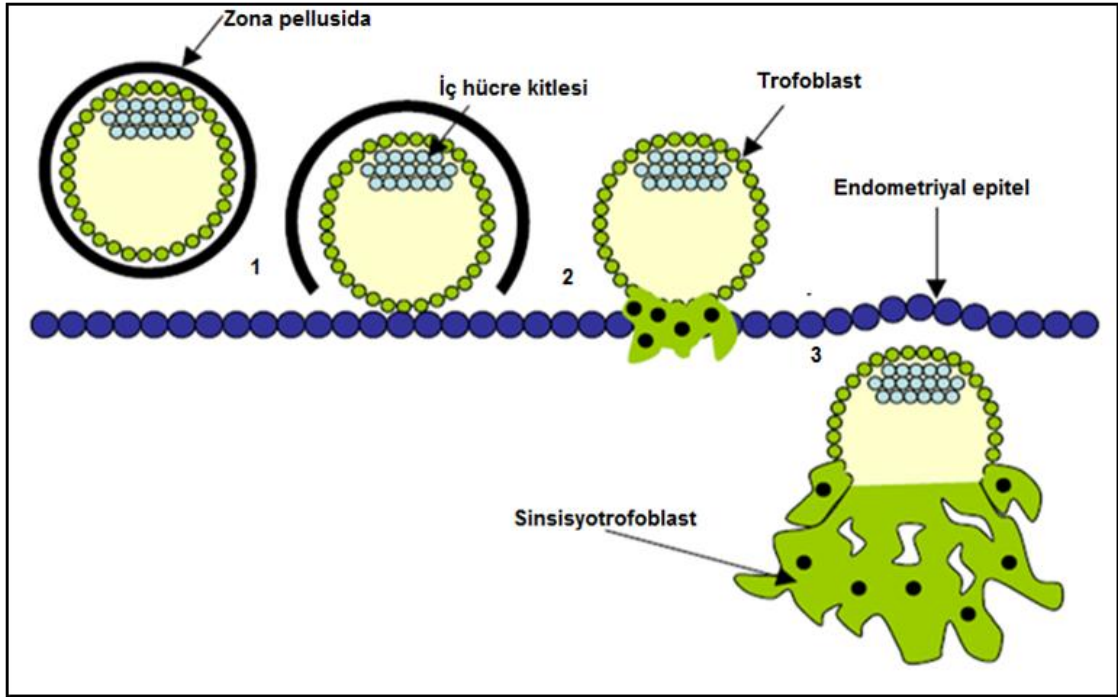
2.1. İMPLANTASYON

Döllenme dişi ve erkek gametlerinin birleşip kaynaşmasıdır. Uterus tüplerinin en geniş kısmı olan ampulla bölgesinde meydana gelir. Bu olay spermin önce oositin korona radiata'sını ve daha sonra zona pellusida'sını geçmesi sonucunda hücre zarlarının kaynaşmasıyla gerçekleşir. Sperm ve oosit hücre zarlarının kaynaşmasıyla oluşan zigot, bir seri mitotik hücre bölünmesine girer ve bunun sonucunda hücre sayısı hızla artar (4). Zigotta meydana gelen mitotik bölünmeler sonucunda hacmi giderek küçülen bu yavru hücrelere blastomer adı verilir. Döllenmeden 3-4 gün sonra 12-16 blastomerli döneme ulaşan yapıya morula denir. Morulanın içteki hücreleri iç hücre kitlesini, dışta kalan hücreleri de dış hücre kitlesini oluşturur. Morulanın uterus boşluğuna ulaşmasıyla iç hücre kitlesinin hücreler arası boşluğunda sıvı toplanmaya başlar. Hücreler arası boşluk giderek genişler. Bu boşlukların birleşmesiyle blastosel/blastosöl denilen tek bir boşluk oluşur. Oluşan yapıya ise blastokist denir. İç hücre kitlesi embriyoblastı oluştururken dış hücre kitlesi trofoblastı oluşturur (30).

İmplantasyon embriyonun endometrium epitelini geçmesiyle birlikte maternal dolaşım sistemiyle beraber plasentayı oluşturmak için endometriyuma ulaşmasını kapsayan bir süreçtir (31).

İnsan embriyosu oldukça invaziv bir yapıya sahiptir. Başarılı bir implantasyon süreci embriyonun gelişim basamakları ile bir dizi moleküler ve hücrel olay arasındaki senkronizasyona bağlıdır. Moleküler ve hücrel olaylar gebe uterusunda parakrin ve otokrin düzenleyicilerle tetiklenir. Embriyo bölünme sırasında implantasyon için hazırlanır. Başarılı bölünmelerle iç hücre kitlesinin ve trofoektodermal hücrelerin oluşturduğu blastokist için yeterli hücre üretilmelidir. İmplantasyon işlemi döllenmeyi takip eden 6. ve 7. günler arasında olur. Temel olarak 3 basamak içerir. İlk basamak olan apozisyon sırasında blastokist uterus duvarında implantasyonun gerçekleştiği bölgeye yaklaşır. Endometriyum yüzey epiteli apikalinde oluşan mikro çıkıntılar şeklindeki pinopodlar bu basamakta blastokistin apikal sinsisyotrofoblast yüzeyindeki mikrovilluslar ile birbirine bağlanır. Diğer basamakta embriyonik kutup epitele doğru yönelirken adhezyon evresi meydana gelir. Bu evre blastokist ve uterus epiteli arasındaki artmış fiziksel temasla ortaya çıkar. Son basamak invazyon işleminin olduğu

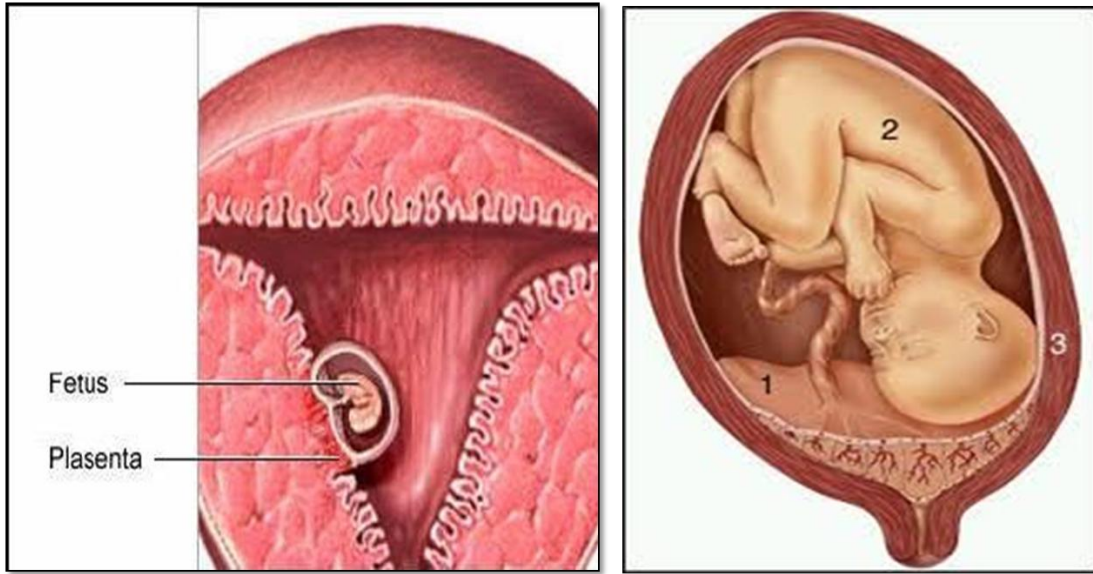
basamaktır. Sinsisyotrofoblastların uterus epiteline penetre olmasıyla başlar (Şekil: 2.2-2) (1, 31,32).



Şekil 2.1-1: Blastokist gelişim aşamaları. Döllenmeden 5 gün sonra görülen blastokist ve zona pellusida, 1: Apozisyon, 2: Adhezyon, 3: İnvazyon (32).

2.2. PLASENTA

Plasenta, gelişimi ve fonksiyonu dokuz ay ile sınırlı olmasına rağmen vazgeçilemez bir organdır. Gebelik sırasında plasenta anneden fetusa oksijen ve besin transferini kontrol eder, ayrıca fetusu annenin immünolojik reddetme mekanizmalarından korur (33,34,35). Plasenta başarılı bir maternal ve fetal ilişkide kritik roller oynar. Böylelikle gebelik başarılı bir şekilde devam edip sonlanır. Plasenta gelişim ve fonksiyonundaki hataların birçoğu henüz anlaşılamamış olup çoklu plasental patolojiler ile de ilişkilidir. 1800'lerin sonundan beri yapılan araştırmalara karşın, plasenta, henüz çözümlenememiş, mükemmel ve geçici bir organdır (36).



Şekil 2.2-1: Uterus endometriyumunda plasenta. 1: Plasenta, 2: Fetus, 3: Uterus (37).

2.3. PLASENTANIN OLUŞUM AŞAMALARI

2.3.1. Prelaküner Dönem

Plasentanın gelişimi blastokistin implantasyonu ile başlar. Blastokisti dıştan trofoblastlar çevreler. İç yüzeyinde ise embriyoblast denen küçük bir hücre grubu vardır. 8. günde blastokist endometriyuma tamamı ile implante olur. Sağlıklı bir gebeliğin oluşması ve insan plasentasının gelişiminin temeli, trofoblast hücrelerinin çoğalmasına ve farklılaşmasına bağlıdır. Bunlar gebeliğin ilerlemesi boyunca görev alan ve embriyoda farklılaşan ilk hücrelerdir (1). 1889 yılında Alman bilim adamı A.A.W. Hubrecht, trofoblast hücrelerini embriyoya dönüşmeyen bir hücre olarak tanımlamış ve embriyonun beslenmesi için gerekli olduğunu düşünmüştür (36). Aslında trofoblast terimi trofo; besleyici anlamına önek, blast; olgunlaşmamış genç hücre önekinden köken alır (38). İmplantasyon sırasında trofoblast hücreleri fazlaca kontrollü aşamalar geçirir. Bunlar proliferasyon, migrasyon ve invazyondur. Böylelikle anne ve fetus arasında ilk trofik bağlantı sağlanır (39,40). Trofoblast davranışları ekstraselüler matriksteki birçok elemanla, hücre adhezyon molekülleri ve büyüme faktörleriyle kontrol edilir (40,41). Farklılaşma aşamasında trofoblastlardan sitotrofoblastlar ve sinsityotrofoblastlar oluşur. Her hücre tipi düzenli fenotipik ve fonksiyonel

değişimlerden geçer. Bu hücreler plasentanın yapısını oluşturarak villusları çevreler. Ancak gebeliğin ilk döneminde sitotrofoblastlar sürekli olmasına karşın ilerleyen süreçte kaybolurlar (1,2).

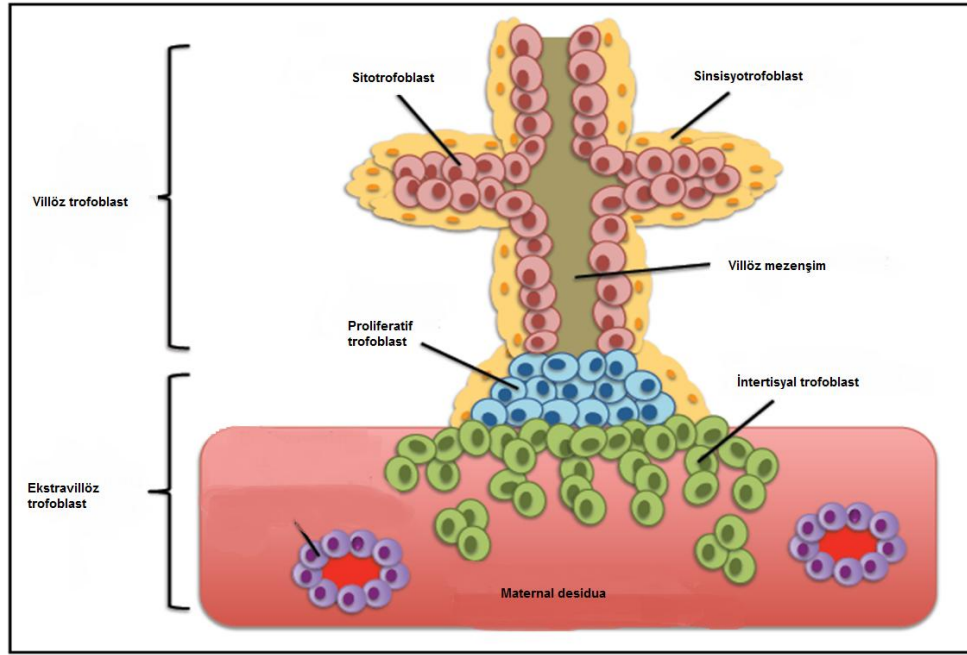
Sinsisyotrofoblastlar implantasyon sırasında tümör hücrelerine benzer davranışlar gösterir. Bunlar arasında dokuya invaze olma, metastaz, hücre teması inhibisyonunun kaybı, aşırı proliferasyon yeteneği yer almaktadır. Ancak agresif tümörlere nazaran trofoblast invazyon süreci geçici olarak gerçekleşen bir aşamadır ve ekstrasvilöz trofoblastları oluştururlar (42).

Sinsisyotrofoblast tabakası, hücre sınırları belirgin olmayan, çok çekirdekli ve maternal desidua ile direk temas eden trofoblastik tabakadır. Desidua içine parmak benzeri çıkıntılar uzatırlar. Villusun dış hücre tabakasında yer alır. Apikal yüzeydeki mikrovillus yapıları ve sitoplazmik vakuollerin varlığı, bu hücrelerin emilim ve salgı aktivitesini yansıtmaktadır (43). Hücreler arasındaki etkileşimler ve büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinler gibi çeşitli faktörler ile kontrol edilir (44).

Sitotrofoblastların ise desidua ile başlangıçta ilişkisi yoktur. Tek sıra halinde ve koryonik villus yapısında sinsisyotrofoblastlar ile villus bazal membranı arasında yerleşim gösterirler. Sitotrofoblast hücreleri birbirlerine ve etraflarındaki sinsisyotrofoblastlara dezmozomlarla bağlıdır. Gebeliğin son döneminde sitotrofoblastlar sayıca azalır. Ayrıca, immunohistokimyasal yöntemler bu hücrelerin hormon üretiminden yoksun olduğunu göstermektedir (43,45,46).

Sitotrofoblast hücreleri mitotik olarak bölünme yeteneğine sahipken, sinsisyotrofoblastlar bu özelliğe sahip değildir ve hücrel füzyonla oluşurlar (4,46,47).

Düzenli ve kontrollü invazyon sonucunda plasenta dallanmış villöz bir yapıya kavuşarak anne kanı ile bağlantısını arttırmış olur. Olgunlaşmış plasenta anne ile fetus arasında gerekli biyolojik değişimleri gerçekleştirebilir ve bu başarılı bir gebelik için gereklidir (33). İmplantasyondan sonra sitotrofoblastlar iki türlü farklılaşarak villöz ve ekstrasvilöz trofoblastları oluştururlar (Şekil 2.3-) (42).



Şekil 2.3-1: Villöz ve ekstrasivillöz trofoblastlardan oluşan hücre kolonları.

Asıl sitotrofoblastlar (pembe) villöz ya da ekstrasivillöz trofoblastlara farklılaşır. Sitotrofoblastlar birleşerek villöz sinsityotrofoblast tabakasını oluşturur (sarı). Maternal desidua ile etkileşimde olan sitotrofoblastlar ekstrasivillöz sitotrofoblastları oluşturur (mavi, yeşil, mor). İlk ekstrasivillöz trofoblastlar proliferatif fenotip (mavi) kazandıktan sonra invaziv fenotipe geçiş yaparlar (yeşil). İntertisyel ekstra villöz trofoblastlar (yeşil) maternal desiduya doğru göç ederler. Endovasküler ekstra villöz trofoblastlar (mor) maternal spiral arterleri tekrar modellerler (42).

2.3.1.1. Villöz Trofoblastlar

Sitotrofoblastlar birleşerek plasental villusların sinsityotrofoblast tabakasını oluştururlar. Sinsityotrofoblast çok nükleuslu, anne ile fetus arasında fiziksel bir bariyer olarak fonksiyon gören hücrelerden oluşur. Bu fonksiyon gaz alışverişini, besin geçişini ve atıkların ortadan kaldırılmasını kontrol eder (35).

Sinsityotrofoblast hücreleri plasentanın endokrin dokusu olarak görev alır. İnsan koryonik gonadotropin (hCG) ve çok miktarda protein hormon salgılar. hCG gebeliğin belirlenmesi için kullanılan ve sinsityotrofoblast hücreleri tarafından salgılanan hormondur (48). İnvazif özelliğe sahip hücrelerdir, implantasyon bölgesinde ürettikleri matriks metalloproteinazları ve benzeri enzimlerle endometriyum içerisine (desidua bazalis) invazyon gösterirler (49).

2.3.1.2. Ekstravillöz Trofoblastlar

İnvazyon sırasında sitotrofoblast hücreleri villöz bazal membrandan ayrılarak ekstravillöz trofoblastlara farklılaşır. Ekstravillöz trofoblastlar plasentanın uterus duvarına fiziksel olarak yapışmasından sorumludur. Bunun gerçekleşmesi için ekstravillöz trofoblastlar villöz uçlarda demirleyici hücre kolonları oluşturur ve maternal desiduaya doğru uzanır (Şekil 2.3-1) (50). Ekstravillöz trofoblast popülasyonu proliferatif ve invaziv hücrelerden oluşur. Bu hücrelerin boyutsal ve geç olarak düzenlenen fenotipleri vardır (51). Hücre kolonları içerisindeki ekstravillöz trofoblastlar proliferatiftir ve invaziv değildir. Buna karşın hücre kolonunun dışındaki ekstravillöz trofoblastlar invazivdir fakat proliferatif değildir (52). İki çeşit ekstravillöz trofoblast vardır: intertisyal ve endovasküler trofoblastlar. İntertisyal ekstravillöz trofoblastlar demirleyici hücre kolonları ile sıkı bağlantıları olan hücrelerdir ve maternal desiduaya doğru göç ederek miyometriyumun içteki üçte birlik kısmına ulaşırlar. Endovasküler ekstravillöz trofoblastlar gelişmekte olan fetus için kan akışını arttıran maternal spiral arterlerin tekrar modellenmesinden sorumludur. Maternal kanın serbestçe dolaştığı alanlara da intervillöz alanlar denir (53).

2.3.2. Laküner Dönem

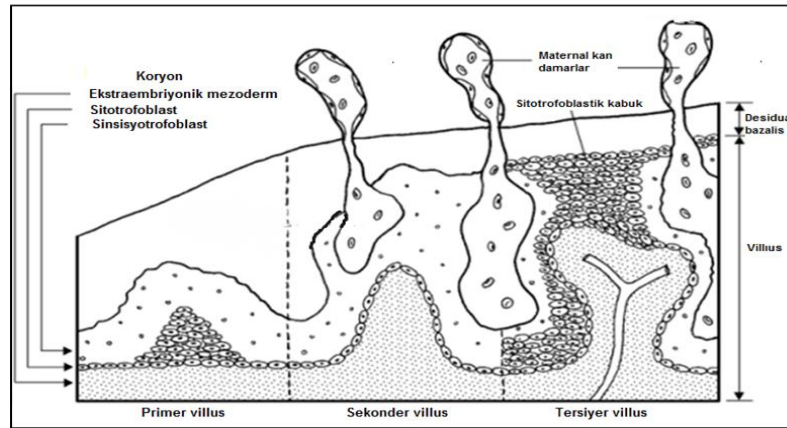
Laküner dönem implantasyondan sonra 8-9. günlerde başlar ve 12. güne kadar devam eder. İmplantasyon kutbunda, sinsityotrofolastların hızla gelişip oluşturduğu küçük vakuoller hızlıca büyüyüp tek boşluk haline gelerek laküna ismini alır. Lakünaların içi sıvıyla dolu olup bu lakünalar ilerde maternal kanın açıldığı intervillöz aralıkları oluşturur (1). İmplantasyon kutbundan başlayan laküna oluşumu birkaç gün içerisinde tamamıyla blastokistin tüm yüzeyinde gerçekleşir. Embriyonik kutup, proliferasyonun gerçekleştiği kısım olduğu için daha kalın bir duvara sahip iken, uterus epiteline bakan abembriyonik kutupta ise daha sonra yapısal değişiklikler oluşmaya başlar. Bu yapılar gerileyerek düz koryon ve membranlara dönüşür. Gelişimin başlarında lakünalardaki maternal kan basıncı daha düşük olup blastokist invazyonunun daha derinlere doğru ilerlemesiyle uterusun spiral arterleri aşınarak, intralaküner kan basıncını artırır. Böylece gerçek anlamda lakünalar içerisinde maternal dolaşım başlamış olur (54).

2.3.3. Erken Villus Dönemleri

Lakünaların içinde maternal kanın görülmesiyle trabeküllerde sitotrofoblastik proliferasyon artar ve böylelikle sinsityal füzyon gerçekleşir. 13. günde en belirgin değişiklik villus yapılarının oluşmaya başlamasıdır. Villus insan plasentasının temel yapısal elemanıdır. Villusların stromasında çeşitli hücreler bulunmaktadır; mezenkimal hücreler, retiküler hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri, makrofajlar ve Hofbauer hücreleri (54). Sitotrofoblastların belirli bir miktarda proliferasyon olup sinsityotrofoblastlarca çevrenmesiyle primer villuslar oluşur. Bu şekilde plasental villus ağacının gelişimini primer villuslar başlatmış olurlar (4,47).

13-15. günde, ekstraembriyonik mezodermin invaze olmasıyla primer villuslar sekonder villuslara dönüşürler. Sekonder villuslar içten dışa doğru ekstraembriyonik mezodermden oluşan bağ dokusu, sitotrofoblast ve en dışta sinsityotrofoblast hücrelerinden oluşur. İmplantasyonun 18-20. günleri arasında ekstraembriyonik mezodermde ilk olarak fetal kapillerin oluşmasıyla tersiyer villuslar oluşur. Bu damarlar, daha sonra koryon plağı ve bağlantı sapı mezoderminden geçen kapillerlerle ilişki kurarlar. Böylece besin, gaz ve atık maddelerin maternal-fetal değişiminde rol alırlar (Şekil 2.3-2) (4,54).

Bu sırada koryon villuslarının sitotrofoblast hücreleri proliferasyon olur ve sinsityotrofoblastların içine doğru genişleyerek girmesi ile sitotrofoblastik kabuk oluşur. Bu kabuk giderek koryon kesesini sarar ve endometriyuma bağlar. Sitotrofoblastik kabuk aracılığı ile maternal dokuya bağlanan villuslara kök (bağlı) villus denir. Bağlı villusların kenarından çıkan villuslara dallanan (terminal) villus denir (1,54).



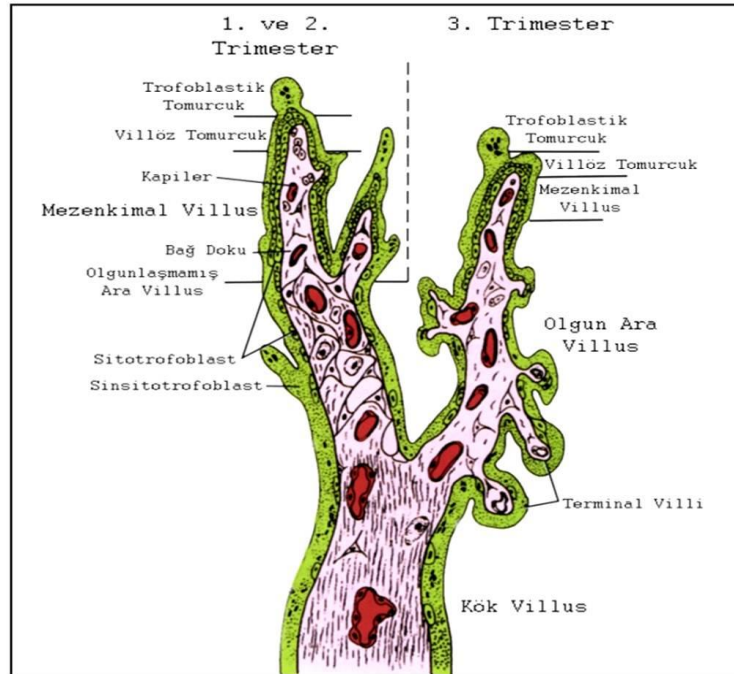
Şekil 2.3-2: Erken villus döneminde primer, sekonder ve tersiyer koryonik villusların gelişim aşamaları (55).

Maternal damarlar, sitotrofoblast kabuğunu delerek villusları çevreleyen intervillöz boşluklara açılırlar. Bu damarların intraembriyonik dolaşım sistemiyle birleşmesiyle, plasenta ve embriyo birleşmiş olur. Gelişimin 4. haftasında kalp atımı başlar ve böylece villöz sistem embriyonun gereksinimi olan besleyici maddeleri ve oksijeni sağlamaya başlar (4,54).

2.3.4. Villus Tipleri

Plasental villuslar; villusları çevreleyen sitototrofoblastlar, sinsityotrofoblastlar ve bir stromadan ibarettir (3). Villus ağacında bulunan stromal yapı, villus büyüklükleri ve fetal damar yapılarının değişik şekillerde olması villusların 5 ayrı tipini oluşturmuştur (35,56,57,58). Bunlar;

1. Mezenşimal villus
2. Kök villus
3. Olgunlaşmamış ara villus
4. Olgunlaşmış ara villus
5. Terminal villus (Şekil 2.3-3)



Şekil 2.3-3: 1. , 2. ve 3. trimestirde plasental villus oluşumunun şematik görünümü (58).

Mezenşimal villuslar: Gebeliğin erken evresine ait en ilkel villus tipidir. Villus ağacının gelişimi için anahtar rol oynamaktadırlar. Gevşek bir stroma içerirler, kapiller yapılar henüz seçilmez, iki sıralı trofoblast tabakası izlenir. Mezenşimal villuslar; kök (stem) villus, olgunlaşmamış ara (immatur intermediate) villus, olgun ara (mature intermediate) villus ve terminal villuslara doğrudan veya dolaylı olarak farklılaşabilirler. Gebeliğin 5. haftası dolaylarında plasental villusların tümü mezenşimal tiptedir (60).

Kök villuslar: Plasental villöz ağacın merkezi kısmını oluşturur. Villöz ağacın mekanik stabilitesinden sorumlu olan villus tipidir. Fetal kök damarlarını içerirler. Kök damarlar materno-fetal değişimin gerçekleştiği yerde fetal koryonik tabakadan periferik villöz dallanmalara öncülük eder. Kök villuslar oluşurken olgunlaşmamış ara ve mezenşimal villusların kaybı, immatur ve mezenşimal villusların yüzeyi boyunca mezenşimal filizlenme ile karşılanır. Böylece total villöz kitlenin hızlı artışı ve materno-fetal değişim yüzeyinin korunması sağlanır (61).

Olgunlaşmamış ara villuslar: Genellikle olgunlaşmamış plasentalarda bulunan kök villusun uç noktasında gelişmekte olan villuslardır. Olgun plasentalarda ise plasentanın merkezinde bulunurlar.

Olgunlaşmış ara villuslar: Daha az sitotrofoblastik yoğunluğa ve daha iyi fetal kapillarizasyona sahiptir. Uzun silindirik villus yapıları izlenir. Kök villuslara farklılaşmayıp terminal villuslara farklılaşırlar.

Terminal villuslar: Materno-fetal difüzyon için etkili yapılardır. Sayıca fazla olup oldukça iyi kapillarizasyon gösterirler. Olgunlaşmış ara villusun son dallarıdır. Anne ile fetus arasında gelişen su ve gaz değişimlerinin en çok ve en hızlı olduğu alanlardır. Villus ağacının %30-40'ını oluşturur (57,62).

2.4. PLASENTANIN YAPISI

2.4.1. Term (miyadında) Plasenta

Gelişimini tamamlamış olan plasenta yaklaşık 22 cm çapında, 2-3 cm kalınlığında ve 500-600 gr ağırlığında disk biçiminde geçici bir organdır. Plasentanın en küçük anatomik birimi kotiledondur. Her bir kotiledon tek bir spiral arterin terminal dalı ile kanlanır. İki veya daha fazla kotiledonun bir araya gelmesiyle lobüller oluşur. 15-20 adet lobül vardır. İnsan plasentası iki komponenti olan fetomaternal bir organdır. Koryonik keseden gelişen fetal kısım ile endometriyumdan gelişen maternal kısımları içerir. Plasenta ve göbek bağı anne ve fetus arasında taşıyıcı bir sistem oluşturur. Oksijen ve besleyici maddeler plasenta aracılığıyla maternal kandan fetusa, artık maddeler ve karbondioksit ise fetustan anne kanına geçer (63,3). Maternal yüzünde desidua bazalisle kaplı lobüller mevcuttur. Plasentanın fetal yüzü koryon plağı ile kaplıdır. Koryon içten amniyon zarı ile döşelidir (4).

2.4.2. Desidua

Desidua gebelik için özelleşmiş ve modifiye olmuş endometriyumdur. Endometriyum gebelik öncesinde bazı değişikliklere hazırlanır. Fakat en ileri değişiklik implantasyon bölgesindedir (62,63). Progesteron seviyelerinin artışına bağlı olarak endometriumdaki bağ dokusu hücreleri (stromal hücreler), büyüyerek açık renkte boyanan poligonal ya da yuvarlak desidua hücrelerine dönüşürler. Gebelik endometriyumunda oluşan hücresel ve vasküler değişikliklerin hepsine desidual reaksiyon denilir. Desidua hücreleri sitoplazmalarında glikojen ve yağ biriktirirler. Daha fazla çoğalarak maternal tarafta embriyonun immün sistemden korunması için bir bariyer oluştururlar. Bu mekanizma tam anlaşılamamış olsa da fizyolojik, biyokimyasal ve hormonal pek çok faktörün rol oynadığı düşünülmektedir. Desidua implantasyon bölgesi ile ilişkilerine göre, farklı yapı ve fonksiyonda olmasına bağlı olarak desidua bazalis, desidua kapsülaris ve desidua parietalis olmak üzere üç alt grupta incelenir (Şekil 2.4-1) (4,62,63).

2.4.2.1. Desidua Bazalis

Plasentanın maternal bölümüdür. Yoğun lipid ile glikojenden zengin desidual hücrelerden meydana gelir. Bu bölüm koryonla sıkıca bağlantılıdır (31). Koryona sıkıca

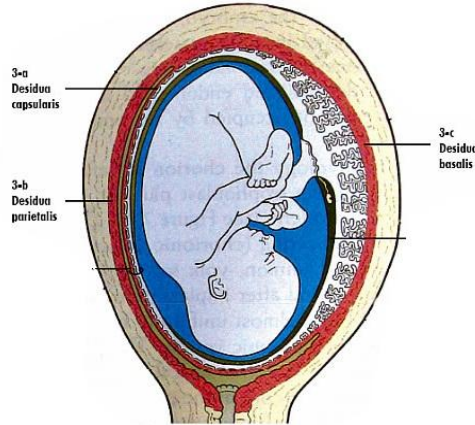
bağlıdır. Desidual plak olarak ta adlandırılır. Plasentayı yapan esas kısımdır. Maternal ve fetal hücrelerin çok yakın olarak bulunduğu yerdir (4,30).

2.4.2.2. Desidua Kapsülaris

Abembriyonik kutup üstündeki desiduya “desidua kapsülaris” adı verilir. Koryon boşluğu büyür, desidua kapsülarise basınç yapar. Bu bölüm dejenere olarak kaybolur. Koryon leve karşı yöndeki uterus duvarı (desidua pariyetalis) ile kaynaşma gösterir. Bu suretle uterus kapanır. Koryonun koryon frondozumu aracılığı ile madde alışverişi yapar. Koryon frondozum desidua bazalisle beraber plasentayı meydana getirir. Amniyon ile koryon birleşerek amniyokoryonik zarı meydana getirirler. Bu suretle koryon boşluğu yok olur (4,30).

2.4.2.3. Desidua Parietalis

Desidua pariyetalis (desidua vera) ise implantasyon bölgesi dışında kalan tüm endometriyum tabakasına denir (4,30).



Şekil 2.4-1: Desidua kısımları (4).

2.4.3. Koryon Plağı

Koryonik tabaka sitotrofoblast, sinsityotrofoblast ve somatik ekstraembriyonik mezodermden oluşur (60). Koryonik plak amniyonik kaviteye doğru yer alır ve plasentanın şekillenmesine yardımcı olur. Embriyonun gelişmesinde ve beslenmesinde rol oynayan koryonun uterus mukozasına gönderdiği uzantıları vardır. Bu uzantılara koryon villusları denir. Villusların da dış yüzü trofoblast hücreleri ile örtülmüştür.

Başlangıçta koryonun her tarafında bulunan villusların bir kısmı daha sonra kaybolup sadece embriyonun uterusu bağlandığı bölümde kalır. Villusların olmadığı koryon bölümüne düz koryon (chorion leave), bol villuslu kısma ise koryon frondozum denir. Koryon frondozum fetal plasentanın oluşmasını sağlar (1, 2).

2.5. PLASENTANIN FONKSİYONLARI

- Fetusa oksijen ve besin maddelerinin sağlanması, atıkların fetustan uzaklaştırılması,
- Endokrin etkisiyle annede gebelik ve doğum ile ilişkili değişikliklerin oluşturulması,
- Gebeliğin sağlıklı olarak sürdürebilmesi için spiral arterlerdeki değişikliklerin oluşturulması,
- Fetusun zararlı etkilere korunması (1).

2.6. PLASENTAL BARIYER

Anne kanı ile fetus kanı koryon villuslarına ait plasenta membranı ile birbirinden ayrılmıştır. Plaseental bariyer başlangıçta 4 tabakadan oluşur. Bunlar;

1. Sinsityotrofoblast
2. Sitotrofoblast
3. Koryon villuslarının bağ dokusu
4. Fetal kapillerlerin endotelleridir

Gebelik ilerledikçe fetal ve maternal dolaşım arasındaki mesafede değişiklikler meydana gelmektedir (35). Villuslarda zamanla sitotrofoblast hücreleri incelerek kaybolurlar. Bu nedenle, çoğu alanda plaseental bariyer 3 tabakadan oluşur. Plasenta membranı başlangıçta daha kalın iken gebelik ilerledikçe giderek incilir. Böylelikle madde alışverişi daha hızlı bir şekilde olur. Plaseental membran villuslar boyunca uzandığından büyük bir yüzeye sahiptir. Plaseental membran endojen ve ekzojen pek çok maddeye geçirgindir. Plasenta, ancak molekülün belirli bir büyüklüğü, konfigürasyonu, elektrik yükü varsa bariyer görevi görebilir. Bazı metabolitler, toksinler ve hormonlar plaseental membranı geçemezler (4,63).

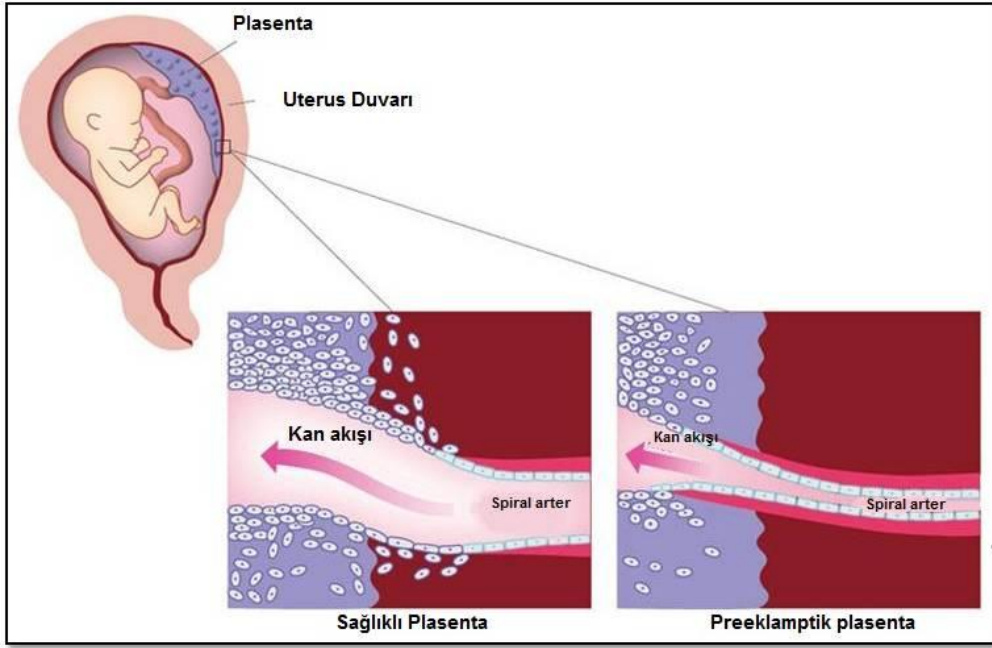
2.7. PLASENTAL BOZUKLUKLAR

Plasental gelişim bozuklukları ve fonksiyonlarındaki yetersizlikler fetal gelişimle sıkı bir ilişki gösterir. Plasental yetmezlik intrauterin gelişim geriliği, tekrarlayan düşükler, fetal ölüm ve plasental aborsiyonla sonuçlanmaktadır. Plasental patolojiler; iskemi, vaskulit, tromboz, trofoblast invazyon yetersizliği gibi tablolarla ilişkilendirilmiştir (6).

2.7.1. Preeklampsi

Preeklampsi gebe kadınların %2-8'ini etkileyen maternal mortalite veya morbiditeye yol açan bir sendromdur (7,8,64,65). Gestasyonun 20. haftasından sonra hipertansiyon ($>40/>90$) ve proteinüri ($>0.3\text{g}/24\text{saat}$) ile tanımlanır. Preeklampsi patogenezinde hem maternal hem de fetal faktörler etkilidir (64,66). Plasental yetersizlik preeklampsinin gelişiminde, fetal büyüme hasarlarında ve etyolojileri bilinmeyen gebelik patolojilerinde önemli bir role sahiptir (67). Ancak mevcut bilgiler preeklampsiye ilişkin mekanizmayı tüm yönleriyle açıklama yönünden yetersizdir.

Plasental damarların gelişimindeki anomaliler (16) plasental hipoperfüzyon, hipoksi veya iskemiye yol açmaktadır. Normal gebeliklerde fetus kaynaklı ekstrasvillöz sitotrofoblastlar desiduanın ve miyometriyumun spiral arterlerini istila eder. Bu istilacı sitotrofoblastlar maternal spiral arterlerin endotel tabakaları ile yer değiştirir ve bunları küçük yüksek dirençli damarlardan büyük çaplı damarlara dönüştürür. Bu süreç normal gebeliklerde 20-22. haftada tamamlanır. Ancak preeklampside bu dönüşüm yetersizdir. Spiral arterlerin sitotrofoblast invazyonu süperfisyal desidua ile sınırlıdır ve miyometriyuma ulaşamaz. Trofoblastların anormal farklılaşması preeklampside spiral arterlerin hasarlı trofoblast invazyonu için açıklayıcı bir mekanizma olabilir (Şekil 2.7-1) (64,66).



Şekil 2.7-1: Preeklampside spiral arterlerin hasarlı trofoblast invazyonu (68).

Preeklampsinin plasental orjinlerinin açıklanmasını amaçlayan çeşitli hipotezler geliştirilmiştir. Çoğu ortadan kalkmış olmakla birlikte birkaçı hala tartışılmaktadır. En güncel hipotezler şöyle özetlenebilir:

- Ekstravillöz trofoblastlara toksik bir etki
- Ekstravillöz trofoblastların uterin spiral arterlerine geçişte yetersiz kalmaları
- Maternal kanın intervillöz aralığa geçişinin azalması
- Hipoksi veya hipoksik aralıkları takiben plasentanın yeniden oksijenlenmesi
- Villöz trofoblastlarda hipoksik hasar
- Sinsityotrofoblastlarda membran fragmentlerinin maternal kan akışına salınması
- Bu geçişe cevaben görülen maternal inflamasyonun preeklampsinin klinik semptomlarına sebep olması (69).

2.7.2. Preeklampsi Patofizyolojisi

Preeklampsinin birincil ayırıcı desiduada bulunan maternal spiral arterlerin plasenta trofoblastları tarafından yüzeysel bir şekilde istila edilmesidir. Bu anormal ya da yetersiz plasenta oluşumu olarak adlandırılır. Normal gebelik sırasında ekstravillöz trofoblastlar uterusun spiral arterlerine invaze olur bu da maternal plasental damarların gelişimine yol açarak fetusa oksijen ve besin sağlar. Trofoblastlar maternal direnç

resistans damarlarını saran hücreden zengin düz kas yapılarını azaltarak vazokonstriksiyonu engeller. Böylelikle plasental kan akışı hızlandırılır. Trofoblastlar tarafından yapılan bu invazyon gestasyonun ilk trimesterinde gerçekleşir. Preeklampsi bu invazyonun yetersizliği ile karakterizedir. Sonuçta plasental iskemi fetal büyümede hasara sebep olabilir. Fakat plasentanın biyolojik bir cevabı olarak anjiyogenez modülatörlerini de salgılayabilir. Bunlardan bazıları maternoplasental bariyeri geçerek anneyi olumsuz yönde etkileyebilir. Uterus invazyonundaki bu hasarın sebepleri ve preeklampsinin daha çok doğum yapmamış kadınlarda görülmesinin sebebi henüz bilinmemektedir (70,71).

Preeklampside trofoblastların yetersiz invazyonu sonucu uteroplasental dolaşımın bozulduğu, endometriyum spiral arterlerinin yetersiz invazyonu sonucu musküler tabakasının korunduğu ve konstriksiyon geliştiği bildirilmiştir (69,72,73,74).

Preeklampside plasentanın rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. İnvazyonun intertisyal bileşenleri farklı olarak yetersiz invazyon anomalisi gösterir ve genelde erken gestasyonda hastalık belirtileri ile ilişkilendirilir. Ancak, endovasküler invazyon gelişmesini tamamlayamaz ve sonuçta oksijenlenmiş kanın fetal plasental birime aktarımı yavaşlar. Ayrıca preeklampsi geniş maternal endotelyal disfonksiyonu belirtileri ile tanımlanan ciddi bir gebelik komplikasyonudur. Sitotorofoblast tabakası invaziv yolakla farklılaşmayı başaramaz. Bu anomalinin fonksiyonel sonuçları intertisyal ve endovasküler invazyonu negatif olarak etkiler. Böylelikle maternal-fetal arayüzdeki kan akışını da etkilemiş olur (75).

2.7.3. Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Epidemiyolojik çalışmalar; genetik mutasyonların, paternal faktörlerin ve maternal faktörlerin preeklampsi riskini arttırdığını göstermektedir (70). Gebe kadınların % 10'unda hipertansiyon görülür. Bunların %2-8'inden de preeklampsi sorumludur (76).

Preeklampsinin patofizyolojisine uygun olarak;

- Nulliparite
- İleri anne yaşı (40 yaş üstü)
- Çoğul gebelik
- Kronik hipertansiyon
- Kronik renal hastalık

- Genetik (anne ve/veya kızkardeşte preeklampsi öyküsü varsa, risk artar.)
- Diabetes mellitus
- Antifosfolipid sendromu
- Gestasyonel trofoblastik hastalıklar
- Gebelik öncesi vücut kitle indeksindeki artış preeklampsi riskini arttırabilir (70,77) .

2.7.4. Oksidatif Stres ve Preeklampsi

Oksidatif stres basit bir şekilde, vücudun antioksidan savunması ile serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir (18,78). Aerobik solunum eşlenmemiş elektrona sahip serbest radikal türlerini ve radikal olmayan ara bileşikleri içeren reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi ile yakından ilişkilidir. ROT mitokondri kaynaklıdır ve sitozolik süreçlerden geçer. Ökaryotik organizmalar hasar verme potansiyeline sahip ve devamlı üretilen oksijen radikalleri ile başa çıkabilmek için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Organizma bu oksidanlara karşı başarısız olduğunda oksidatif stres durumu açığa çıkar. Oksidatif stresle ilişkili sinyal yollarının devreye girmesiyle plasental fonksiyonlar bozulmaktadır (79). Oksidatif stresin, preeklampsi patogenezinde kesin rolü tam olarak anlaşılamamış olsa da anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir (80). Sebebi kesin olmamasına rağmen uterus spiral arterlerin yetersiz dönüşümünün ve sonra plasentanın bozulan perfüzyonunun travmaya yol açtığını düşündüren güçlü deliller vardır (81,82).

Normal plasantasyon süreci maternal spiral arterlerin yeniden modellenmesini içerir. Preeklampside bu süreç tamamlanamaz ve bu damarlar normal yapılarını kazanamazlar bu da plasental perfüzyonun azalmasına sebep olur. Sonuçta görülen hipoksi oksidatif stresi arttırır (83). Bu artışın nedeni, spiral arter yapılanmasındaki problemler sonucu ortaya çıkan hipoksi ve iskemi-reperfüzyon tipi hasardır. Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan serbest radikaller lipid peroksidasyonuna, protein ve DNA'da hasara neden olur. Serbest radikaller trofoblastlarda apoptoziste artışa yol açar ve preeklampitik gebelerin plasentalarında da apoptoziste artış olduğu gösterilmiştir. Serbest radikaller sistemik dolaşıma katılarak bütün vücutta damar endotelinde lipid peroksidasyonuna ve yaygın oksidatif hasara yol açarlar (84).

Plasental oksidatif stres, ROT üretimi, toksik ürünlerin salınımı veya sinyal yollarının aktivasyonu ve çözünebilen faktörlerin salgılanması aracılığıyla maternal

endotelial hücre aktivasyonuna yol açar. Örneğin preeklampsi genellikle; hipergliseridemi, insülin direnci, oksidatif stres ve kronik inflamasyon ile ilişkilidir (20).

ROT hücre ölüm mekanizmalarını çalıştıran sinyal yollarını yönetebilir. Düşük düzeydeki ROT seviyelerinin apoptoza yol açtığı bildirilmiştir. ROT hücre ölüm reseptörlerini aktifleştirerek ekstrinsik apoptoz yollarını tetikleyebilir. Preeklampsik plasentanın trofoblast apoptozu oranlarını arttırdığı kaydedilmiştir (24). Sitotrofoblastlarda oksidatif stres ve sitokin reseptörleri ekspresyonları arasında ilişki olduğu öne sürülmüş ve bunun da ROT hiperaktivasyonuna yol açarak preeklampsiyle sonuçlandığı kaydedilmiştir (85). Apoptoz normal plasenta dokularında ve özellikle villöz trofoblastlarda meydana gelir ancak preeklampsili gebeliklerde daha fazla görülmüştür. Burada intervillöz aralıktaki yetersiz perfüzyonun oksidatif strese yol açtığı düşünülmektedir. Ancak preeklampsinin gerçek sebebi tam olarak anlaşılamamıştır (78,86).

2.8. TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR ALFA (TNF- α)

Pleotropik etkili inflamatuvar bir sitokin olan TNF (kaşektin/kaşeksin) ilk kez 1975’ te Carswell ve arkadaşları tarafından izole edilmiş ve nekrozda sitotoksik faktörlerin belirlenmesinde kullanılmıştır. 1984’te ilk kez TNF insan geni klonlanmış ve kromozom 6p21.3 MHC (major histocompatibility complex) içerisinde haritalanmıştır (74). TNF- α çok çeşitli biyolojik aktiviteye sahip bir polipeptid hormondur (87,88). İnsan TNF- α alt birimi 157 aminoasitli, 17 kDa’luk bir peptittir. 233 aminoasitli bir propeptitten 76 aminoasitli sinyal peptidinin ayrılmasıyla üretilir ve aktive olur. Böylelikle hücre yüzeyinden salgılanmış olur (89). Bu 17 kDa’luk TNF- α monomeri TNF- α ’nın serbest formudur. Bunun dışında TNF- α ’nın hücreye bağlı formu da mevcuttur (87,89). İnsanlardaki TNF- α türü glikozillenmiş değildir. İlk olarak endotoksinle uygulanmış farelerin serumunda bazı tümörlerin nekrozunu kontrol eden bir sitokin olarak tespit edilmiştir (87). TNF en çok monosit ve makrofajlarda üretilirken, TNF- α ise monosit/makrofaj, lenfositler, doğal öldürücü hücreler, fibroblastlar, astrositler, mikrogliyal hücreler, Kupffer hücreleri, desidual hücreler ve trofoblastlarda sentezlenmektedir (74,90). Ayrıca bu hücreler TNF- α reseptörlerini de eksprese etmektedir (90).

TNF- α 'nın sentezini başlatan etkenler:

- Endotoksinler (lipopolisakkaritler)
- Virüsler
- Mantar ve parazit antijenleri
- Enterotoksinler
- İmmün kompleksler
- İnterlökin 1
- İnterlökin 6
- TNF- α (otokrin) (87).

TNF- α 'nın depo formu yoktur fakat hücre aktivasyonu sonucu yeniden sentezlenir. Biyosentezi transkripsiyonel ve post transkripsiyonel mekanizmalarla düzenlenir. TNF- α transkripsiyonunun makrofajlardaki düzenlenmesinde 4 farklı κ -B benzeri motif ve esas olarak NF- κ B'nin uyarılabilen formları görev alır (87).

TNF- α 'nın birçok hücre tipi üzerinde pleotropik etkisi vardır. Örneğin endotoksinle uyarılmış yangısal reaksiyonlarda görev alan bir araçtır. TNF- α , monositler ve polimorfonükleer nötrofiller için kemotaktik bir ajandır. Fagositozu tetikler, endotele yapışmayı, süperoksit üretimini ve insan endotelyal hücrelerin kültüründe prokoagülan aktiviteyi uyarıcı etki gösterir (91). Gestasyonel problemlere yol açan maternal enfeksiyonlarda görülen bazı maternal sitokinlerin plasentadan doğrudan geçişi mümkündür, TNF- α ' da maternal serumda ve plasentada belirlenmiştir (92).

Hedef hücrenin türüne ve metabolik inhibitörlerin varlığına bağlı olarak TNF- α hücreyi apoptoza veya nekroza yönlendirir. Bazı kanser hücreleri ve insan hücre soyları TNF- α 'nın sitotoksik aktivitesine kısmen duyarlıyken bazıları tamamen duyarsızdır (87,90). TNF- α 'nın biyolojik etkileri, yüksek afiniteli 2 reseptörüne bağlanmayla başlar. Hedef hücrelerin yüzeylerinde bulunan bu reseptörler Tümör nekroz faktör reseptör 1 ve 2'dir (TNFR1 ve TNFR2) (93). Bu reseptörler TNF reseptör süperailisinin üyeleridir ve hücre dışına uzanan birimleri yüksek derecede benzerlik gösterir. TNFR1'in aktivasyonu temel olarak proinflamasyonun yanı sıra apoptoza neden olur ve doku hasarı ile ilişkilidir. TNFR2 aracılı sinyaller ise apoptoza tetikleyebilir fakat doku tamiri ve anjiyogenezi de destekleyebilir (74).

TNF, plasental ve endometriyal hücre çeşitlerinde apopitoz, trofoblast hücre füzyonunun inhibisyonu ve invazyonu gibi çeşitli biyolojik etkilere sahiptir. Dolayısıyla TNF- α plasental invazyonu ve apopitozu etkileyerek düşüklere de sebep olabilir. Ancak TNF- α ve diğer sitokinlerin invaziv trofoblastlarla ilişkisi tam olarak tanımlanamamıştır (74, 94).

2.8.1. TNF- α ve Oksidatif Stres

Süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türevleri TNF- α ilişkili yolağı etkileyebilir. TNF- α tarafından serbest radikal üretiminin tetiklenmesi konusunda 2 farklı mekanizma bulunmuştur: inflamasyon sırasında fagositik hücrelerin aktivasyonu ve TNF- α 'nın sitotoksik etkisine karşı duyarlı hücrelerde prooksidan türevlerinin oluşması (87,94). TNF- α sitotoksitesinde serbest radikallerin rolünü gösteren bir çalışmada bazı hücre hatlarının bu sitokine karşı in vitro direnç gösterdikleri kanıtlanmıştır. Özellikle Wonk ve arkadaşları birçok tümör hücresinde TNF- α 'nın mangan içeren süperoksit dismutazın (MnSOD) mitokondriyal formunun sentezini tetiklediğini kaydetmişler ve bu etkiyle TNF- α direncinin gelişmesi arasında doğrudan bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (87).

TNF- α çeşitli inflamatuvar olaylarda etkili bir proteindir. İnflamatuvar proteinlerin uyarılmasını düzenleyen olaylardan biri, oksidanlar ve TNF- α etkisiyle NF- κ B uyarılmasıdır (95). ROT ve hücresel redoks durumu NF- κ B'nin aktivasyonunda doğrudan etkili olabilmektedir (95,96). TNF- α , NF- κ B'yi I κ B kinaz yolağı aracılığıyla aktifleştirir (95).

2.8.2. TNF- α ve Apopitoz

Özel “ölüm ligandları” ile başlatılan apopitoz sinyallerinin hücre tarafından algılanmasını sağlayan ölüm reseptörleri hücre yüzey reseptörleridir. Bu reseptörler ligand bağlanmasından hemen sonra ölüm kaspazlarını aktifleştirir ve hücrenin apopitoza gitmesine yol açar. Bu reseptörlerden bazıları TNF- α reseptör geni süper ailesine aittir. Bu reseptöre bağlanan ligandlar da TNF gen süper ailesine ait moleküllerdir. Örneğin TNF- α bazı hücre tiplerinde bir hücre yüzey reseptörü olan TNFR1 aracılığıyla apopitozu tetikler (96).

Birçok sitokinin trofoblast hücreleri üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bazı sitokinler trofoblastların proliferasyonunu tetiklerken bazıları da invaziv fenotip

kazanmalarını sağlayabilir. Endometriyal hücrelerdeki sitokinler özellikle ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinin farklılaşmasında rol oynayabilir. Plasental sitokinlerden TNF- α 'nın çoğu dokuda apoptozu tetiklediği bilinmektedir. Özellikle de desidual dokuda bulunan yüksek miktarda TNF- α 'nın insan trofoblast hücrelerinde apoptozu tetiklediği belirlenmiştir (90,97).

Preeklampside TNF- α seviyelerinin maternal kan ve kordon kanında belirgin şekilde arttığı ve plasentada ekspresyonunun yükseldiği kaydedilmiştir. Sonuç olarak TNF- α gebelik süresince trofoblast hücrelerinin hem invaziv karakterlerini hem de canlılık faaliyetlerini düzenlemede rol oynayabilir (90). TNF reseptörleriyle yapılan çalışmalarda apoptozun daha çok TNFR1 aktifleşmesiyle tetiklendiği görülmüştür (74). Özellikle intraselüler alt birimi ile kaspaz aracılı apoptoz yolağını tetiklediği bilinmektedir (99).

2.8.3. TNF- α ve Preeklampsia

Preeklampside sitokinlerin rolünü araştıran çalışmalarda, sitokinlerin endotelyal hücre karakterleri üzerinde etkili olduğu ve bu sitokinlerden özellikle TNF- α 'nın preeklampsinin patogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir (97).

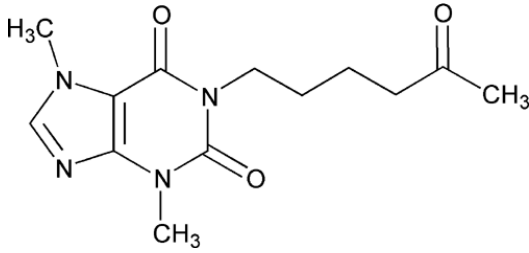
TNF- α seviyelerinin artışı fetal hücrelerde hasara yol açarak plasental yetersizliğe ve apoptoza sebep olabilir. Bu da vasküler dejenerasyona yol açar. Plasental gelişimin ilk evrelerinde ortaya çıkan anormal immün reaksiyonlar sonucunda trofoblast hücrelerinde oluşan hasarın plasental hipoplaziye neden olabileceği bildirilmiştir. Preeklampside trofoblastlar plasental vasküler yatağa tamamiyle invazyon yapamazlar. Spiral arterlere ulaşmayan invazyon sonuçta vazodilasyonu tetiklemez (98). Farklı çalışmalarda TNF- α seviyelerinin preeklampitik kadınlarda normotensif kontrollere oranla yüksek olduğu görülmüştür. Ancak patogenezindeki rolü tam olarak bilinmemektedir (69,97,99).

2.8.4. TNF- α ve Pentoksifilin

Pentoksifilin (PTX), 1-(5-oxohexyl)-3,7 dimethylxanthine olarak bilinir. Kafein ve teofiline benzer özelliklere sahip bir metilksantin türevidir (100). PTX beyaz, kokusuz acı tatlı kristalin bir tozdur. PTX reaktif elektrofilik karbonil grubuna sahip uzun alifatik zincir içerir. PTX gibi metilksantinler fosfodiesteraz enzimlerinin

kompetitif inhibitörleridir (101). PTX'in inflamatuvar araçların kontrolünde immünomodülatör olarak çeşitli rolleri vardır. PTX'in belirli miktarının TNF- α 'nın üretiminde etkili olduğu gösterilmiştir. PTX'in TNF- α 'nın baskılanması aracılığıyla dolaylı bir etkisi bildirilmiştir (102).

PTX'in insan ve hayvan çalışmalarında hücresel seviyelerde çeşitli fizyolojik değişimlere yol açtığı ve TNF- α üretimini inhibe ettiği ve süperoksitlerin salınmasını azalttığı görülmüştür (103,104). PTX iskemik dokularda damarların direncini düşüren ve kan akışını arttıran bir vazodilatör ve antikoagülandır. 1980'lerden beri semptomatik vasküler disfonksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (105,106). PTX'in en önemli etkisi inflamatuvar cevabı baskılamasıdır. PTX, TNF gen transkripsiyonunu, TNF'nin mRNA ekspresyonunu ve TNF proteininin sentezlenmesini baskılar (107,108,109).



Şekil 2.8-1: PTX'in kimyasal yapısı (110).

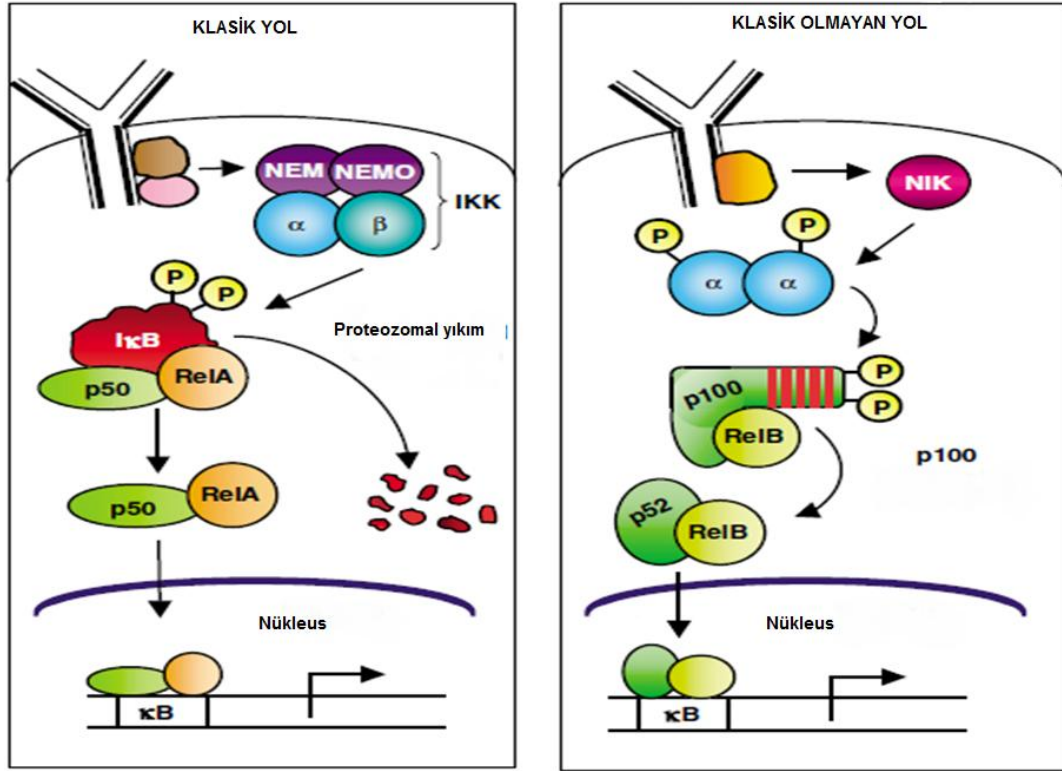
2.9. NÜKLEAR FAKTÖR KAPPA B (NF- κ B)

Nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B) aktivasyonu bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde hücre proliferasyonunda, homeostazda, apoptozda, kanserde ve lenfoid organ gelişiminde merkezi bir role sahiptir. NF- κ B; sitokinler, adhezyon molekülleri ve diğer medyatörlerin transkripsiyonunda merkezi rol oynar. NF- κ B ailesinin hücre içindeki yangısal olaylarla ilişkili ve diğer sinyal yollarının regülasyonunda önemli rolü vardır (111). Omurgalı hücrelerinde bu önemli transkripsiyonel faktör ailesi 2 gruptan oluşur. Bunlar Rel ve NF- κ B proteinleridir. Rel'in üyeleri (RelA, RelB, c-Rel) olgun şekilde üretilirken NF- κ B' nin üyeleri olan p50 ve p52, sırasıyla p105/ NF- κ B1 ve p100/ NF- κ B2' nin öncülleri olarak üretilir (112). Yapısal olarak ilişkili bu proteinler N-uçlarının Rel homoloji alt biriminde (RHD) benzer dizileri paylaşırlar. Bu diziler dimerize olarak nükleusa aktarımlarını ve

κ B bölgeleri olarak adlandırılan özel DNA dizilimlerine bağlanabilmelerini sağlarlar. Ancak sadece RelA, RelB ve cRel'in C-ucunda transkripsiyonel aktivasyon alt birimine sahiptir ve doğrudan transkripsiyonu aktive edebilir. Diğer iki üye p105 ve p100 ise C-uçlarında inhibitör alt birime sahiptir. Bu inhibitör alt birimin proteozomal işlemlerle çıkartılması sonucunda ve p50 ve p52'nin, RelA, RelB veya c-Rel partnerleriyle dimerizasyonu transkripsiyonel aktivatör olarak rol oynayabilir. Ayrıca p50 ve p52'nin homo dimerizasyonu transkripsiyonel olarak inaktif nüklear komplekslere yol açabilir (113,114). Çoğu hücrede NF- κ B kompleksleri I κ B ailesinin inhibitörleriyle ilişkili olarak sitoplazmada inaktif kalırlar.

Sitokinler, lipopolisakkaritler, DNA hasarı ajanları veya virüsler gibi çeşitli uyaranlar klasik NF- κ B yolağını tetikler. Bu yolak özellikle p50-RelA komplekslerinin nüklear transferiyle karakterizedir. p50-RelA'nın sitoplazmik I κ B inhibitörlerinden ayrılması IKK (I κ B kinazın inhibitörü) kompleksinin aktivasyonuna bağlıdır. IKK'lar I κ B moleküllerini fosforile ederek ubiquitinasyonlarına, proteozomal yıkımlarına ve p50-RelA'nın nükleus translokasyonuna yol açar (115).

NF- κ B sinyalleşmesi klasik (kanonikal) veya alternatif ve klasik olmayan (non-kanonikal) yolaklar aracılığıyla gerçekleşir. Klasik yol IKK β ve IKK δ 'ya bağlıyken, alternatif yol p100 öncül proteinin işlenmesine bağlıdır. Bu alternatif yol TNF süperailisi üyelerinin stimülasyonundan sonra NF- κ B aktivasyonunda rol oynar (Şekil 2.9:1) (111).



Şekil 2.9-1: NF-κB'nin klasik ve klasik olmayan sinyal yollarları (111).

Bu yolların her ikisinde de ileri doğru işleyişi düzenleyen adım, bir IKK kompleksinin aktivasyonudur. Bu kompleks katalitik kinaz alt birimlerinden (IKK α ve β) ve yapıya duyarlı bir protein olan NF-κB esansiyel modülatörden (NEMO) oluşur. NF-κB tetikleyici kinaz (NIK) ve IKK-α'nın aktivasyonunu içeren klasik veya klasik olmayan NF-κB yolağı p100'ün post-transkripsiyonel modifikasyonu ile olgun p52 alt birimine dönüştürülmesi ile karakterizedir. IKK-α, p100'ü fosforile ederek ubiquitinasyonuna ve proteozomal yıkımla p52'ye dönüştürülmesine yol açar.

NF-κB ilk olarak B hücrelerinin nükleuslarında tanımlanmış ve bütün hücre tiplerinin sitoplazmalarında inaktif formda bulunduğu gösterilmiştir.

IκB ailesine üye proteinler 5-7 arasında ankrin tekrarlarına sahiptir. Bunlar NF-κB dimerlerinin etkileşimine yol açarak nüklear lokalizasyon sinyallerinin (NLS) en az birinin Rel homoloji alt biriminde maskelenmesi sağlar. Ek olarak IκB α DNA bağlanmasını engeller ve ilgili NF-κB dimerlerinin N-ucunda bulunan nükleus dışına taşıyıcı diziler (nuclear export sequences) aracılığıyla nükleus dışına taşınmasını destekler (116).

Rel-NF- κ B transkripsiyon faktörlerinin apoptozu düzenleyen 3 genel modeli vardır:

- 1) Apoptozu engelleyen veya destekleyen genlerin doğrudan düzenlenmesi
- 2) Hücre siklusunu düzenleyerek bir hücrenin apoptoz sinyallerine duyarlı veya duyarsız hale getirilmesi
- 3) Hücresel proteinlerle etkileşerek hücrenin yaşam dengesinin düzenlenmesidir (116).

Hücre döngüsünde önemli hedef genlerin kontrolüne paralel olarak NF- κ B alt birimlerinin transkripsiyon başlatıcı DNA bölgesine bağlanması, p52/100 işlenmesi ve RelA fosforilasyonu gösterilmiştir. NF- κ B alt birimlerinin ilgili DNA bölgelerindeki değişimlerde koaktivatör/korepresörlerle ilişkili olduğu daha önce gösterilmiştir. NF- κ B komplekslerinin G1, S ve G2 fazlarında özellikle siklin D1, c-Myc ve Skp2 transkripsiyonlarına etki ettiği bildirilmiştir. Bu da hücre döngüsünde NF- κ B hedef genlerinin düzenlenmesinin karmaşık bir seviyede gerçekleştiğini göstermektedir (118).

2.10. APOPTOZ

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, fizyolojik bir hücre yıkım işlemidir. Apoptoz çok hücreli organizmalarda gelişim, homeostazın devamlılığı ve immün savunmada önemli rol oynar. Bu sistemin bozulması kanser, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif rahatsızlıklar ve iskemik hasarlara neden olur (119).

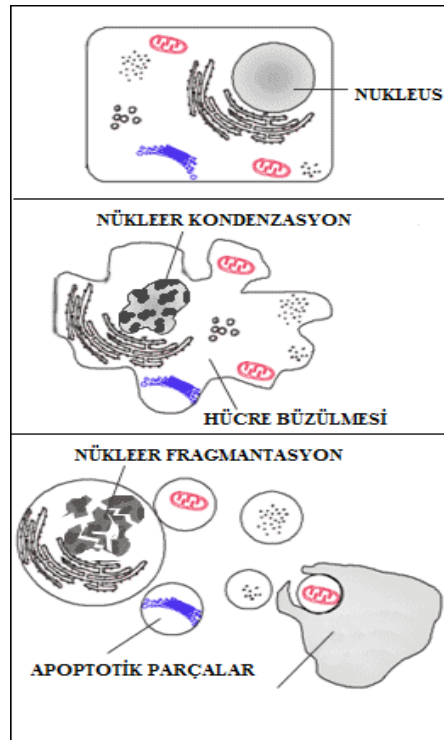
Fazladan olan ve disfonksiyonel hücrelerin yok edilmesi için varolan normal bir fonksiyonu temsil etmektedir. Apoptozis tanımı ilk kez 1972 yılında İskoçyalı Kerr, Wyllie ve Currie isimli patologlar tarafından yapılmıştır. Kerr ve arkadaşları hücre ölümlerini morfolojik olarak takip ederken, ölen hücrelerin parçalandığını ve bu parçaların tekrar membranla kaplanarak daha küçük parçacıklara dönüştüğünü ve bunlarında makrofajlar tarafından fagosite edildiğini görmüşlerdir. Apoptozis Yunanca'da "düşmek" anlamına gelmektedir. Homer tarafından ağaçların sonbahardaki yaprak dökümünü andırdığı için, bu şekilde meydana gelen hücre ölümünü belirtmek amacıyla kullanılmıştır (120,121).

2.10.1. Apoptotik Hücrelerde Gözlenen Morfolojik Değişiklikler

Apoptoza uğrayan hücrede yüzey farklılaşmaları ortadan kalkar ve komşu hücreler ile olan iletişimi kesilir. Apoptotik hücrelerin sitoplazması daha yoğun ve hücre boyutu komşu hücrelere göre daha küçüktür. Kromatin yoğunlaşır ve DNA apoptotik hücrelere özgü merdiven şeklinde bantlaşmalar gösterir. Hücrede yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bu tomurcuklar sitoplazmik parçalar içeren zarla sarılı apoptotik cisimcikleri meydana getirir (122).

Apoptotik hücrelerde gözlenen morfolojik değişimlerin yanı sıra bir dizi biyokimyasal değişikliklerde meydana gelir. Normalde hücre zarının sitoplazmik iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin molekülü membranın dış yüzeyine taşınır. Membranın dış yüzündeki bu molekül fagositik hücreler için sinyal görevi görür (123, 124).

Apoptozun morfolojik bulguları kromatin kondenzasyonunu ve nükleer fragmentasyonunu gösteren 4-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) boyamasıyla mikroskopik olarak incelenebilir. Basit histokimyasal tekniklerle ışık mikroskopik olarak veya özel floresan boyamalarla floresan mikroskopunda veya akış sitometrisi ile incelenebilir (Şekil 2.10:1) (125).



Şekil 2.10-1: Apoptotik hücrelerde gözlenen morfolojik değişiklikler (125).

2.10.2. Apoptozun Moleküler Düzenleyicileri

Apoptozun her basamağı birçok proteinin bir arada çalışmasıyla gerçekleşir. Bu proteinler kaspazlar, Bcl-2 ailesi p53 ve TNF ailesidir. En etkili proteinazlar arasında kaspazlar bulunmaktadır (126).

2.11. KASPAZLAR

Kaspazlar, sistein proteinaz ailesinin üyesidirler. Apoptozda görevli olan 14 farklı kaspaz tanımlanmıştır. Sentezlenmeleri tek polipeptit zincir halinde gerçekleşir ve 3 ana bölgeden oluşurlar; efektör ölüm bölgeleri (death effector: domain DED), kaspaz toplama bölgeleri (Caspase recruitment domain CARD), ve ölüm bölgeleridir (death domain: DD) (126).

Kaspazlar apoptotik proteolitik kaskadlarda pozisyonlarına göre başlatıcı veya efektör (etkileyici) olarak kategorize edilir. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8 - kaspaz 9) efektör kaspazları (kaspaz3) ve proapoptotik faktörleri aktifleştirerek apoptozu başlatır ve çoğaltır. Efektör kaspazlar sitoplazmik bölgeler üzerine etki ederek nukleusta dahil diğer bütün organellerde proteolitik programı başlatır ve hücrenin yıkımı ile sonuçlanır (127,128).

Kaspaz-8 (Flice/MACH/mch5) apoptozun ölüm reseptör yolaklarının prototipik kaspazıdır. TNF- α reseptör süperailisinin üyelerine bağlanarak ligandını aktifleştirir (129,130). Fas/Apo-1, TNF reseptörünün etkileşimi veya TNF- α ile ilişkili apoptozu tetikleyen ligand reseptörü ile ligandların etkileşimi reseptörün ölüm altbirimini sitoplazmik adaptör proteinlerle birleştirir (131). Kaspaz-8 efektör kaspazların doğrudan aktivasyonu hücre ölümüne yol açar ve apoptotik sürecin diğer ana kaskadlarını başlatır. Kaspaz-8 daha önce sitoplazmada aktive olan ve sitoplazmik substratları kesen sitoplazmik bir protein olarak bilinmekteydi. Ancak yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar görüldü. Prokaspaz-8'in ölçülebilir seviyeleri kültüre edilmiş fibroblastlar ve striatal nöronların nukleuslarında gözlemlendi (132). Diğer bir çalışmada aktif kaspaz-8 proteinlerini fazla eksprese eden kültüre edilmiş nöronlarda nukleustaki agregatlara bağlanmalar görüldü (133).

Kaspaz-8 aktivasyonu çok sayıda nörodejeneratif patolojilerde görev alır (133,134,135). Kaspaz-8 inaktif 55 kDa'luk öncülü olarak diğer bütün kaspazlar gibi sitoplazmada bulunur. Belirli kesilme bölgelerinden proteolitik işlemlerle aktifleştirilir.

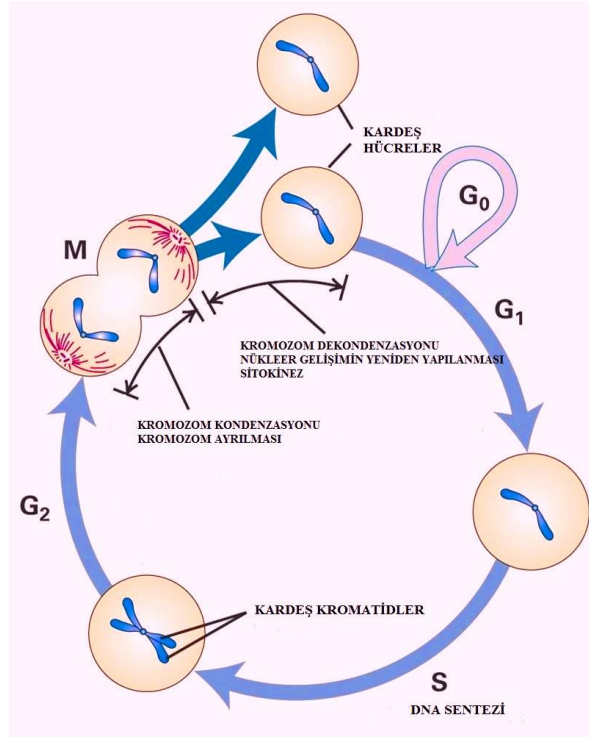
Kaspaz 8 aktif olduğunda başlangıçtaki prokaspaz 8 zimogeni büyük (20kDa) ve küçük (12 kDa) polipeptidlere ayrılır. Bunlarda bir araya gelerek bilinen tüm kaspazlar gibi $\alpha 2 \beta 2$ heterotetramerik yapıyı oluşturur. Kaspaz-8 artık birinci sınıf kaspaz olarak sınıflandırılır. Kaspazların arasındaki en önemli yapısal farklar özgünlüğünü belirleyen yüzey halkalarıdır (136).

Kaspaz-8'in hücrel lokalizasyonunu düzenleyen mekanizmalar hala bilinmemektedir. Kaspaz 8 iki adet N-uçlu ölüm efektör birimi (DED) ve bir adet C uçlu proteaz birimine sahiptir. C uçlu birimin iki alt birimi p18 ve p10'dur. Kaspaz-8 in aktivasyonu DED bölgeleri ile FADD veya FLIP gibi özel adaptör proteinler arasındaki homotipik etkileşime bağlıdır. Bu etkileşim kaspaz-8'in homodimerizasyonunu tetikleyerek C-uçlu proteaz biriminin ileri aktivasyonu için gerekli olan değişimlere sebep olur (137,138). Kaspaz aktivitesinin apoptozla sınırlı olmadığı apoptotik olmayan fonksiyonlara da sahip olduğu yeni çalışmalarla gösterilmiştir. Bu fonksiyonlar arasında inflamatuvar süreçlerin düzenlenmesi, lenfosit proliferasyonu, hücre göçü ve hücre farklılaşması yer alır. Özellikle kaspaz-8 insan trofoblast farklılaşmasında önemli bir role sahiptir (139). Bodey ve arkadaşlarının glioblastoma tümör hücrelerinde farklı kaspazlarla yaptıkları bir çalışmada apoptotik hücrelerde kaspaz-8'in sitoplazmadan hücre nukleusuna geçtiği bildirilmiştir (140).

2.12. HÜCRE PROLİFERASYONU

2.12.1. Hücre Siklusu

Ökaryotik canlılarda, iki yavru hücre meydana getirmek üzere birbirini izleyen iki mitoz bölünme arasında geçen süreye mitotik siklus veya hücre siklusu denir (Şekil 2.12-1) (141).



Şekil 2.12-1: Hücre siklusu (141).

Bu süreç iki aşamaya ayrılır:

1. İnterfaz
2. Mitoz (M Fazı)

İnterfaz da 3 evreye ayrılır:

1. G₁ (Sentez öncesi)
2. S (DNA sentezi)
3. G₂ (DNA eslenmesi sonrası)

G₁ evresi; Yaklaşık olarak 12 saat sürer. Bu yüzden siklusun en uzun fazı olarak kabul edilir (141). RNA ve protein sentezinin olduğu evredir. Sentezlenen bu proteinlerden bazılarının görevi; hücre döngüsünü kontrol etmek, hücre hacmini mitozdan sonra

yarıya indirerek normal büyüklüğüne ulaştırmaktır. Ayrıca bu fazda DNA sentezi için gereken birçok enzim de üretilir (141,142).

S evresi; DNA sentezi ve sentrozom eşlenmesinin başlamasıyla özellik kazanır (142). Sentez fazında replikasyon ile hücre içindeki DNA'nın miktarı ikiye çıkar. Böylelikle mitozu girmeden önce ikiye bölünecek olan hücrede iki katı kromozom elde edilmiş olur (141). S evresi tamamlanmadıkça M evresine geçiş gerçekleşmez ve böylece organizmanın genom bütünlüğü korunmuş olur (143) .

G1 evresindeki hücreler ya DNA çoğalması için S fazına girerler ya da girmezler. S fazına girmeyen hücre G0 (G sıfır) fazı denen dinlenme dönemine girer. Hücreler bu evrede döngüye girmeden önce günlerce, aylarca, hatta yıllarca kalabilir (45).

G2 evresi; bu faz boyunca DNA sentezi durur RNA ve protein sentezi sürmektedir (141,143).

M evresi: Genetik içeriği aynı iki yeni kardeş hücrenin meydana geldiği evredir. Bir evreden bir diğerine geçiş hücre siklusu kontrol noktaları aracılığıyla gerçekleşir (143). Hücre S fazına girmeden önce G1 kontrol noktasında durdurulur. Eğer DNA hasarı meydana gelmişse hasar tamir edilir. Memeli hücrelerinde G1 kontrol noktasında durdurma, “p53” denilen protein aracılığıyla gerçekleşir. İnsana özgü kanserlerde P53 proteinini kodlayan gende mutasyona sıklıkla rastlanmaktadır. Bunun sonucunda hücrenin DNA hasarını tamir etme yeteneği azalır. Hasarlı DNA'nın kalıtımla yavru hücrelere geçmesi, değişimlerin hızla çoğalmasına ve genomun kararsızlığına; bu da, kanser gelişmesine neden olur (142).

Hücre siklusu siklinler (cyc), siklin bağımlı kinazlar (cdk) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) tarafından kontrol edilirler. Bu proteinlerin düzeyleri hücre siklusunun farklı fazlarında farklılık gösterebilir (144).

2.13. HÜCRE PROLİFERASYONUNUN GÖSTERİLMESİ

2.13.1. PCNA Ekspresyonu

Prolifere hücre çekirdek antijeni (PCNA) bir hücrenin yaşamından ya da ölümünden sorumlu olan temel moleküllerden biridir (145). Evrim süreci boyunca iyi korunmuş 36 Kd ağırlığında asidik nükleer bir protein olup hücre replikasyonunda ve DNA onarımında rol alır (146). PCNA halka şeklinde bir proteindir (145). PCNA' nın S fazında çekirdekteki dağılımı DNA sentezine ya da bu olaylara bağlı olarak değişir

(147). PCNA başlangıçta bir siklin olarak tanımlanmış ve hücre döngüsünde yüksek seviyelerde eksprese edildiği görülmüştür (148). PCNA ekspresyonunun hücre siklusunun G1 fazının son % 5'lik kısmında ve S fazının ilk % 35'lik kısmında meydana geldiği görülmüştür. Çeşitli siklin gen dizileri keşfedildikçe PCNA'nın siklin proteinleriyle ne yapısal ne de evrimsel olarak ilişkide olmadığı belirlenmiştir (150).

PCNA major DNA replikasyonunda ve hücre tamir mekanizmasında görev alan bir proteindir (150,151). 1985'te keşfedildiğinden beri birçok çalışmada kullanılmış ve çeşitli ekspresyon modelleri elde edilmiştir. Hücrelerin yaşam ve ölümünde çeşitli fonksiyonlara sahiptir. DNA replikasyonu dışında genelde p53'ün kontrolü altında hücre siklusunun duraksamasına ve DNA hasarının giderilmesine yol açar. DNA hasarı giderilemediğinde PCNA seviyelerinin düşük veya hiç olmaması hücrenin apoptoza gitmesine yol açar (192).

2.14. JAR HÜCRE SOYU

JAR hücre soyu 1971 yılında Pattillo ve arkadaşları tarafından elde edilmiş olup günümüzde tercih edilen in vitro modellerinden birini oluşturmaktadır (27,28,29).

Koryokarsinom kaynaklı JAR hücre hattı oldukça invaziv trofoblastlardan meydana gelir. Bu invazyon yeteneği salgıladıkları ekstraselüler proteazlardan kaynaklanır. Bunlar arasında matriks metalloproteinazlar bulunur. Bazı çalışmalarda JAR hücre hatlarının birinci trimesterdeki trofoblastlara benzedikleri ve dolayısıyla erken invaziv trofoblast düzenlenmesinin incelenmesi için iyi bir model oluşturduğu belirtilmiştir (153,154).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız in vitro koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doku ve Hücre Kültürü, Işık, İmmünohistokimya ve Western Blot laboratuvarlarında Kasım 2012 - Temmuz 2013 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Alet ve Teçhizat

İnce ve kalın uçlu pens
1-10 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
10-100 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
100-1000 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
Hücre kültür kapları (Bio Fil)
Eppendorf tüpü (Tks-Web)
Dondurma tüpü (Thermo Scientific)
Dibi konik santrifüj tüpü (BD Falcon)
Lam (Marienfeld)
Yuvarlak lamel (Marienfeld)

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

DMEM (Hy Clone)
L-Glutamin (Hy Clone)
Penisilin+Streptomisin (Hy Clone)
Vasoplan (Mustafa Nevzat)
Fetal Sığır Serum (Hy Clone)
Anti-PCNA antikoru (Thermo Scientific)
Anti-NF-κB antikoru (Abcam)
Anti-Kaspaz 8 antikoru (Thermo Scientific)
TNF alpha Recombinant Protein (Thermo Scientific)
Aminoetilkarbazol (Thermo Scientific)
Metanol (Merck)

Hidrojen peroksit (Merck)
İzopropil alkol (Merck)
Trypsin EDTA (Hy Clone)
Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck)
PBS (Thermo Scientific)
Glycerol (Merck)
Tris Base (Sigma)
Non-fat Dry Milk (Lab Scientific)
Tween 20 (Sigma)
SDS (Thermo Scientific)
DAPI (Vector)
Nitroselüloz membran (Thermo Scientific)
Filtre kağıdı (Thermo Scientific)
8%, Protein Jel (Thermo Scientific)
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Peroxidase Conjugated (Thermo Scientific)
Mounting Medium (Thermo Scientific)
Mercaptoethanol (Sigma)
Formaldehit (Merck)
Hematoksilen-Eozin (Sigma)

3.1.3. Cihazlar

İnkübatör (Thermo Scientific, Heracell 150i)
Ters (İnvert) mikroskop (Olympus IX71)
Su banyosu (Fischer Scientific)
Sıvı azot tankı (Thermo Scientific)
Santrifüj (Sonic Ruptor 250)
Derin dondurucu (Regal)
Buzdolabı (Gorenje)
Manyetik karıştırıcı (IKA Rct Basic)
Elektrikli pipet pompası (Ratiolab)
Hassas terazi (Sartorius)
pH metre (İnolab)
Vortex mixer (Uzuio VTX 3000L)

Olympus BX61 mikroskop
Olympus DP72 kamera

3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Araştırmada ATCC'den sağlanan JAR hücre soyu kullanıldı. JAR hücreleri için besiyeri ortamı olarak; inaktive edilmiş % 10 fetal sığır serumu (FBS), penisilin ve streptomisin (100 µg/ml) içeren yüksek glikozlu DMEM kullanıldı (Dulbeco'nun modifiye edilmiş Eagle medyumudur).

Hücreler bu besiyeri ortamını içeren 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda, iç ortamı %5 CO₂, %95 hava karışımı ve nem içeren, 37 °C'lik inkübatör içinde büyütüldü. İnvert mikroskopta incelenen ve konfluent aşamaya ulaşan hücreler haftada 2 kez tripsinle pasaj yapılarak üretildi.

Hücreler immünohistokimyasal incelemeler ve sitokimyasal boyamalar için lameller üzerine ekildi. Lamellere ekilen hücreler 24 saat kültüre edildi. 24 saat sonrasında oluşturulan deney gruplarına seçilen doz ve zamanlarda TNF-α ve PTX uygulaması gerçekleştirildi. Kontrol gruplarının normal besiyeri içerisinde kültürü devam ettirildi.

Westren blot analizi yapılacak hücreler pasajlama sonrası yuvarlak petrilere ekildi. 24 saat kültüre edildikten sonra doz ve zamana bağlı deneyler gerçekleştirildi.

Hücelere ait tüm işlemler laminar akım kabini içerisinde, hücrelerin incelenmesi invert mikroskop altında, malzeme sterilizasyonları otoklavda, yedek hücrelerin depolanması için -80 °C'lik derin dondurucu ve -186 °C'lik sıvı azot tankı, malzemelerin saklanması için ise +4°C ve -20°C'lik soğutucular kullanıldı.

3.2.1. Doz ve Zaman Belirleme Deneyleri

Deneylerde, kontrol grubu hücreleri normal besiyeri içerisinde tutuldu. Çalışmamızın başlangıcında doz belirleme deneyleri literatüre bağlı olarak TNF-α'nın 10⁻⁴-1 nM (155) ve 10 ng (156,157) doz aralıklarında uygulanmasıyla gerçekleştirildi. Farklı hücre soylarında bildirilen TNF-α dozlarında JAR hücrelerinde beklenen etkinin görülmemesi nedeniyle literatürde kullanılan en yüksek dozlardan biri olan 100 ng/ml (158,159) TNF-α konsantrasyonu deney dozu olarak seçildi. PTX'in etkin dozuna ait

literatürde az sayıda in vitro çalışma mevcuttur (160,161). Çalışma gruplarımızda PTX dozları 1, 10, 20 mM olarak belirlenmiştir.

TNF- α uygulamasının NF- κ B ifadesi üzerine zamana bağlı etkileri literatürler dikkate alınarak yapılan ön deneyler sonucunda, 1 saat, 6 saat, 12 ve 24 saat olarak belirlendi (23,162).

PTX' in seçilen dozlarının zamana bağlı etkisi TNF- α 'nın NF- κ B düzeylerinde en etkili olduğu 1 saatlik zaman diliminde incelendi.

Apopitotik incelemelerle ilişkili olarak kaspaz-8 düzeylerindeki değişiklikler 1, 6, 12 ve 24 (163,164,165) saatlik zaman dilimlerinde incelendi. Apoptoza ilişkin morfolojik değişiklikleri değerlendirmek için 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boyaması kontrol ve 24 saatlik gruplarda uygulandı.

Hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi için 6, 12 ve 24 saatlik deney grupları oluşturuldu (166).

3.3. İMMÜNOSİTOKİMYA YÖNTEMLERİ

3.3.1. NF- κ B, Kaspaz-8 ve PCNA İmmünohistokimyası

Primer antikolar ile yapılan immünohistokimyasal incelemeler için lameller üzerine ekilmiş olan hücreler -20°C'de metanol ile fikse edildi. Spesifik olmayan boyanmaları engellemek için 10 dakika süreyle non-immün serumla bloklama işlemi yapıldı. Bu işlem sonrasında 1/200 dilüsyonda hazırlanan anti-NF- κ B monoklonal primer antikor, 1/200 dilüsyonda hazırlanan anti-kaspaz-8 monoklonal primer antikor ve 1/2000 dilüsyonda hazırlanan anti- PCNA monoklonal primer antikor +4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Takiben biyotinle işaretli sekonder antikor 20 dakika süre ile uygulandı. PBS yıkamalarının ardından streptavidin enzim konjugatıyla 20 dakika inkübasyon yapıldı. Tekrar eden PBS yıkamaları sonrasında amino etil karbazol (AEC) kromojeni uygulandı. Spesifik renk reaksiyonu oluşumu invert mikroskopta yapılan incelemelerle gözlemlendi. PCNA işaretlemeleri sonrası hematoksilin (H) zıt boyaması yapıldı. Kromojenin uzaklaştırılması ve PBS eklenmesiyle reaksiyon sonlandırıldıktan sonra su bazlı kapatma solüsyonuyla örnekler kapatıldı.

3.3.2. İmmünohistokimyasal Analiz

İmmünohistokimyasal analiz BX61 fotomikroskopta gerçekleştirildi. İmmünreaktivitenin yoğunluğu H-SCORE analizi kullanılarak yarı nicel bir şekilde değerlendirildi. İmmün reaksiyonların yoğunluğu kategorilere ayrıldı: 0 (boyanma yok), 1 (zayıf), 2 (orta dereceli boyanma) ve 3 (yoğun boyanma). Her örnekten, HSCORE = $\sum i \cdot P_i$ (i , yoğunluk derecesini; P_i de hücrelerin yüzdesini ifade etmektedir) olacak şekilde bir HSCORE değeri elde edildi (167). Her slayt için X40 objektif kullanılarak 5 farklı alan incelendi. PCNA ile işaretli hücrelerin tüm hücrelere oranı alınarak proliferasyon indeksi saptandı.

3.4. HÜCRE ÖLÜMÜNÜN DAPI BOYANMASI İLE GÖSTERİLMESİ

Lameller üzerine ekilen ve 24 saat 100 ng TNF- α ile inkübe edilen hücreler, 24 saatin sonunda % 4'lük paraformaldehitte fikse edilip ardından iki kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. Hücrelerin apoptotik indeksinin saptanması için DAPI floresan boyası uygulanmıştır. 1 saat karanlık ortamda, oda ısısında DAPI boyası ile lameller kapatılmıştır. Nukleusun morfolojik apoptoz kriterleri (kondensasyon, yarım ay görünümü, fragmentasyon) floresan mikroskopta değerlendirilmiştir. Apoptotik indeks, apoptotik hücrelerin tüm hücrelere oranıyla elde edilmiştir.

3.5. WESTERN BLOT ANALİZİ

Çalışma gruplarına ait petrilere ekimi yapılan ve 24 saat kültüre edilen hücreler inkübatörden alınarak üzerlerindeki besi ortamı uzaklaştırıldı. Daha sonra, soğuk PBS ile yıkandı. Hücreler buz içeren bir kabın üzerine alındı, 35 mm'lik kültür kaplarına 100 μ l yükleme tamponu eklenerek kazıyıcı yardımıyla hücrelerin lizisi sağlandı. Elde edilen hücre lizatı buz üzerinde bekleyen bir eppendorf tüpe aktarıldı. Tüpler, 10.000 rpm'de +4°C'de 10 dk çevrildi. Süpernatant alınıp eppendorf tüplere koyuldu ve kullanılacağı zamana kadar -20°C'de saklandı. Deney öncesinde örnekler buz üzerine alınarak yavaşça çözünmesi sağlandı. Çözünen örnekler 95°C'de 5 dakika süre ile denatüre edildi. Deney gruplarına ait hücre lizatlarının her birinden 20 μ l alınarak elektroforez tankına yerleştirilen %8'lik poliakrilamid jeller üzerindeki kuyucuklara eşit miktarda yükleme yapıldı. Kuyucukların birine moleküler ağırlıkları gösteren belirteç

yüklendi. Örnekler, belli bir seviyeye kadar 100 V'luk akımda yürütüldü ve daha sonra 80V'a düşürülerek yaklaşık 1- 1,5 saat elektroforez işlemine devam edildi. Elektroforez sonrası jel plakalardan ayrıldı ve transfer sistemine alınarak nitrosellüloz membrana 32 mA'de bir gece transfer edildi. Transfer sonrası, membran %5 bovine serum albumin (BSA) içeren bloklama solüsyonu içerisinde 1 saat oda ısısında bekletildi. Bloklama aşamasından sonra, 1/1000 dilüsyon oranında hazırlanan, %2 BSA içeren primer antikorlar ile bir gece +4°C'de inkübe edildi. Primer antikor aşamasını takiben membran üç defa 10 dakika tween-fosfat tamponu çözeltisi (T-PBS) ile oda ısısında yıkandı. Böylece zayıf bağlanan veya bağlanmamış antikorlar ortamdan uzaklaştırıldı. Yıkama aşamalarından sonra, T-PBS içerisinde 1/5000 dilüsyon ile hazırlanan peroksidaz işaretli anti-rabbit sekonder antikor içerisinde 1 saat oda ısısında bekletildi. Sekonder antikor aşamasından sonra üç defa 10 dakika T-PBS ile yıkama tekrarlandı. Yıkama aşamalarından sonra da 1:1000 dilüsyon ile hazırlanan peroksidaz işaretli kontrol protein antikoru β -aktin 1 saat oda ısısında bekletildi. Üç kez 10 dakika T-PBS ile membran yıkandı. Protein bantlarının görüntülenmesi aşaması amino etil karbazol (AEC) kromojeni uygulanmasıyla gerçekleştirildi. Membran üzerindeki bantların görüntüsü fotoğraflandı.

3.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel değerlendirmeler Sigma Plot 12. 0 programı ile yapıldı. Tüm testlerde $P<0,05$ durumu sayısal olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım gösteren verilerde çoklu analiz One Way ANOVA testi kullanıldı. Holm Sidak metodu kullanılarak $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi. İkili gruplar ise Student t-testi ile değerlendirildi. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterildi.

4. BULGULAR

4.1. TNF- α DOZ VE ZAMAN BELİRLEME DENEYLERİ

Veri taramasında JAR hücrelerinde daha önce TNF- α ile yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızın başlangıcında TNF- α 'nın doz belirleme deneyleri diğer hücre soyları için belirlenen 10^{-4} - 1 nM ve 10 ng doz aralıklarında uygulandığında bu doz aralıklarında JAR hücrelerinde NF- κ B aracılı yolda bir etki görülmedi. İkinci konsantrasyon çalışmasında 100 ng, 250 ng, 500 ng, 750 ng ve 1000 ng TNF- α dozları denendi ve sonuçta literatürlere paralel olarak 100 ng TNF- α dozu uygun doz olarak belirlendi. Deney aşamasına bu dozla devam edildi ve zaman belirleme çalışmalarına geçildi.

100 ng TNF- α uygulamasının inkübasyon süresini belirlemek için diğer hücre soylarında uygulanan süreler dikkate alındı ve JAR hücre soyu için 1, 6, 12 ve 24 saat TNF- α uygulaması seçildi. Tüm TNF- α deney çalışmaları bu saatlere paralel olarak yapıldı. Sadece proliferasyonun immunositokimyasal çalışmasında PCNA ifadesinin belirlenmesi aşamasında 6, 12 ve 24 saat TNF- α uygulandı.

4.2. İMMÜNOSİTOKİMYASAL NF- κ B İMMÜNREAKTİVİTESİ

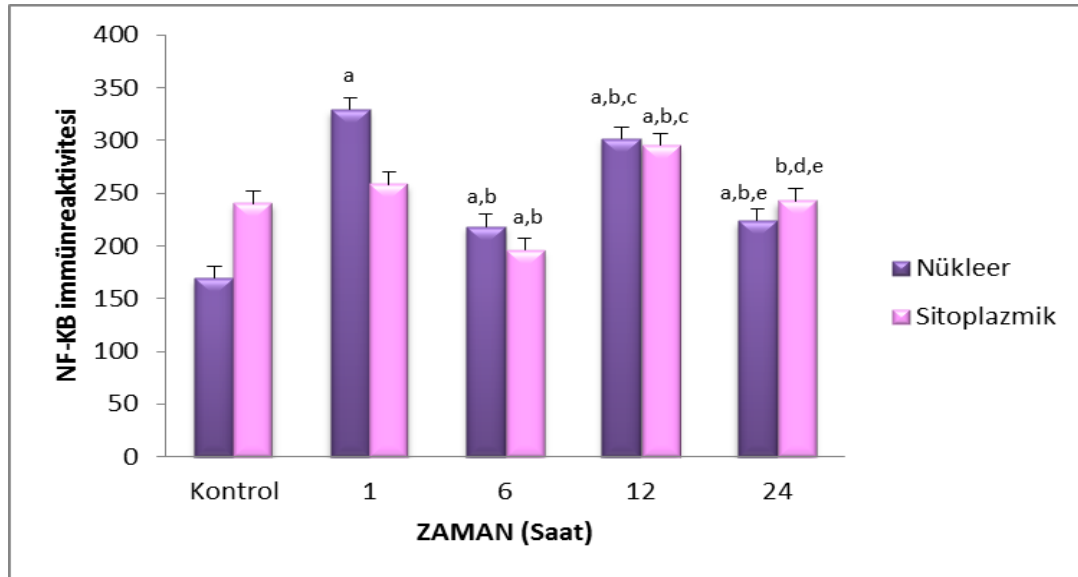
JAR hücre soyunda NF- κ B aktivitesi, anti-NF- κ B primer antikor ile yapılan immunositokimya ile belirlendi. Negatif kontrol örneğinde primer antikor basamağı uygulanmadı (Şekil 4.2-3). Deney gruplarında 100 ng TNF- α JAR hücrelerinde NF- κ B immünreaktivitesi sitoplazmik ve nükleer lokalizasyonda izlendi (Şekil 4.2-1, 4.2-3, 4.2-4, 4.2-5, 4.2-6, 4.2-7). İmmünreaktivite yoğunluğu H-SCORE analizi yapılarak sitoplazmik ve nükleer olarak değerlendirildi (Tablo 4.2-1). Kontrol grubu JAR hücrelerinde belirli bir düzeyde nükleer ve sitoplazmik NF- κ B ekspresyonu izlendi (Şekil 4.2-3). TNF- α uygulanan tüm deney gruplarında nükleer ve sitoplazmik NF- κ B ekspresyon düzeyleri kontrol grubu hücreleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlendi ($P < 0.05$) (Şekil 4.2-1).

Ancak 24 saat TNF- α uygulanan deney grubunda kontrol grubuna kıyasla sitoplazmik reaksiyonda anlamlı bir fark görülmedi ($P > 0.05$), (Şekil 4.2-1).

Deney grupları arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalar sonucunda 1-6 saatler, 1-12 saatler, 1-24 saatler ve 6-12 saatler arasında sitoplazmik ve nükleer ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar izlendi ($P<0.05$), (Şekil 4.2-1). Ancak 6-24 saatler arasında sitoplazmik skor değerlendirmesinde istatistiksel olarak anlamlılık varken ($P<0.05$), nükleer olarak anlamlı bir fark görülemedi ($P>0.05$), (Şekil 4.2-1). 12 saatlik deney grubu 24 saatlik grup ile karşılaştırıldığında nükleer ve sitoplazmik değerler anlamlı bulundu ($P<0.05$), (Şekil 4.2-1).

HSCORE NF- κ B İmmünohistokimyası		
	NÜKLEER	SİTOPLAZMİK
GRUP	ORTALAMA $\pm$ SS	ORTALAMA $\pm$ SS
KONTROL	169,17 $\pm$ 6,92	240,33 $\pm$ 9,27
1 Saat	328,94 $\pm$ 6,71 ^a	258,21 $\pm$ 4,49 ^a
6 Saat	218,57 $\pm$ 8,58 ^{a,b}	195,90 $\pm$ 10,66 ^{a,b}
12 Saat	301,95 $\pm$ 11,02 ^{a,b,c}	295,01 $\pm$ 11,47 ^{a,b,c}
24 Saat	223,65 $\pm$ 7,06 ^{a,b,e}	242,29 $\pm$ 7,46 ^{b,d,e}

Tablo 4.2-1: Kontrol ve deney gruplarına ait NF- κ B immünreaktivitesinin nükleer ve sitoplazmik ortalama ve standart sapmasını gösteren tablo.

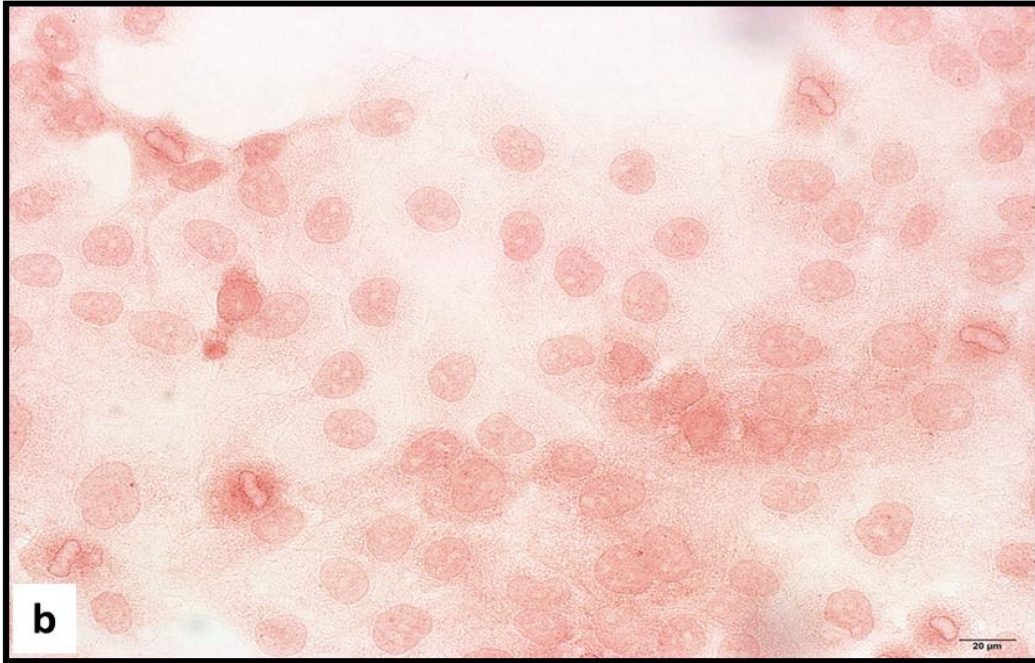


Şekil 4.2-1: Tüm deney gruplarında NF- κ B immünreaktivite sonuçları

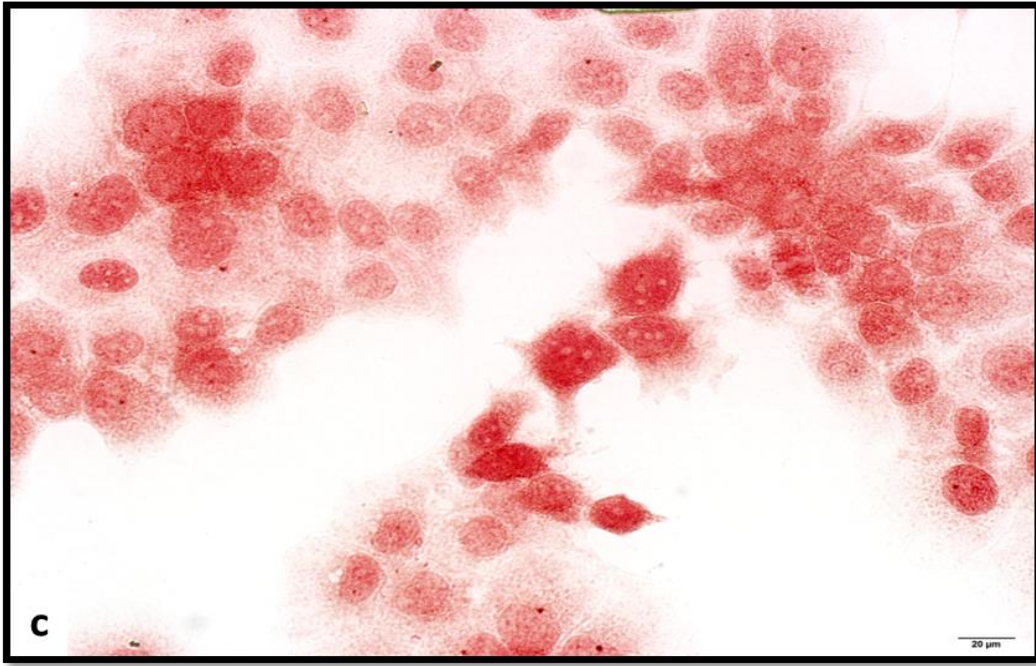
$P^a < 0,05$ kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında nükleer ve sitoplazmik değerler. $P^b < 0,05$ 1 saatlik deney grubunun 6, 12, 24 saatlik gruplarla ikili karşılaştırmalarına ait nükleer ve sitoplazmik değerler. $P^c < 0,05$ 6 saatlik deney grubunun 12 saatlik grup ile ikili karşılaştırılmasına ait nükleer ve sitoplazmik değerleri. $P^d < 0,05$ 6 saatlik deney grubu 24 saatlik grup ile karşılaştırıldığında sitoplazmik skor değerleri. $P^e < 0,05$ 12 saatlik deney grubu 24 saatlik grup ile karşılaştırıldığında nükleer ve sitoplazmik değerleri.



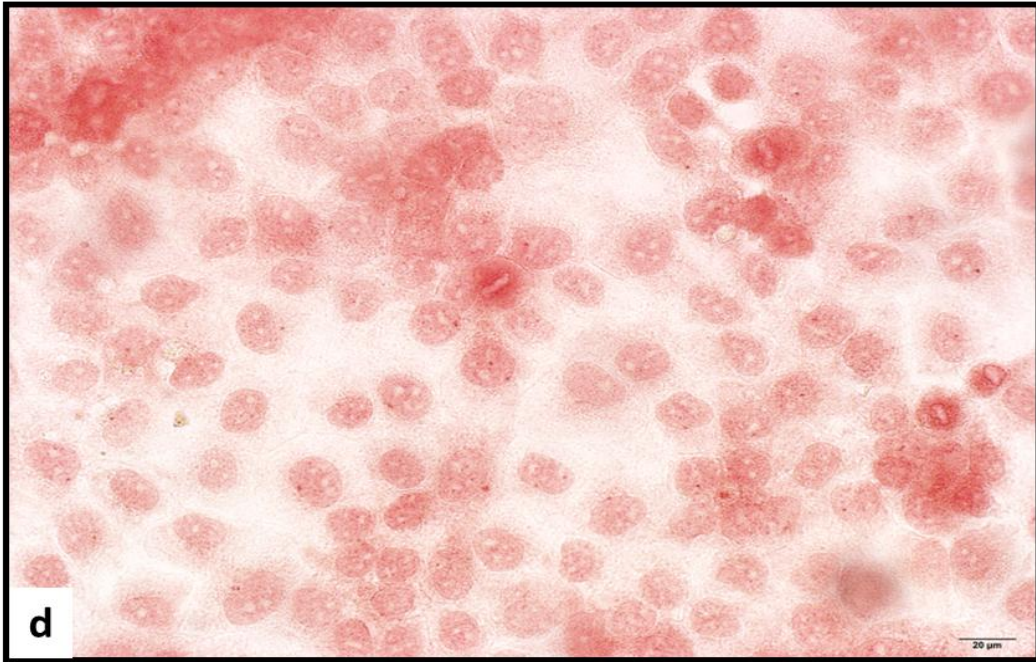
Şekil 4.2-2: NF-κB immünreaktivitesi için negatif kontrol örneği (X40).



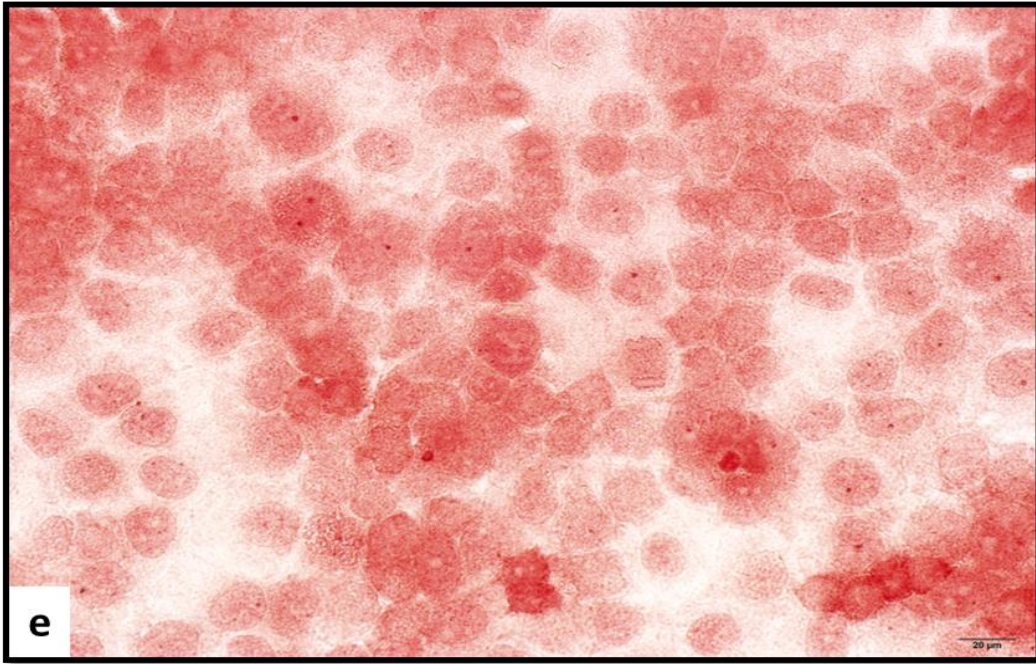
Şekil 4.2-3: JAR hücrelerinde kontrol grubuna ait sitoplazmik ve nükleer NF-κB immünreaktivitesi (X40).



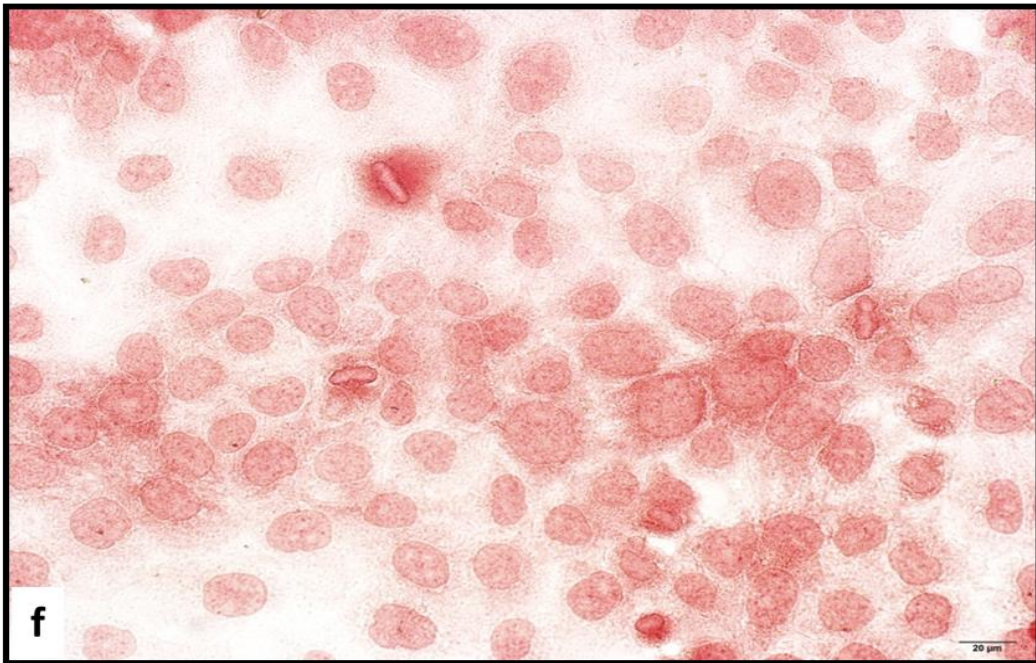
Şekil 4.2-4: 1 saatlik TNF- α uygulaması sonucunda sitoplazmik ve nükleer NF- κ B immünreaktivitesi (X40).



Şekil 4.2-5: 6 saatlik TNF- α uygulaması sonucunda sitoplazmik ve nükleer NF- κ B immünreaktivitesi (X40).



Şekil 4.2-6: 12 saatlik TNF- α uygulaması sonucunda sitoplazmik ve nükleer NF- κ B immünreaktivitesi (X40).



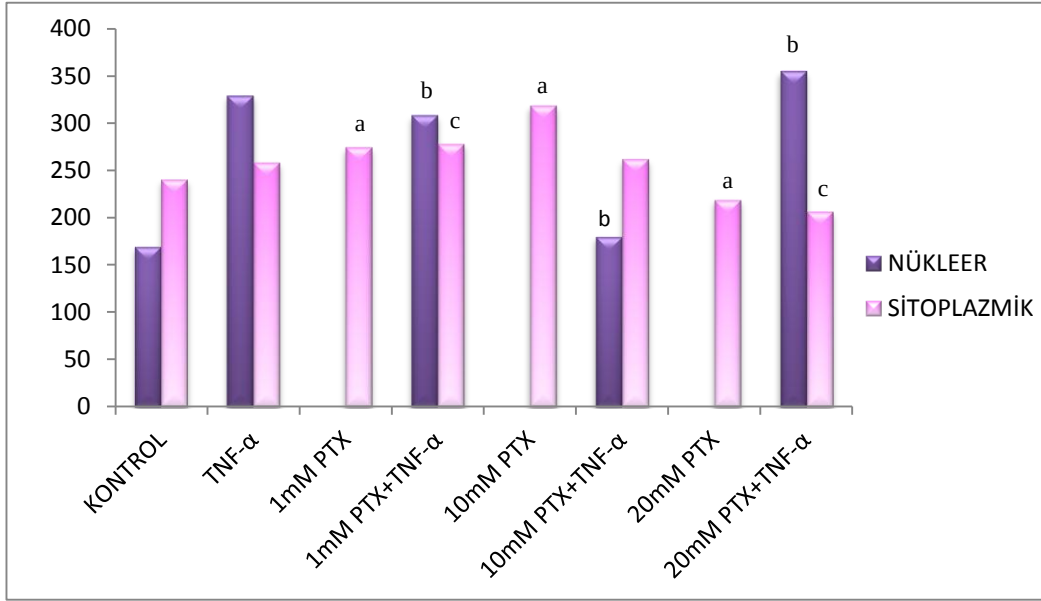
Şekil 4.2-7: 24 saatlik TNF- α uygulaması sonucunda sitoplazmik ve nükleer NF- κ B immünreaktivitesi (X40).

4.3. NF- κ B/PTX İMMÜNREAKTİVİTESİ

JAR hücre soyunda TNF- α inhibitörü olan PTX'in etkilerini saptamak için, TNF- α ile PTX'in bir arada uygulandığı, yalnızca PTX uygulanan ve hiç bir uygulama yapılmayan kontrol deney gruplarında, NF- κ B immünreaktivitesi incelenerek karşılaştırıldı. Negatif kontrol örneğinde ise primer antikor basamağı uygulanmadı (Şekil 4.3-2). Deney gruplarına 100 ng TNF- α ve 1, 10, 20 mM PTX uygulandı. TNF- α ve PTX uygulanan deney gruplarında NF- κ B immünreaktivitesi sitoplazmik ve nükleer lokalizasyonda izlendi (Şekil 4.3-1, 4.3-4, 4.3-6 ve 4.3-8). Sadece PTX uygulanan grupta ise nükleer aktivite görülmedi, immünreaktivite sitoplazmik olarak izlendi (Şekil 4.3-1, 4.3-3, 4.3-5 ve 4.3-7). İmmünreaktiviteler JAR hücrelerinde H-SCORE ile sitoplazmik ve nükleer olarak değerlendirildi (Tablo 4.3-1). Kontrol ile 1, 10, 20 mM PTX grupları karşılaştırıldığında nükleer ve sitoplazmik değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($P<0,05$), (Şekil 4.3-1, 4.3-3, 4.3-5, 4.3-7). TNF- α ile 1, 10, 20 mM PTX+TNF- α grupları karşılaştırıldığında nükleer immünreaktivite değerleri arasında anlamlı fark bulundu ($P<0,05$), (Şekil 4.3-1, 4.3-4, 4.3-6, 4.3-8). Sitoplazmik olarak yapılan karşılaştırmada TNF- α ile 1 mM ve 20 mM PTX+TNF- α grupları anlamlı bulunurken ($P<0,05$), (Şekil 4.3-1, 4.3-4, 4.3-8) TNF- α ile 10 mM PTX+TNF- α grubu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P>0,05$), (Şekil 4.3-1, şekil 4.3-6).

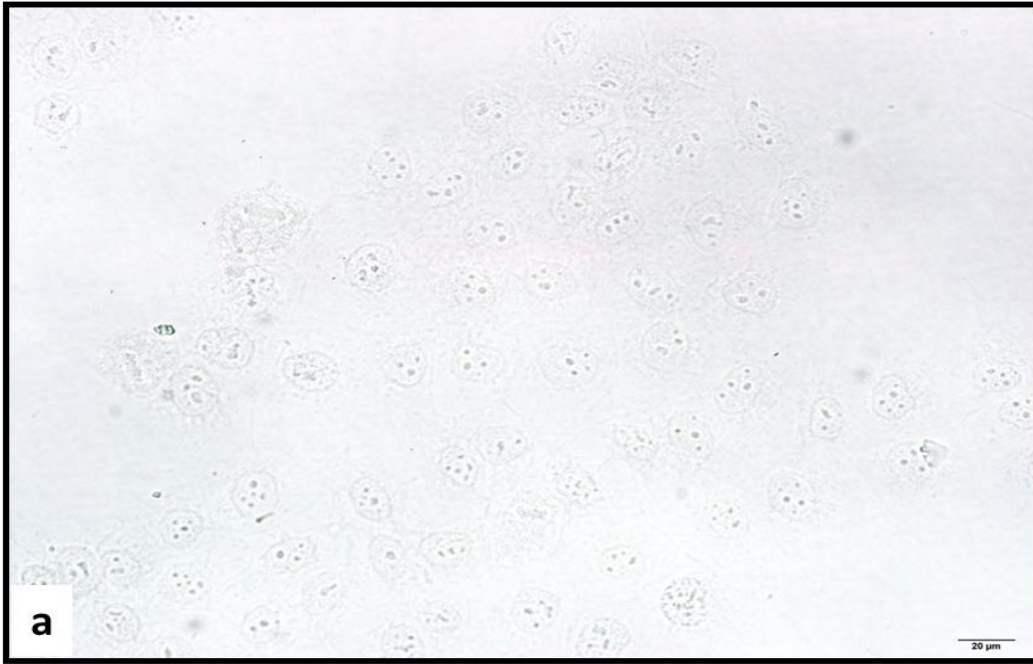
HSCORE NF- κ B/PTX İmmünohistokimyası		
	NÜKLEER	SİTOPLAZMİK
GRUP	ORTALAMA $\pm$ SS	ORTALAMA $\pm$ SS
KONTROL	169,17 $\pm$ 6,92	240,33 $\pm$ 9,27
TNF- α	328,94 $\pm$ 6,71	258,21 $\pm$ 4,49
1mM PTX	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	274,50 $\pm$ 14,45 ^a
1Mm PTX+TNF- α	308,45 $\pm$ 10,25 ^b	278,00 $\pm$ 7,32 ^c
10mM PTX	0,000 $\pm$ 0,000 ^a	318,59 $\pm$ 7,56 ^a
10mM PTX+TNF- α	179,66 $\pm$ 10,02 ^b	261,92 $\pm$ 12,64
20mM PTX	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	218,86 $\pm$ 7,30 ^a
20mM PTX+TNF- α	354,94 $\pm$ 9,45 ^b	206,60 $\pm$ 19,55 ^c

Tablo 4.3-1: Kontrol ve deney gruplarına ait PTX ve PTX+TNF- α 'nın 1, 10, 20 mM PTX doz aralıklarında nükleer ve sitoplazmik NF- κ B immünreaktivitesinin ortalama ve standart sapmasını gösteren tablo.

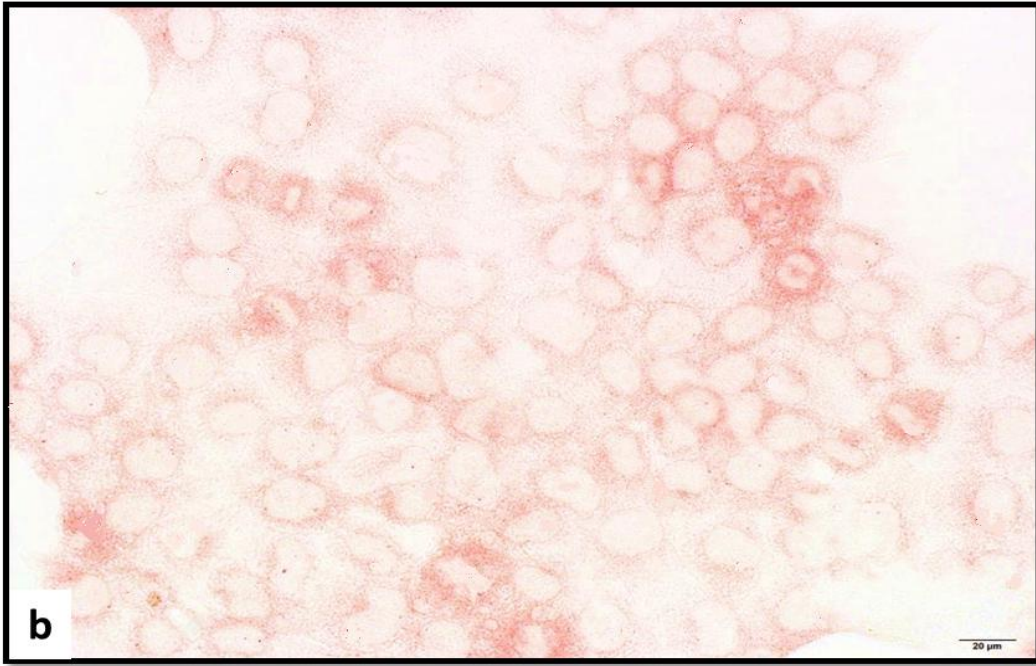


Şekil 4.3-1: 1, 10, 20 mM PTX uygulanan hücrelerde NF-κB nükleer ve sitoplazmik immünreaktivitesi.

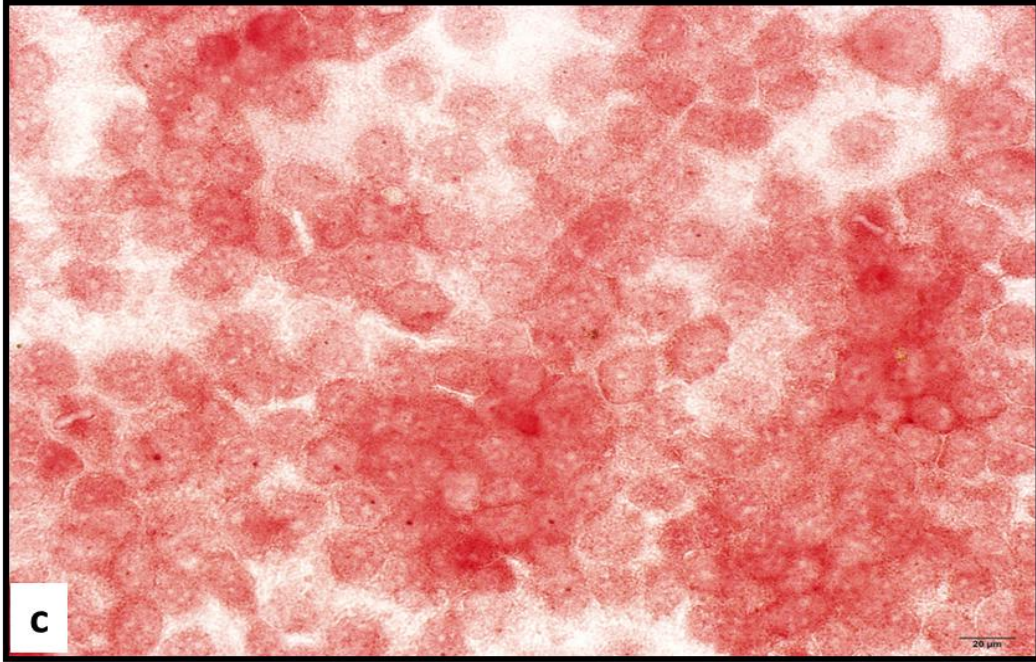
$P^a < 0,05$ Kontrol ile 1, 10, 20 mM PTX grupları karşılaştırıldığında nükleer ve sitoplazmik değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu. $P^b < 0,05$ TNF-α ile 1, 10, 20 mM PTX+TNF-α grupları karşılaştırıldığında nükleer değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu. $P^c < 0,05$ TNF-α ile 1 mM ve 20 mM PTX+TNF-α grupları karşılaştırıldığında sitoplazmik değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



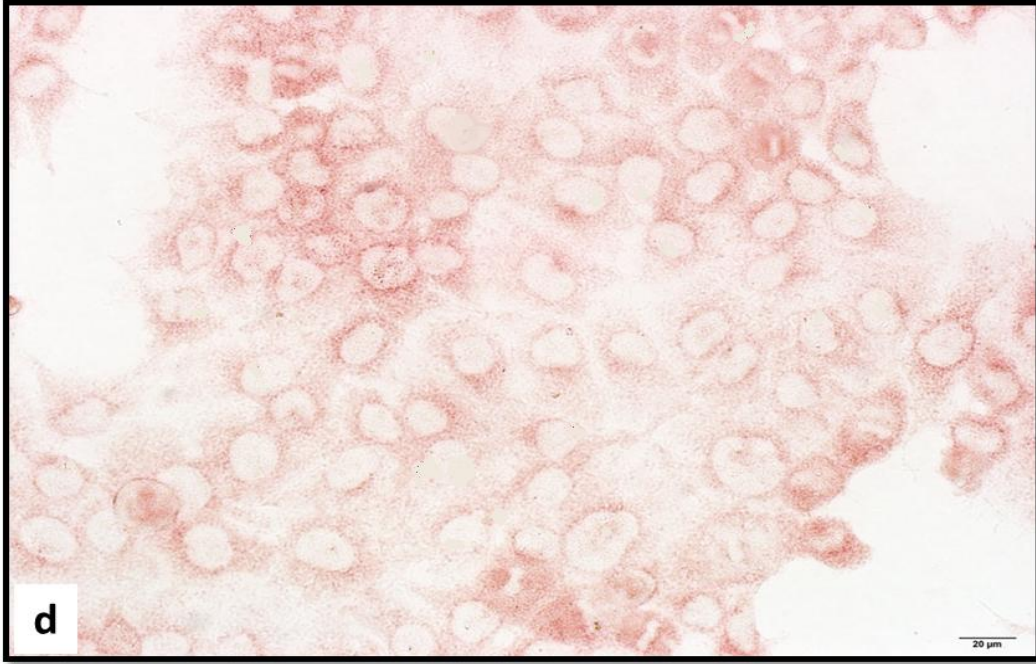
Şekil 4.3-2: PTX uygulaması için negatif kontrol örneği (X40).



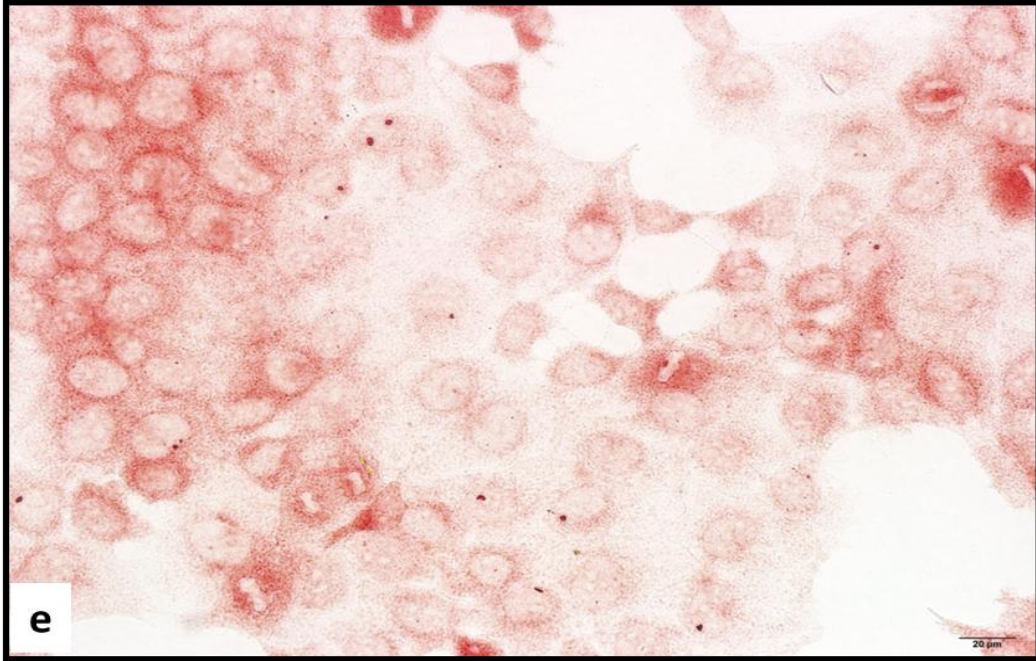
Şekil 4.3-3: 1mM PTX uygulanan hücrelerde NF-κB immünreaktivitesi (X40).



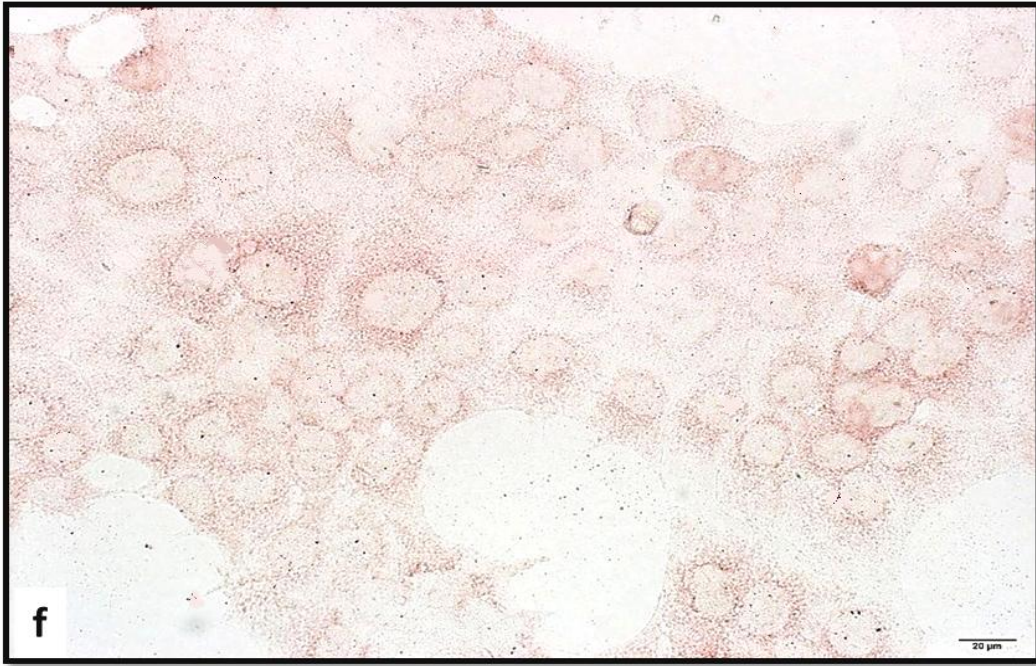
Şekil 4.3-4: 1mM PTX+ TNF-α uygulanan hücrelerde NF-κB immünreaktivitesi (X40).



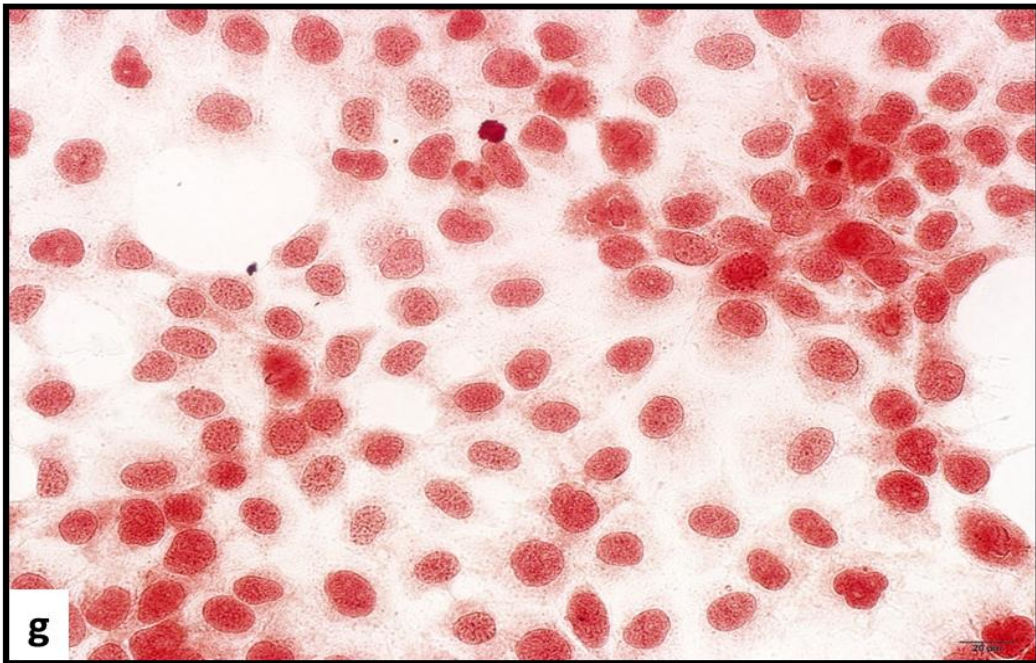
Şekil 4.3-5: 10 mM PTX uygulanan hücrelerde NF-κB immünreaktivitesi (X40).



Şekil 4.3-6: 10 mM PTX+ TNF- α uygulanan hücrelerde NF-κB immünreaktivitesi (X40).



Şekil 4.3-7: 20 mM PTX uygulanan hücrelerde NF-κB immünreaktivitesi (X40)



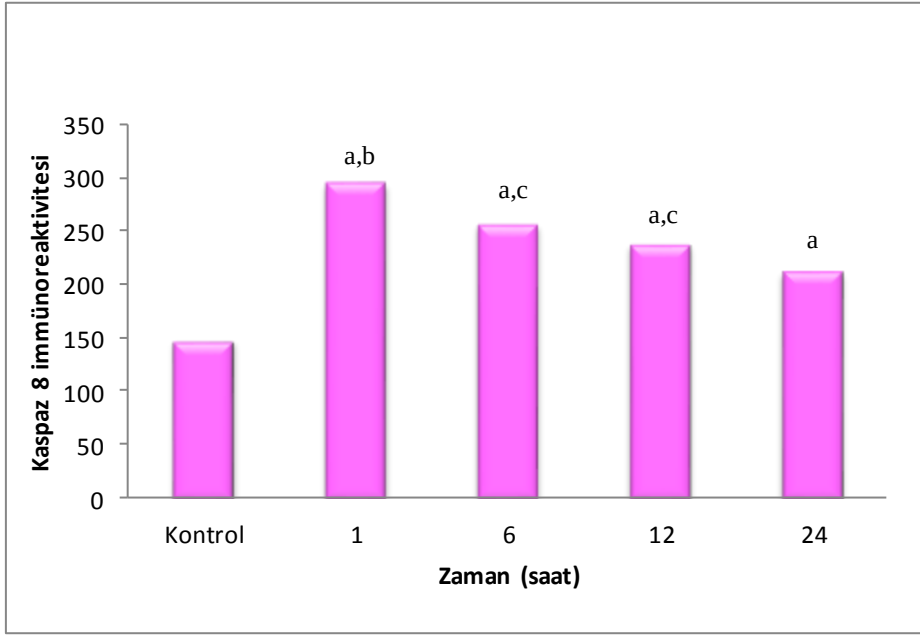
Şekil 4.3-8: 20 mM PTX+ TNF-α uygulanan hücrelerde NF-κB immünreaktivitesi (X40).

4.4. İMMÜNOTOKİMYASAL KASPAZ-8 İMMÜNREAKTİVİTESİ

JAR hücre soyunda kaspaz-8 aktivasyonu, anti-kaspaz-8 primer antikoru ile yapılan immünotokimya ile belirlendi. İmmünreaktiviter JAR hücrelerinde H-SCORE ile değerlendirildi (Tablo 4.4-1). Negatif kontrol örneğinde primer antikor basamağı uygulanmadı (Şekil: 4.4-2). TNF- α uygulanan tüm deney gruplarının kaspaz-8 ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlendi ($P<0.05$), (Şekil: 4.4-1, 4.4-3, 4.4-4, 4.4-5, 4.4-6 ve 4.4-7). Kontrol grubu JAR hücrelerinde belirli bir düzeyde nükleer ve sitoplazmik kaspaz-8 ekspresyonları izlendi (Şekil: 4.4-3). Deney grupları arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalar sonucunda 1-6, 1-12, 6-24 ve 12-24 saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi ($P<0.05$), (Şekil: 4.4-1). Ancak 6-12 saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($P>0.05$), (Şekil: 4.4-1). Deney grupları arasında birinci saatte aktivasyonun en fazla arttığı, zamana bağlı olarak da aktivasyonun azaldığı görüldü (Şekil: 4.4-1).

KASPAZ-8 İmmünotokimyası	
GRUP	ORTALAMA $\pm$ SS
KONTROL	147,96 $\pm$ 7,59
1 Saat TNF	295,29 $\pm$ 21,53 ^{a,b}
6 Saat TNF	257,12 $\pm$ 16,58 ^{a,c}
12 Saat TNF	238,24 $\pm$ 10,67 ^a
24 Saat TNF	212,41 $\pm$ 13,01 ^a

Tablo 4.4-1: Kontrol ve deney gruplarına ait kaspaz-8 immünreaktivitesinin istatistiksel olarak ortalama ve standart sapmasını gösteren tablo.



Şekil 4.4-1: Tüm deney gruplarına ait kaspaz-8 immünreaktivitesinin sonuçları

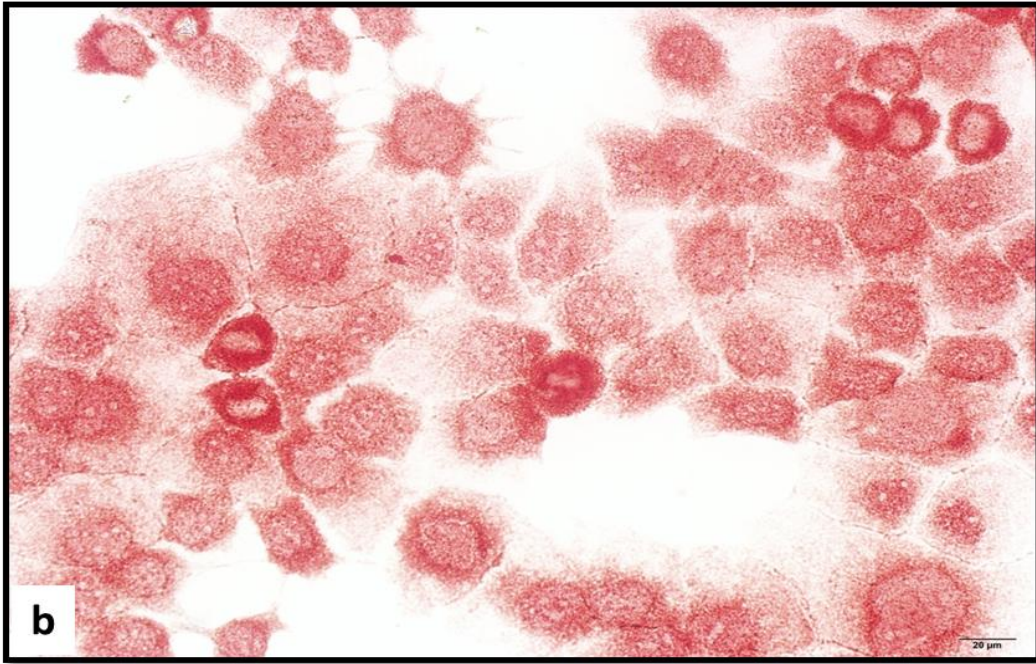
$P^a < 0,05$ Kontrol grubu tüm deney grupları ile karşılaştırıldı.

$P^b < 0,05$ 1-6, 1-12 ve 1-24 deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

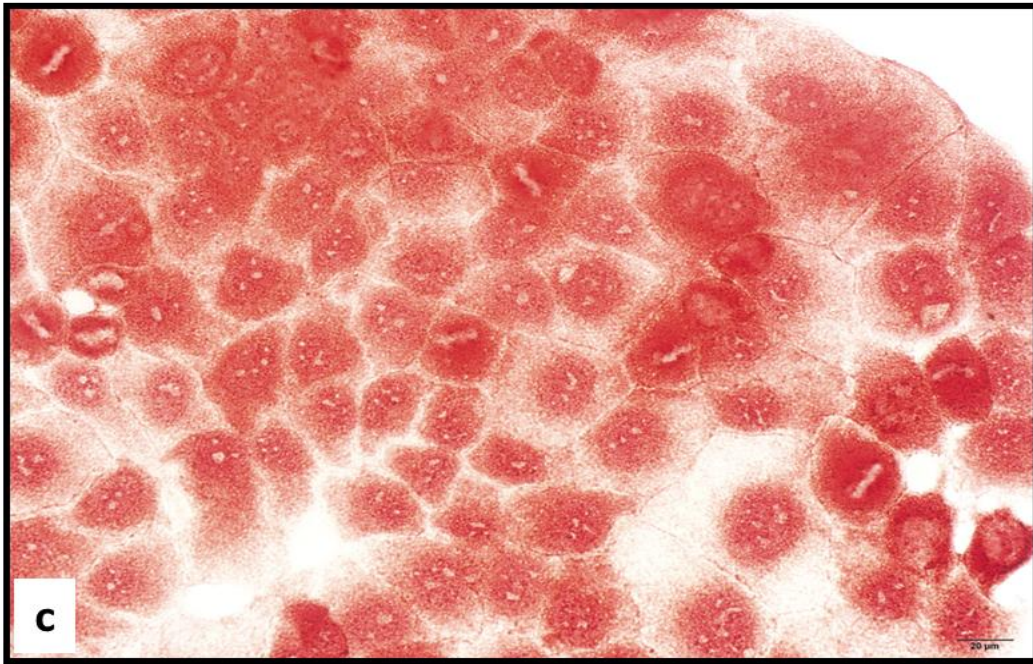
$P^c < 0,05$ 6-24 ve 12-24 deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.



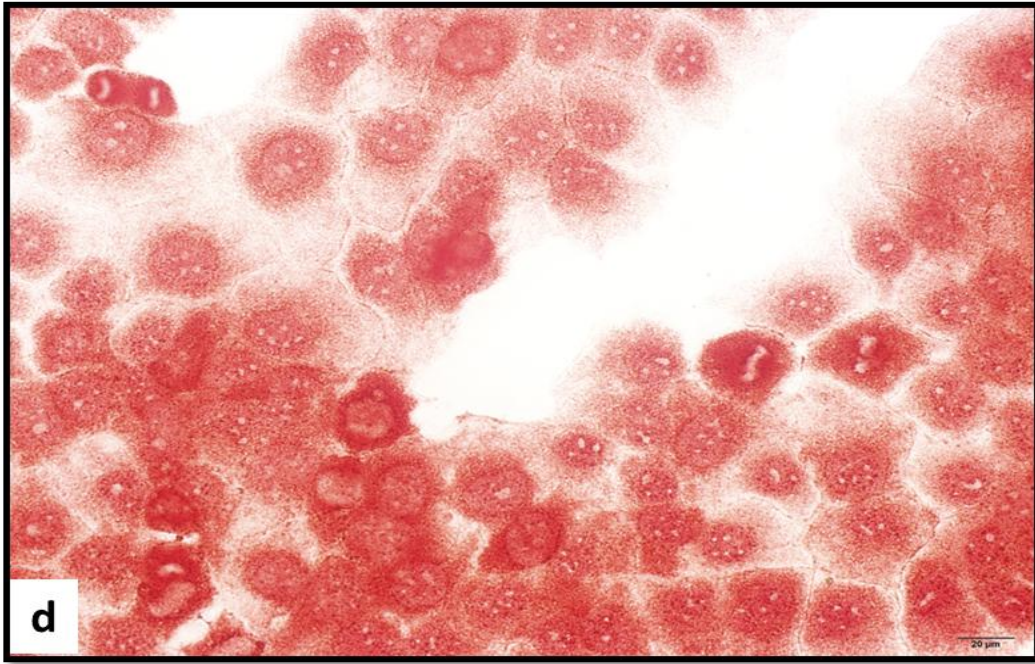
Şekil 4.4-2: Kaspaz-8 uygulaması için negatif kontrol örneği (X40).



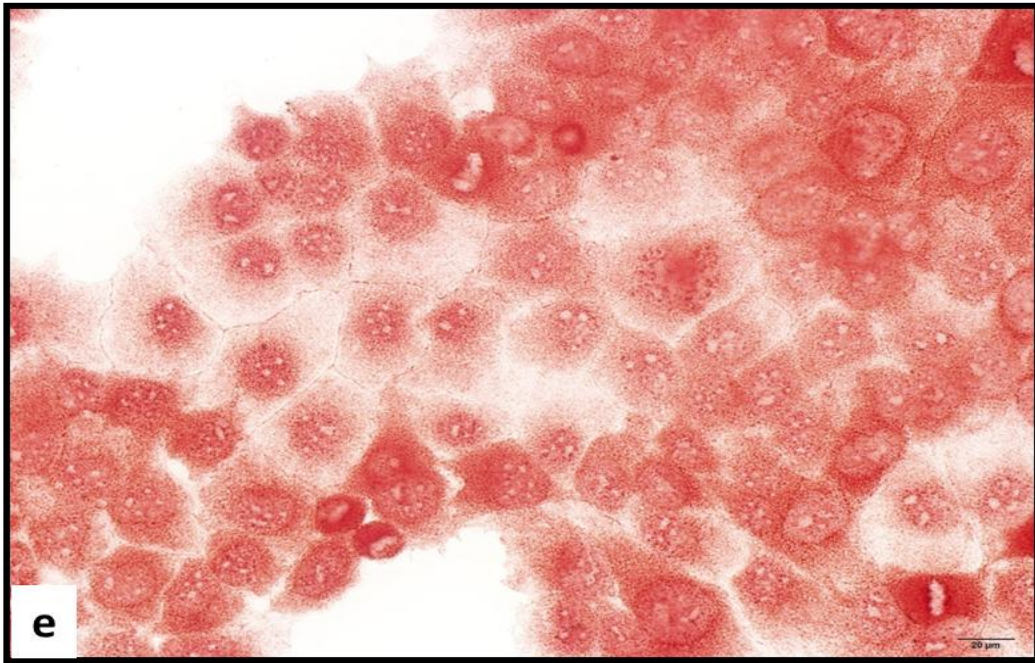
Şekil 4.4-3: Kontrol grubuna ait sitoplazmik ve nükleer kaspaz-8 immünreaktivitesi (X40).



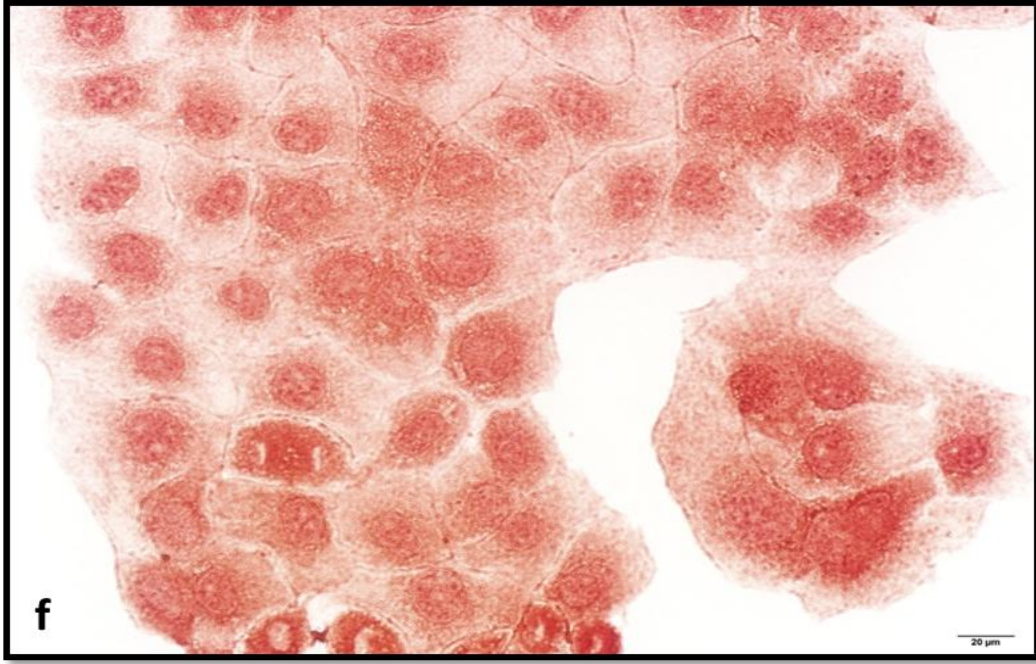
Şekil 4.4-4: 1 saatlik TNF- α uygulanan grupta kaspaz-8 immünreaktivitesi (X40).



Şekil 4.4-5: 6 saatlik TNF- α uygulanan grupta kaspaz-8 immünreaktivitesi (X40).



Şekil 4.4-6: 12 saatlik TNF- α uygulanan grupta kaspaz-8 immünreaktivitesi (X40)



Şekil 4.4-7: 24 saatlik TNF- α uygulanan grupta kaspaz-8 immünreaktivitesi (X40)

4.5. HÜCRE ÖLÜMÜNÜN DAPI BOYANMASI İLE GÖSTERİLMESİ

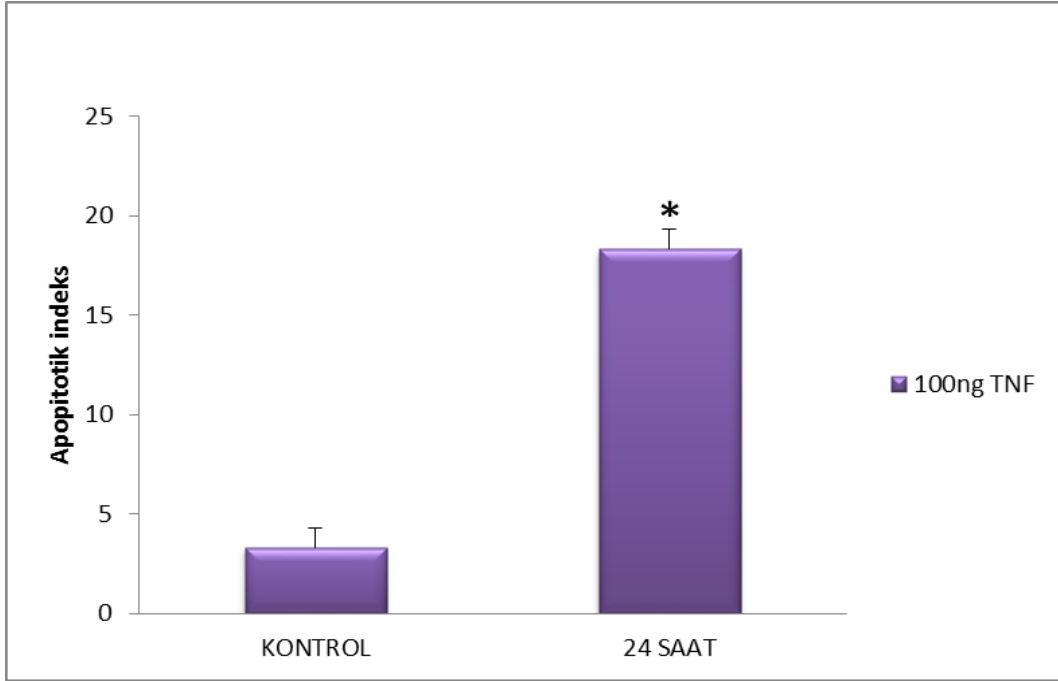
4.5.1. Apoptotik Hücre Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmada JAR hücreleri 100 ng TNF- α ile 24 saat inkübe edildi. Kontrol ile 24 saatlik deney grubu karşılaştırılması yapıldı (Tablo 4.5-1, Şekil 4.5-1). Kontrol grubu ile 24 saat TNF- α uygulanan deney grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlendi ($P<0.05$), (Şekil 4.5-1).

TNF- α zamana bağlı olarak JAR hücrelerinde ölüme yol açtı. Morfolojik olarak gözlemlediğimiz hücre ölümünü daha iyi karakterize etmek için JAR hücreleri, DNA için spesifik bir boya olan DAPI ile boyanarak floresan mikroskopta incelendi. Kontrol grubu hücrelerinde apoptotik hücre morfolojisi çok az sayıda gözlenirken (Şekil 4.5-2), TNF- α ile 24 saat inkübe edilmiş deney grubunda kromatin yoğunlaşması, yarım ay görüntüsü ve nükleer parçaları içeren apoptotik cisimciklerin oluşması gibi apoptotik hücre ölümünün tipik morfolojik bulgularında artış gözlemlendi (Şekil 4.5-3, 4.5-4).

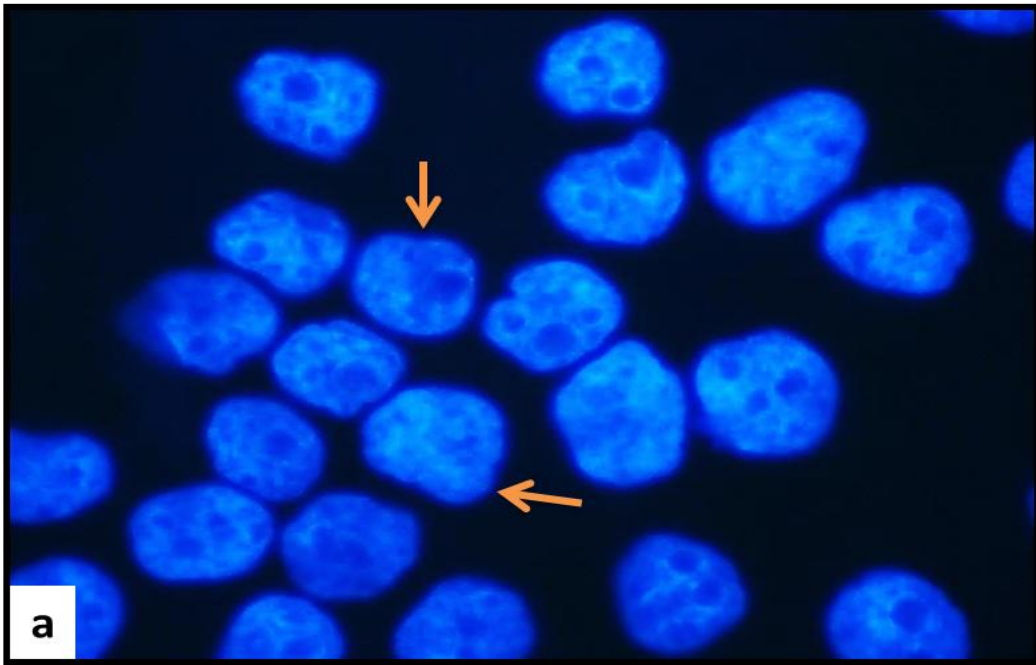
DAPI İmmüno-florasan Boyaması	
GRUP	ORTALAMA $\pm$ SS
KONTROL	3,33 $\pm$ 1,92
24 Saat	18,34 $\pm$ 2,50*

Tablo 4.5-1: Kontrol ve 24 saatlik deney grubuna ait apoptotik hücre oranlarının istatistiksel analizini gösteren tablo.

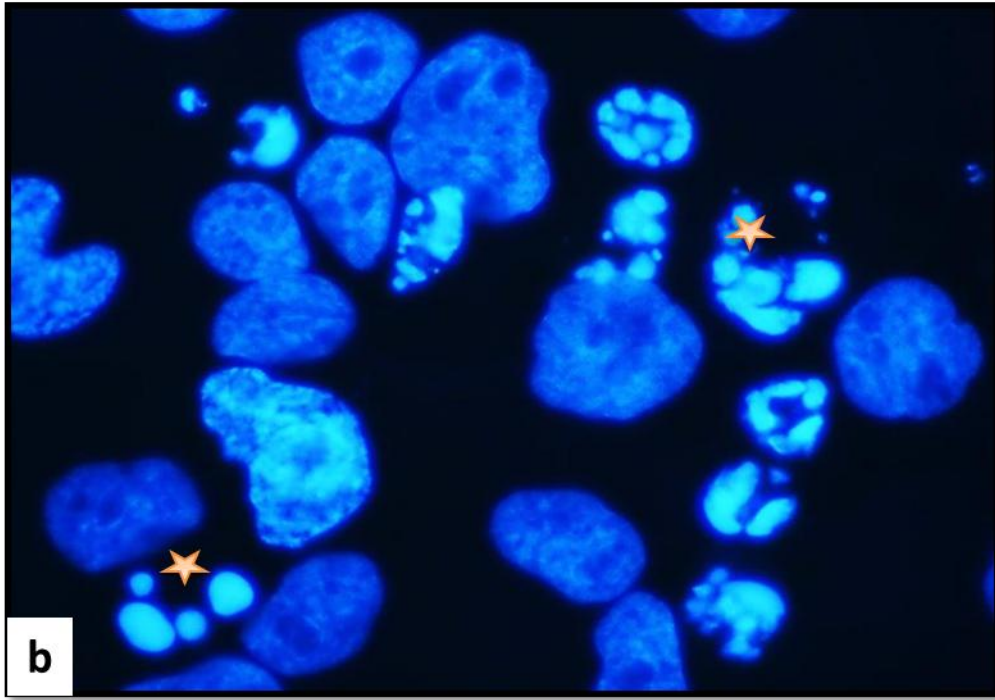


Şekil 4.5-1: Kontrol ve 24 saatlik deney grubuna ait apoptotik hücre oranları

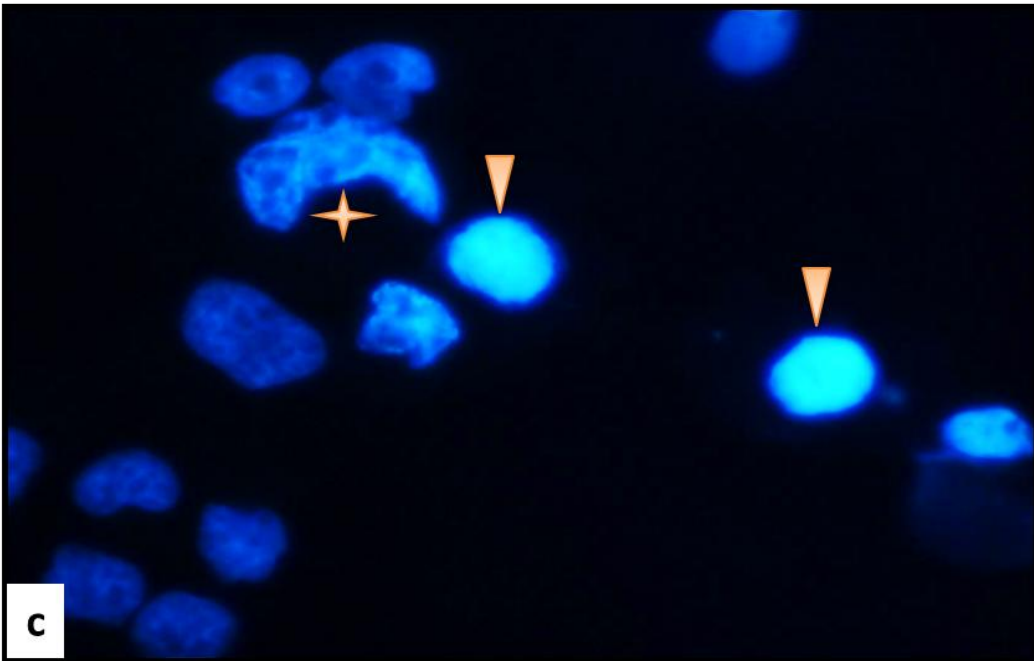
$P^* < 0,05$ kontrol grubu ile 24 saatlik deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü.



Şekil 4.5-2: JAR hücrelerinde kontrol grubuna ait nukleuslar (ok) izlenmekte (X100).



Şekil 4.5-3: 24 saatlik TNF- α uygulanan deney grubunda nükleer fragmentasyon (yıldız) izlenmekte (X100).



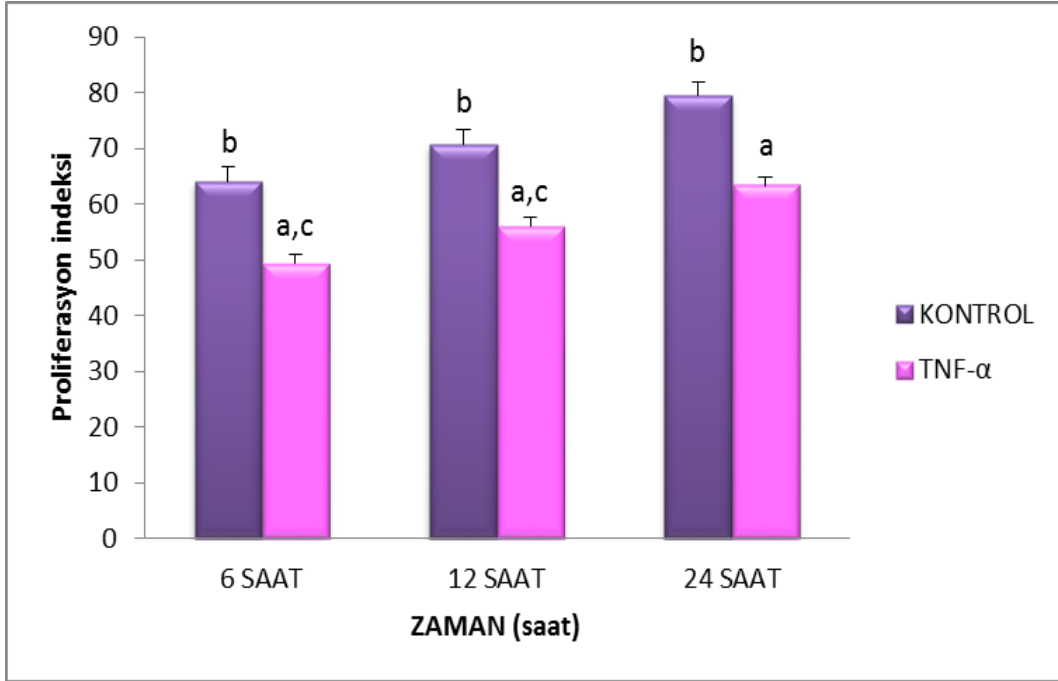
Şekil 4.5-4: 24 saatlik TNF- α uygulanan deney grubunda kondanse olmuş (yıldız) ve yarım ay (ok başı) görüntüsüne sahip nukleuslar izlenmekte (X100).

4.6. PROLİFERASYONUN İMMÜNOSİTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

JAR hücre soyunda PCNA ekspresyonu, anti-PCNA primer antikoru ile yapılan immünositokimyal işaretleme ile belirlendi. Deney grupları 100 ng TNF- α ile 6, 12 ve 24 saat inkübe edildi (Tablo 4.6-1). Her deney grubu kendi kontrol grubuyla karşılaştırıldı (Şekil 4.6-1, 4.6-3, 4.6-4, 4.6-5, 4.6-6, 4.6-7, 4.6-8). 6-24 saatlik kontrol grupları, 6-12 kontrol grupları ile 12-24 saat kontrol gruplarının karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlendi ($P<0.05$), (Şekil 4.6-1). Deney grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında 6-24 saat deney grupları, 6-12 saat ile 12-24 saat deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($P<0.05$), (Şekil 4.6-1).

PCNA İmmünositokimyası	
GRUP	ORTALAMA $\pm$ SS
6 saat Kontrol	64,156 $\pm$ 5,901 ^b
6 saat TNF	49,330 $\pm$ 2,178 ^{a,c}
12 saat Kontrol	70,776 $\pm$ 2,458 ^b
12 saat TNF	55,988 $\pm$ 1,524 ^{a,c}
24 saat Kontrol	79,548 $\pm$ 2,471 ^b
24 saat TNF	63,362 $\pm$ 2,517 ^{a,c}

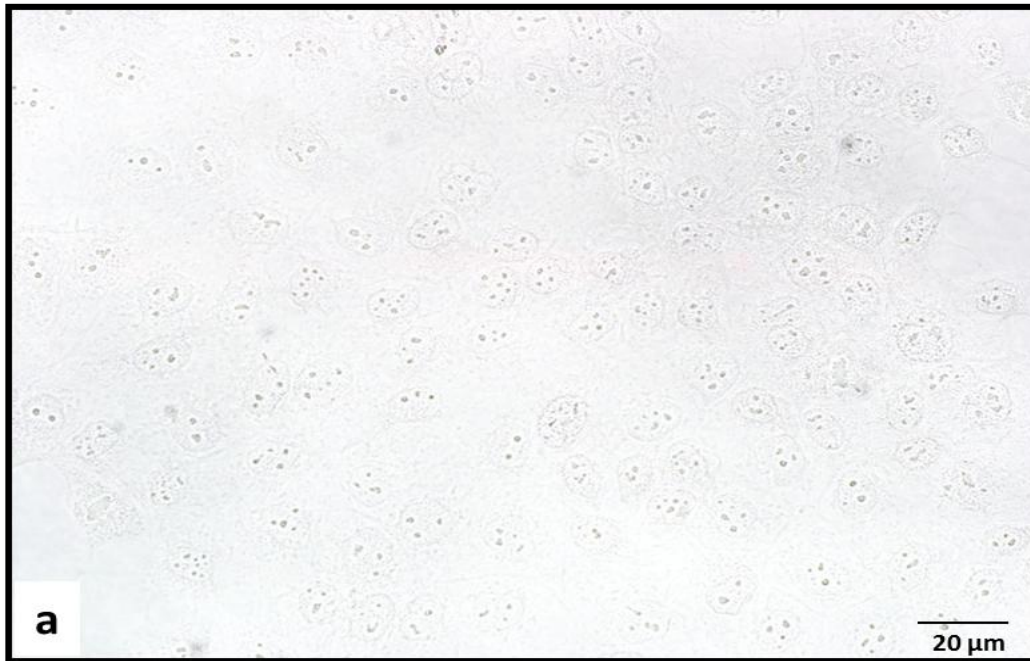
Tablo 4.6-1: Kontrol ve deney gruplarına ait proliferasyonun PCNA ile işaretlenmelerine ait ortalama ve standart sapmalarının istatistiksel analizini gösteren tablo.



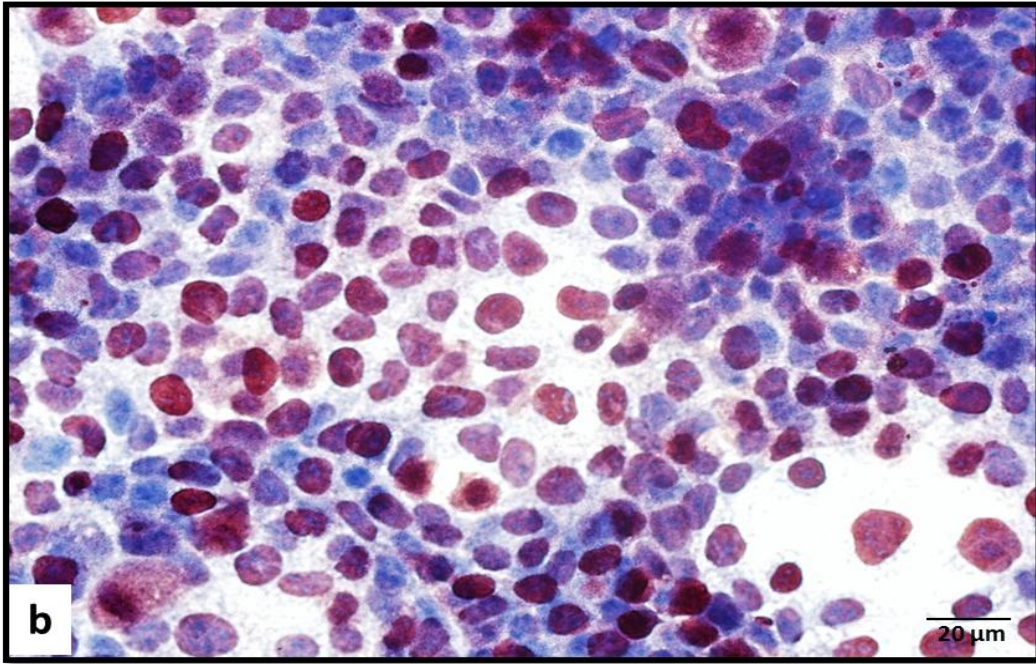
Şekil 4.6-1: Kontrol ve deney gruplarına ait proliferere hücre oranlarının yüzdesi.

$P^b < 0.05$ 6-12, 6-24 ve 12-24 saat kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

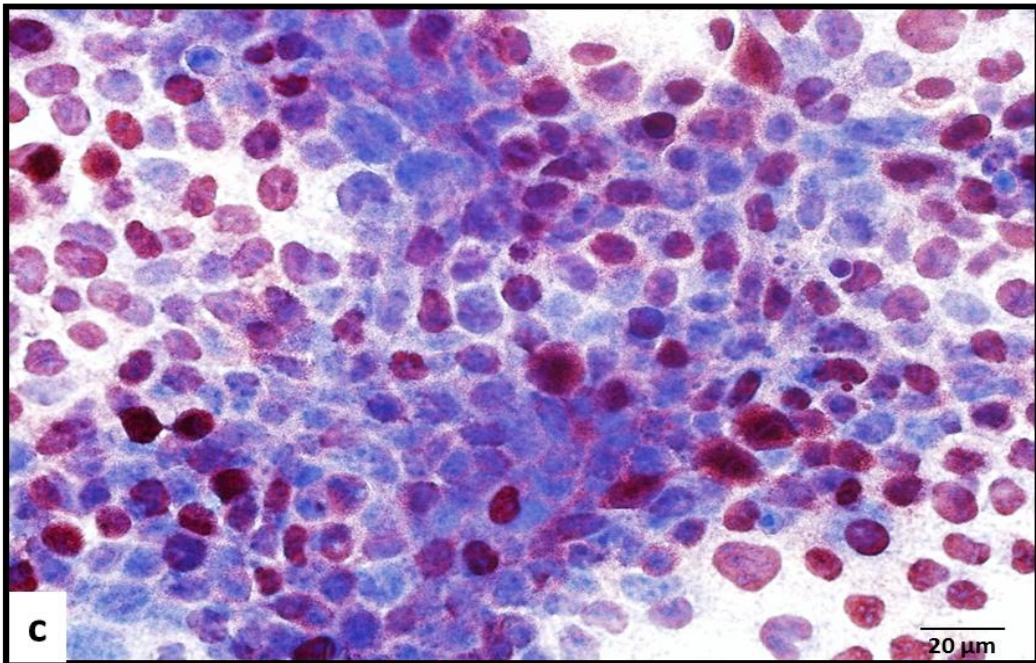
$P^c < 0,05$ 6-12 ve 12-24 saat deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.



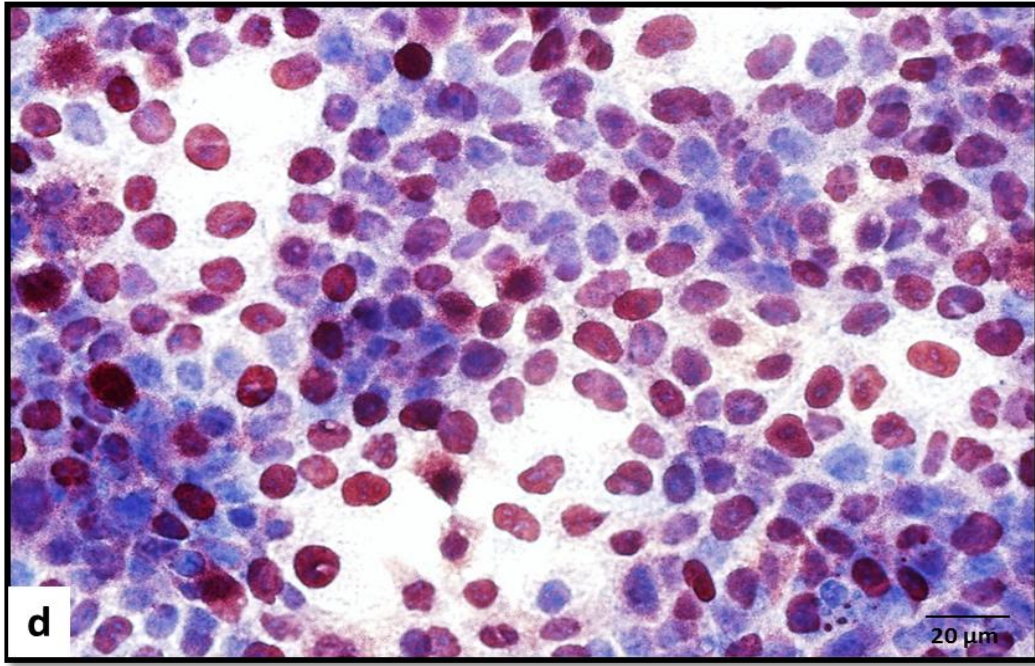
Şekil 4.6-2: PCNA immünreaktivitesine ait negatif kontrol örneği (X40).



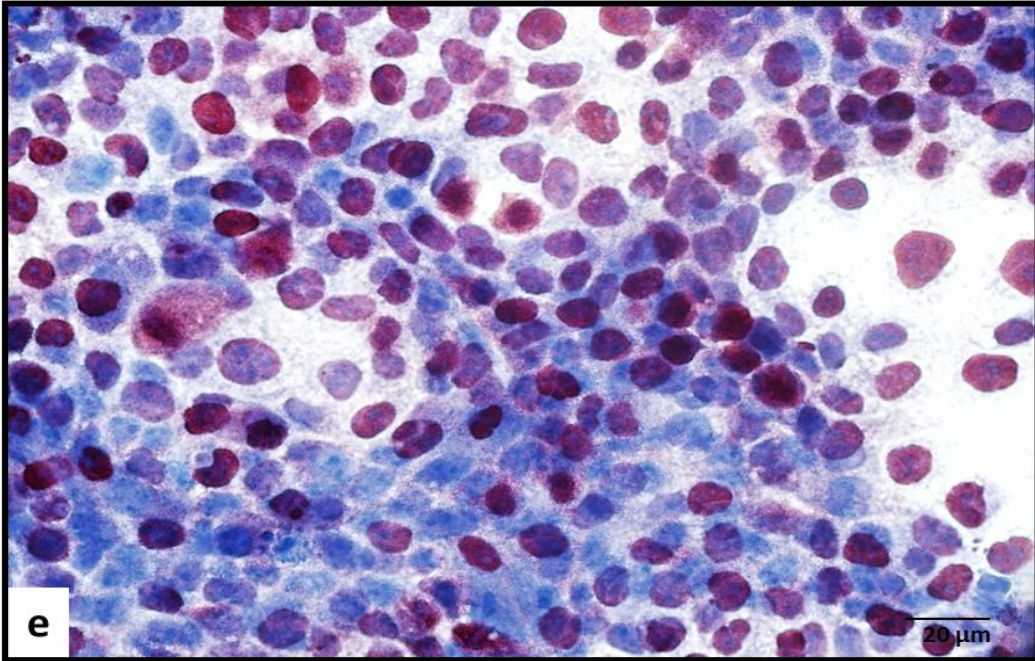
Şekil 4.6-3: 6 saatlik kontrol grubuna ait PCNA immünreaktivitesi, PCNA pozitif hücre nükleusları kırmızı renkte izlenmekte, Hematoksilen (H) (X40).



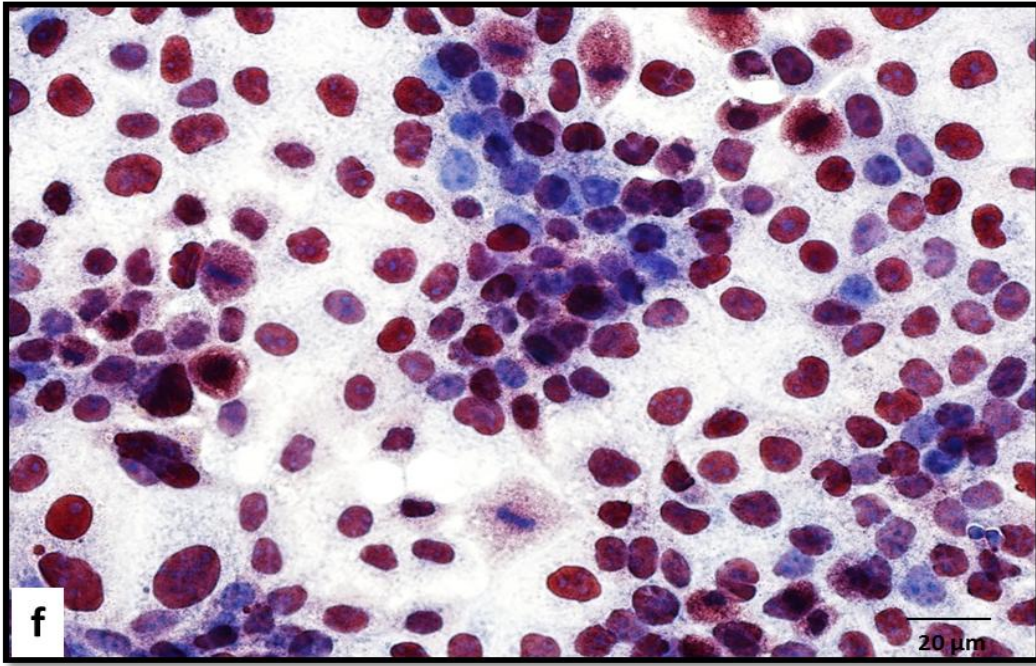
Şekil 4.6-4: 6 saatlik TNF- α uygulanan gruba ait PCNA immünreaktivitesi, H (X40).



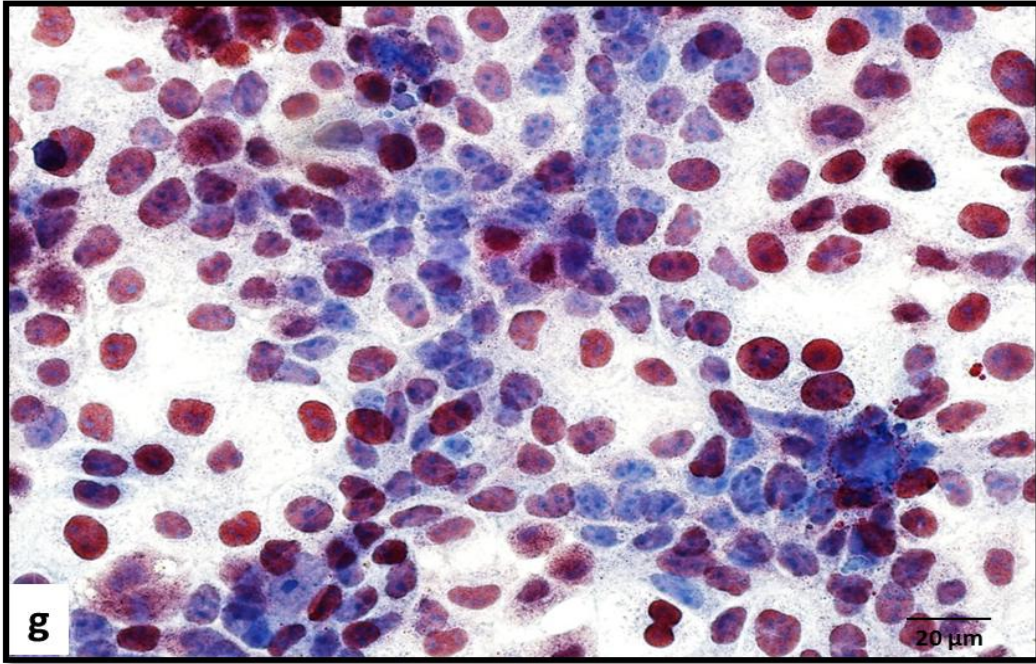
Şekil 4.6-5: 12 saatlik kontrol grubuna ait PCNA immünreaktivitesi, H (X40).



Şekil 4.6-6: 12 saatlik TNF-  uygulanan gruba ait PCNA immünreaktivitesi, H (X40).



Şekil 4.6-7: 24 saatlik kontrol grubuna ait PCNA immünreaktivitesi, H (X40).

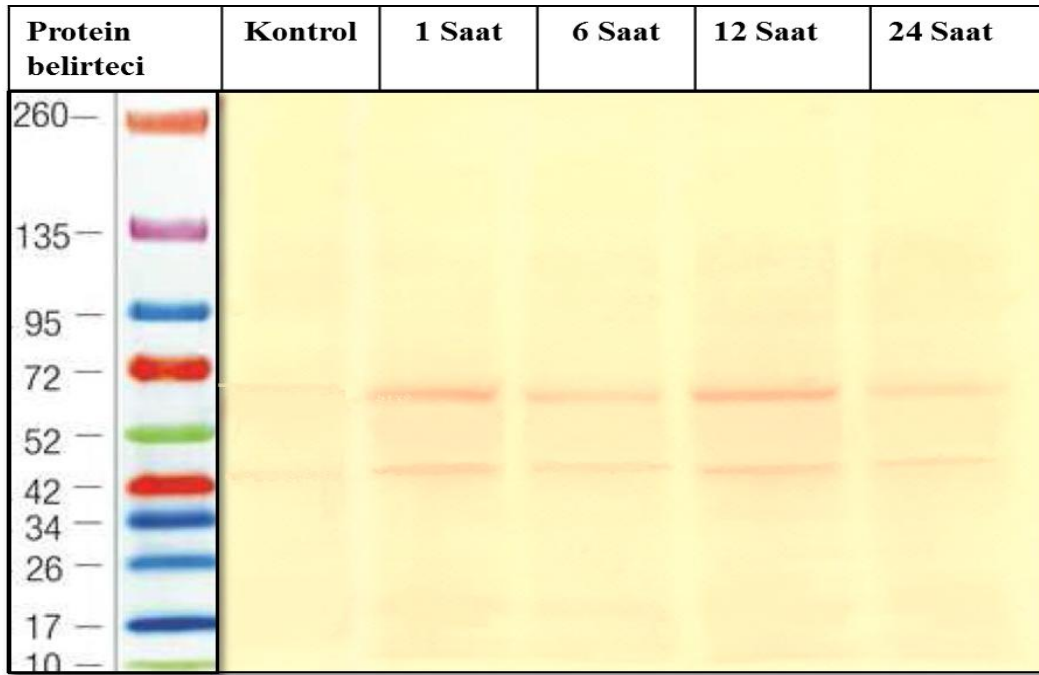


Şekil 4.6-8: 24 saatlik TNF- α uygulanan gruba ait PCNA immünreaktivitesi, H (X40).

4.7. WESTERN BLOT

Western blot sonuçları bütün gruplar için nitroselülöz membranlardaki AEC ile boyanan iki farklı protein bantları ile (~69 ve 43 kD'da) gösterilmiştir (Şekil 4.7:1)

Deney grupları 100 ng TNF- α ile 1, 6, 12 ve 24 saat inkübe edildi. Kontrol grubu normal besiyerinde büyütüldü. NF- κ B protein bantları yaklaşık 69 kD'da, peroksidaz işaretli kontrol protein antikoruna β -aktin ise 43 kD'da reaksiyon verdi. Western blot incelemeleri sonucunda elde edilen NF- κ B protein bantları izlenmekte (Şekil 4.7:1).



Şekil 4.7-1: 100 ng TNF- α uygulanan deney gruplarında zamana bağlı NF- κ B düzeylerine ait protein bantları.

5. TARTIŞMA

Başarılı bir gebeliğin devamı için ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinin invazyon sürecindeki biyolojik yanıtları çok önemlidir. Bu süreci etkileyen ve düzenleyen faktörlerin in vivo olarak incelenmesi insan düşük materyallerinde ve deney hayvanlarında mümkün olmaktadır. Bu nedenle in vitro araştırma modelleri teknik olarak in vivo deneylere alternatif oluşturmaktadır. Ancak primer kültürlerde saf bir popülasyon elde edilmesinin zorluğu araştırmacıları çeşitli hücre soylarına ait modelleri kullanmaya itmiştir. Bu modeller çeşitli plasental gelişim bozukluklarının incelenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (67). Hem maternal hem de fetal mortalite ve morbitide açısından önem taşıyan preeklampsi mekanizmasının anlaşılması, koruyucu ve tedavi edici yaklaşımların geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda da çeşitli deney modelleri kullanılmıştır (168,169,170). İlk hayvan modelleri olarak çoğunlukla sıçan ve fareler kullanılmıştır. Ancak bu kemirgen modelleri endometriyum ve miyometriyuma trofoblast invazyonu mekanizmasından yoksundur. Ayrıca uygun plasental villus yapısına da sahip değildirler. İnsan placentası morfolojisi ve fizyolojisinden temel farklılıkları nedeniyle bu çalışma modelleri tercih edilmemektedir (171).

Trofoblastik hücrelerin yanıtlarının anlaşılmasına ait çalışmalarda ve tedavisine yönelik ilaç deneylerinde de hayvan modelleri yerine in vitro modeller tercih edilmektedir. İn vitro model olarak, villus doku örneklerinden primer kültürle elde edilen trofoblastik hücreler ve koryokarsinom kaynaklı trofoblastik hücre soyları kullanılmaktadır. Koryokarsinom kaynaklı hücre soylarından JAR, JEG3 ve BEWO hücreleri sıklıkla kullanılmaktadır (67). Biz de çalışmamızda JAR hücrelerine dışarıdan TNF- α uygulayarak oluşturduğumuz in vitro preeklampstik deney modelinde NF- κ B sinyal yolağını, hücre proliferasyonu ve apoptozunu immünohistokimyasal, immüno floresan ve western blot teknikleriyle inceledik.

Preeklampsi; hipertansiyon, proteinüri, çeşitli organ hasarları ve anormal fetoplasental dolaşım ile karakterize çok faktörlü bir sendromdur. Preeklampside trofoblastlar plasental vasküler yatağa tamamen invaze olamazlar ve spiral arterlerin modellenmesi hasara uğrayarak plasental yetersizlik görülür (98,172). Preeklampsinin patolojik koşulları ve doğası gereği plasental hücrelerde çeşitli inflamatuvar sitokin

seviyelerinde artış görülmektedir. Trofoblast hücreleri tarafından da üretilen bu sitokinler arasında interlökinler ve TNF- α yer almaktadır (173). Preeklampsili kadınlarda özellikle interlökin 6 ve TNF- α 'nın plazma seviyelerindeki artış bu plasental sitokinlerin fazla üretiminin preeklampsisi ile ilişkili patofizyolojik değişimlere etki edebileceğini düşündürmüştür. Bu veriler, interlökin 6 ve TNF- α uygulanan in vitro preeklampitik modellerin geliştirilmesine öncülük etmiştir (98). Biz de çalışmamızda preeklampitik in vitro modeli oluşturmak için JAR hücrelerine 1, 6, 12 ve 24 saatlik TNF- α uygulamaları yaptık.

Çalışmamız JAR hücre soyunda TNF- α aracılı yolları inceleyen ilk çalışmadır. NF- κ B aktivasyonu bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde, hücre proliferasyonu, homeostaz (111), apoptoz, kanser ve lenfoid organ gelişiminde merkezi bir role sahiptir. NF- κ B; sitokinler, adhezyon molekülleri ve diğer medyatörlerin transkripsiyonunda önemli rol oynar (174,175).

Preeklampsisi benzeri oksidatif stres patogenezi plasental bozukluklarda sitokinlerin rolünü araştıran çalışmalarda, sitokinlerin endotelial hücreler üzerinde etkili olduğu ve özellikle TNF- α 'nın preeklampsinin patogeneziinde rol oynadığı gösterilmiştir (174,175). TNF- α seviyelerinin artışı fetal hücrelerde hasara yol açarak plasental yetersizliğe ve apoptoza sebep olabilir. TNF- α 'nın ilişkili yollardan biri olan NF- κ B'nin alt birimleri, nükleusa geçerek TNF- α 'nın da dahil olduğu sitokinleri, sitokin reseptörlerini, büyüme faktörlerini ve hücre adhezyon moleküllerini kodlayan genleri düzenlerler (177,178).

Preeklampside plasentanın oksidatif stres altındayken daha fazla TNF- α ürettiği bilinmektedir. NF- κ B'nin de TNF- α gen ekspresyonunu düzenlediği düşünüldüğünde, preeklampitik plasentalarda oksidatif stres koşullarında NF- κ B aktivasyonunun özellikle trofoblast hücrelerinde artışı beklenmektedir. Vaughan ve Walsh, preeklampitik kadınlardan aldıkları plasenta dokularında oksidatif strese bağlı olarak NF- κ B'nin anlamlı derecede artış gösterdiğini kaydetmişlerdir. Trofoblast benzeri hücreler olan ED₂₇ hücrelerinde de oksidatif stres koşullarında ve özellikle TNF- α ile kombine edilen koşullarda NF- κ B aktivasyonunun arttığını gözlemlemişlerdir (179). NF- κ B ekspresyonunun deneysel endometriyozis modelinde de arttığı görülmüş ve bu durum sitoplazmik bir protein olan IKK'nin (I κ B kinaz) NF- κ B nin p65 alt birimini fosforile ederek aktive etmesine bağlanmıştır. NF- κ B aktivasyonu çeşitli fizyolojik etkenlere karşı kritik bir yaşamsal cevaptır. Oksidatif stres ve hipoksi gibi etkenler NF- κ B/I- κ B

kompleksinin ayrılmasına sebep olarak NF- κ B'nin nukleusa geçişine yol açar (180,181).

NF- κ B, I κ B proteinleri ile ilişkili şekilde sitoplazmada inaktif formda bulunur. I κ B'lerin NF- κ B'yi sitoplazmada tutmak için altbirimlerindeki nükleer lokalizasyon dizilerini/nuclear localization sequence (NLS) maskeleyiği düşünülmekteydi. Ancak son çalışmalar inaktif NF- κ B komplekslerinin sitoplazmik lokalizasyonunun aslında nükleer ve sitoplazmik bölgeler arasında gerçekleştirilen sürekli bir geçiş dengesiyle sağlandığını göstermektedir (182,183). Yapısal ve biyokimyasal çalışmalar NF- κ B dimerindeki iki NLS'den sadece birinin I κ B tarafından maskelendiğini ve bununda NF- κ B/I κ B komplekslerinin nukleusa geçişini sağladığını göstermiştir. Ayrıca I κ B proteinin N-ucunda bulunan nukleus dışına taşıyıcı dizileri/nuclear export signaling (NES) ise bu komplekslerin nukleus dışında devamlı tutulmasında görev alır. I κ B'nin çeşitleri de aktif olarak nukleus ve sitoplazma arasında geçiş yapar (184). Bazı kanser hücre soylarında ve kanserli dokularda NF- κ B'nin nükleer lokalizasyonlu olduğu bildirilmiştir (185). Enerji harcanarak inaktif NF- κ B komplekslerinin sitoplazmada tutulmasının avantajları henüz bilinmemektedir ve araştırılması gerekmektedir (186).

Çeşitli hastalıklarda NF- κ B inhibitörlerine yönelik tedavi metotları geliştirilmektedir. Bunlardan bazıları NF- κ B'nin DNA'ya bağlanma aktivitesini doğrudan hedeflemektedir. Bazıları NF- κ B dimerlerinin nukleusa taşınmasını engellemek üzere nükleer geçiş sistemini etkilemektedir. Bazıları da I κ B proteininin stabilizasyonu veya NF- κ B sinyal kinazlarını hedeflemektedir. Bütün bu terapötik stratejiler NF- κ B aktivitesini durdurmayı amaçlamaktadır. Ancak NF- κ B'nin önemli fizyolojik rollere sahip olduğu da düşünülürse bu yolağın sistemik baskılanması mümkün gözükmemektedir. NF- κ B aktivasyon mekanizmaları hakkında daha fazla bilgi açığa çıktıkça yeni stratejilerin geliştirilmesi de mümkün olacaktır (187).

Biz de çalışmamızda JAR hücre soyuna TNF- α uygulayarak oluşturduğumuz oksidatif stres koşullarında NF- κ B aktivasyonun hem nükleer hem de sitoplazmik olarak anlamlı şekilde arttığını fakat bu artışın in vitro olarak TNF- α uygulama saatlerine göre değişiklik gösterdiğini tespit ettik. NF- κ B immünreaktivitesinde zamana bağlı değişikliklerin sebebi NF- κ B'nin nükleer ve sitoplazmik hareketi veya hücrelerde anti-inflamatuar ve antioksidan mekanizmaların etkinleşmesi olabilir (95,180). Sitoplazmik immünreaktivite artışı I κ B'nin NF- κ B'yi sitoplazmada tutmak üzere NLS bölgelerinde maskelenme ile ilişkilendirilebilir. JAR hücrelerinde bu moleküler

mekanizmanın tam olarak anlaşılabilmesi yapılacak ileri çalışmalarla mümkün olacaktır. NF- κ B yolağı, inflamatuvar sitokinlerin kontrolüne yönelik terapötik geliştirilmesinde stratejik önem taşımaktadır.

Hemostatik aktivitesiyle bilinen metilksantin türevi olan PTX hasarlı bölgesel mikrosirkülasyon koşullarında klinik olarak kullanılmaktadır. PTX'in TNF- α 'nın indüklenmesini baskıladığı gösterilmiş ve bundan sonra birçok immünolojik hastalıkta tedavi amaçlı kullanılmıştır (176). PTX'in çeşitli sistemik hastalıklarda TNF- α üretimini in vitro ve in vivo olarak inhibe ettiği gösterilmiş ancak etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (188,189). Sampaio ve arkadaşlarının yaptığı in vivo ve in vitro çalışmada PTX'in TNF- α 'nın da dahil olduğu inflamatuvar sitokinleri inhibe ettiği bulunmuş ve özellikle interlökinler aracılığıyla TNF- α sentezini durdurduğu düşünülmüştür (176).

TNF- α geninin nükleotid sekanslarında potansiyel κ -B bölgelerinin bulunması NF- κ B'nin TNF- α gen ekspresyonu ve protein sentezinde kritik bir transkripsiyonel faktör olduğunu göstermektedir (161,190). Biz de çalışmamızda PTX'in in vitro koşullarda JAR hücrelerindeki NF- κ B sinyal yolağı üzerine etkisini inceledik. 10mM PTX + TNF- α grubunda nükleer NF- κ B düzeylerinin yalnız TNF- α uygulanan grupla karşılaştırıldığında azaldığını gördük. Bu azalmayı sitoplazmik olarak sadece 20mM PTX içeren TNF- α ortamında görebildik. Yalnızca PTX uygulanan gruplarda ise JAR hücrelerinde mevcut nükleer NF- κ B immünreaktivitenin izlenmemesi PTX'in etkilerinin ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekliliği tezimizi güçlendirmiştir.

Tümör hücre apoptozu TNF reseptörleri gibi hücre yüzey reseptörleriyle ilişkili çeşitli yapısal ajanların tetiklenmesiyle indüklenebilir. TNF ile indüklenen apoptozun mekanizmaları tümör gelişiminin kontrolünde önemlidir. Ancak moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (190). TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin apoptotik hücre ölümüne yol açmaları dışında aynı zaman da çeşitli hücrelerde proliferasyona ve farklılaşmaya da neden oldukları bilinmektedir. Bu sitokinlerin lokal veya sistemik olarak üretilmesi tümör hücrelerinin büyümesini ve metastazını doğrudan etkileyebilir. TNF- α 'nın meme kanseri ve renal hücre karsinomunda tümör hücrelerin büyümesini engellediği kaydedilmiştir (191). Ancak koryokarsinom hücre hatlarında özellikle preeklampitik koşullarda TNF- α 'nın proliferasyona etkisi daha önce incelenmemiştir. Bu çalışmada TNF- α 'nın koryokarsinom kaynaklı JAR hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiğini PCNA proteinin immünohistokimyasal işaretlemesiyle

gösterdik. Hücre proliferasyonu ve DNA sentezi oranlarıyla doğrudan ilişkili olan PCNA proteini, hücre proliferasyonu için biyolojik bir göstergedir (192). TNF- α uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre zamana bağlı olarak hücre proliferasyonlarının anlamlı derecede azalma gösterdiğini saptadık. Kuninaka ve arkadaşları çeşitli tümör hücre soyları ile yapmış olduğu çalışmada proinflamatuvar sitokinlerin tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini saptamış ancak bu etkinin bütün hücre soyları için geçerli olmadığını çünkü bazı hücrelerin TNF- α 'nın sitotoksik etkisine dirençli olduğu söylemişlerdir (191).

TNF- α doz belirleme çalışmalarımız sırasında diğer hücre soylarıyla karşılaştırıldığında JAR hücre soyunun literatürde bildirilen dozlara dirençli olduğunu tespit etmiştik ancak seçmiş olduğumuz dozda TNF- α 'nın zamana bağlı olarak proliferasyonu baskılayıcı etki gösterdiğini tespit ettik .

Apoptotik kaskadın ilk proteini olan ve diğer kaspaz ailesi üyelerinin proteolitik aktivasyonuna sebep olan kaspaz-8'in fonksiyonları TNF α 'nın sitotoksitesisi için gereklidir. Kaspaz-8'in TNF reseptörünün ölüm domainlerinde fonksiyon göstermesi apoptozun başlatılması ve diğer kaspazların aktivasyonu için önemlidir (193,194). Çeşitli hücrel cevapları tetikleyen pleotropik bir sitokin olan TNF- α 'nın aktivitesi kendi reseptörlerine bağlanarak oluşturduğu farklı sinyal komplekslerinden kaynaklanır. TNF- α 'nın bu sinyal komplekslerine ait proteinler kompleks I'ı meydana getirir ve bu kompleks I kaspaz-8 aktivitesine dahil olarak apoptozu tetikleyen kompleks II'yi ve devamındaki apoptotik proteinlerin fonksiyonel hale gelmesini sağlar. Normalde kompleks II'nin aktivitesini durduran bir proteazın aktivitesi, NF- κ B transkripsiyonel aktivitesinin sonlandırılması aracılığıyla azaltılır. NF- κ B çeşitli antiapoptotik proteinleri etkileyerek hücre ölümünü önler. Aslında TNF- α reseptörlerinden biri olan TNFRI' e bağlanma apoptozu açan iki farklı kaspaz-8 aktivasyon yolağını çalıştırır. Ancak bu yolaklardan herhangi birini inhibe eden proteinlerin seviyeleri NF- κ B'nin aktivasyonuna bağlı olarak artar (195). Biz de çalışmamızda ortamda TNF- α bulunmasına rağmen apoptotik kaspaz-8 aktivasyon seviyelerinin düşmesinin NF- κ B aktivasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündük.

Çeşitli tümör hücrelerindeki TNF- α 'nın otokrin aktivitesinin anlaşılması TNF- α 'ya bağlı iki farklı kaspaz-8 yolağının moleküler düzeyde tanımlanmasına bağlıdır. Bunun için farklı hücre soylarında farklı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Trofoblast hücrelerinde TNF- α 'nın in vitro olarak apoptozu tetiklediği ve çok sayıda

farklı ölüm reseptörünün ekspresyonunun arttığı görülmüştür (196). Ayrıca farklılaşma devam ederken sitotrofoblast hücrelerinde çeşitli antiapoptotik proteinlerin ve proapoptotik kaspazların ekspresyonunun başladığı da görülmüştür (197). Sitotrofoblast hücrelerinde, efektör kaspazlardan 3 ve 6 inaktif iken başlatıcı kaspazlardan kaspaz-8'in farklılaşan kök hücrelerde aktivitesini arttırdığı kaydedilmiştir (198,199).

Black ve arkadaşları kaspaz-8 aktivitesinin insan villöz sitotrofoblastlarının farklılaşması için ön şart olduğunu öne sürmüşlerdir (139). Sinsityal füzyon öncesinde kaspaz-8'in aktifleştiğini biyokimyasal ve moleküler analizlerle göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda trofoblast benzeri koryokarsinom kaynaklı JAR hücrelerinde TNF- α aracılı in vitro oksidatif stres modelinde kaspaz-8 aktivasyonunun immünohistokimyasal olarak rol oynadığını gözlemledik ve 100 ng TNF- α içeren ortamda bu aktivasyonun zamana bağlı olarak azaldığını kaydettik. Ancak sitoplazmik lokalizasyon gösterdiği bilinen kaspaz-8'in yapılan çalışmalarla bazı hücrelerde nükleusta bulunduğu gösterilmiştir (135). Bu çalışmalar kaspaz-8'in başlatıcı kaspaz olmasının yanı sıra efektör rolü olabileceğini de ortaya koymuştur. JAR hücrelerinde tespit ettiğimiz nükleer kaspaz-8 immünreaktivitesi de ayrı bir çalışmanın konusunu oluşturabilir.

Apoptotik yolağın morfolojik bulgularının ortaya çıktığı evrelerinde mikroskopik incelemeler kullanılabilir. Bu amaçla propidium iodide ve DAPI kullanılan floresan boyalardır. Çalışmamızda 24 saatlik TNF- α uygulamasının yol açtığı apoptotik hücre ölümü DAPI işaretlenmeleriyle de gösterilmiştir.

Elde ettiğimiz bulgular, TNF- α uygulanarak oluşturulan oksidatif stresin; trofoblast kaynaklı JAR hücrelerinde NF- κ B immünreaktivitesini etkileyerek zamana bağlı değişime neden olduğunu, PTX'in mevcut ve TNF- α aracılı NF- κ B aktivitesi üzerinde etki gösterdiğini, TNF- α 'nın zamanla ters orantılı kaspaz-8 aktivitesine yol açtığını, apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu ve zamana bağımlı hücre proliferasyonu inhibisyonuna yol açtığını göstermektedir.

Sonuç olarak, trofoblast fonksiyonlarında TNF- α aracılı oksidatif stresin neden olduğu değişikliklerle ilişkili mekanizmada NF- κ B sinyal yolağı ve bu yolak üzerinde etki gösteren PTX'in preeklampsi benzeri plasental patolojilere klinik yaklaşımlar açısından yeni bir bakış kazandırabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. R. Madazlı. *Plasenta*. Nobel Tıp Kitabevleri, 2008; 11-58.
2. Gartner LP, Hiatt LJ. *Color Textbook of Histology*. 2nd. s.l. : Elsevier. 2001; 0-7216-8806-3.
3. Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci* 2007; 113(1):1-13.
4. Sadler TW. Çeviri Editörü: Başaklar AC. *Langman Medikal Embriyoloji*, 11.Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, 2011; 91-112.
5. Cross JC, Anson-Cartwright L, Scott IC: Transcription factors underlying the development and endocrine functions of the placenta. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 221-34.
6. Pijnenborg R, Vercruysse L, Brosens I. Deep placentation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011; 25(3):273-85.
7. Cetin I, Huppertz B, Burton G, Cuckle H, Gonen R, Lapaire O, Mandia L, Nicolaides K, Redman C, Soothill P, Spencer K, Thilaganathan B, Williams D, Meiri H. Pregenesys pre-eclampsia markers consensus meeting: What do we require from markers, risk assessment and model systems to tailor preventive strategies? *Placenta*. 2011; 32(1): 4-16.
8. Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia: Recent insights. *Hypertension*. 2005; 46(6):1243-9.
9. Mohaupt M. Molecular aspects of preeclampsia. *Mol Aspects Med* 2007; 28(2):169-91.
10. Burton GJ, Hung TH. Hypoxia-reoxygenation; a potential source of placental oxidative stress in normal pregnancy and preeclampsia. *Fetal Matern Med Rev* 2003; 14(2): 97-117.
11. Raijmakers TM, Dechend R, Poston L. Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials maarten. *Hypertension*. 2004; 44(4):374-80.
12. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: Challenging the current hypothesis. *Hypertension*. 2008; 51(4):970-5.
13. Mathiesen L, Berg G, Ernerudh J, Ekerfelt C, Jonsson Y, Sharma S. Immunology of preeclampsia. *Chem Immunol Allergy* 2005; 89:49-61.

14. Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, Rees A, Tiltman A, Vercruysse L, Assche VA. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1991; 98(7):648-55.
15. Neale D, Demasio K, Illuzi J, Chaiworapongsa T, Romero R, Mor G. Maternal serum of women with pre-eclampsia reduces trophoblast cell viability: Evidence for an increased sensitivity to fas mediated apoptosis. *J Maternal Fetal Neonatal Med* 2003; 13(1):39-44.
16. Many A, Hubel CA, Fisher SJ, Roberts JM, Zhou Y. Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *Am J Pathol* 2000; 156(1):321-331.
17. Walker JJ. Antioxidants and inflammatory cell response in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16(1):47-55.
18. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg* 2004; 15(1-2):91-96.
19. Redman CWG, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta*. 2000; 21(7):597-602.
20. Cindrova-Davies T. Gabor Than Award Lecture 2008; Pre-eclampsia—from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction. *Placenta*. 2009; 23:55–65.
21. Tergonkar V, Bottero V, Ikawa M, Li Q, Verma I.M. I κ B Kinase-independent I κ B α degradation pathway: functional NF- κ B activity and implications for cancer therapy. *Mol Cell Biol* 2003; 23(22):8070-83.
22. Rinehart BK, Terrone DA, Lagoo-Deenadayalan S, Barber WH, Hale EA, Martin JN, Bennett WA. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor α , interleukin 1 β and interleukin 10 is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181(4):915-20.
23. Rahman I, Gilmour PS, Jimenez LA, MacNee W. Oxidative stress and TNF- α induce histone acetylation and NF- κ B/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: Potential mechanism in gene transcription in lung inflammation. *Mol Cell Biochem* 2002; 234-235(1-2):239-48.
24. Chen G, Wilson R, Cumming G, Walker JJ, McKillop JH. Immunological changes in pregnancy-induced hypertension. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1994; 53(1):21-25.

25. Zargari O. Pentoxifylline: A drug with wide spectrum applications in dermatology. *Dermatol Online Journal* 2008; 15;14(11):2.
26. Ji Q, Zhang L, Jia H, Yang J, Xu J. Pentoxifylline inhibits endotoxin-induced NF-kappa B activation and associated production of proinflammatory cytokines. *Ann Clin Lab Sci* 2004; 34(4):427-36.
27. Hochberg A, Rachmilewitz J, Eldar-Geva T, Salant T, Schneider T, Groot N. Differentiation of choriocarcinoma cell line (JAR). *Cancer Res* 1992; 52(13):3713-3717.
28. Pattillo RA. The JAR cell line - continuous human multihormone production and controls. *In Vitro* 1971; 6:398-399.
29. Kitano T, Iizasa H, Hwang IW, Hirose Y, Morita T, Maeda T, Nakashima E. Conditionally immortalized syncytiotrophoblast cell lines as new tools for study of the blood-placenta barrier. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(6):753-759.
30. Seçkin İ. ve ark, Embriyoloji Ders Kitabı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları, 2008; 21-90.
31. Frost JM, Moore GE. The Importance of imprinting in the human placenta. *PLoS Genet* 2010; 6(7): 1001-1015.
32. Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 20;3:56.
33. Cross JC, Baczyk D, Dobric N, Hemberger M, Hughes M, Simmons DG, Yamamoto H, Kingdom JC. Genes, development and evolution of the placenta. *Placenta*. 2003; 24:123-30.
34. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*. 1994; 266: 1508-18.
35. Benirschke K. Remarkable placenta. *Clin Anat* 1998; 11:194-205.
36. Pijnenborg R, Vercruysse L. A.A.W. Hubrecht and the naming of the trophoblast. *Placenta*. 2013; 34(4):314-9.
37. Placenta. (Erişim Tarihi: 30.07.2013), bio1152.nicerweb.com.
38. Moffett A, Loke, C, McLaren A. *Biology and Pathology of Trophoblast*. Cambridge University Press, 2006.
39. Bischof P, Irminger-Finger I. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 1-16.

40. Pollheimer J, Knofler M. Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta*. 2005; 26:21-30.
41. Chakraborty C, Gleeson LM, McKinnon T, Lala PK. Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 116-24.
42. Loke YW, King, A. *Human Implantation: Cell Biology and Immunology*. Cambridge University Press, 1995.
43. Kliman.HJ. The placenta revealed. *American Journal of Pathology* 1993; 143(2).
44. Staun-Ram E, Goldman S, Shalev E. Ets-2 and p53 mediate cAMP-induced MMP-2 expression, activity and trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:135.
45. Kierszenbaum AL, Çeviri Editörü: Demir R, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi/ Patolojiye Giriş*, Palme Yayıncılık, 2006; 586-603.
46. Zhou Z, Zhang Q, Lu X, Wang R, Wang H, Wang YL, Zhu C, Lin HY, Wang H. The proprotein convertase furin is required for trophoblast syncytialization. *Cell Death Dis* 2013; 4(4): 593.
47. Carlson BM. *Extraembryonic membranes and placenta in “patten’s foundations of embryology”*. 6th Edition, McGraw-Hill, 1996; 90-255.
48. Jameson JL, Hollenberg AN. Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. *Endocr Rev* 1993; 14: 203-21.
49. Malassine A, Frendo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update* 2003; 9(6):531-539.
50. Fisher SJ, Damsky CH. Human cytotrophoblast invasion. *Semin Cell Biol* 1993; 4: 183-8.
51. Nishimura T, Dunk C, Lu Y, Feng X, Gellhaus A, Winterhager E, Rossant J, Lye SJ. Gap junctions are required for trophoblast proliferation in early human placental development. *Placenta*. 2004; 25: 595-607.
52. Genbacev O, McMaster MT, Fisher SJ. A repertoire of cell cycle regulators whose expression is coordinated with human cytotrophoblast differentiation. *Am J Pathol* 2000; 157: 1337-51.
53. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 1997; 99: 2139-51.
54. Rıza Demir. İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi. *Palme Yayıncılık*. 78-251.

55. Placenta and extraembryonic membrane. (Erişim Tarihi 27.06.2013), www.med.umich.edu.
56. Kingdoma J, Huppertz B, Seaward S, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gyn R B* 2000; 92.
57. Castellucci M, Kosanke G, Verdenelli F, Kaufmann P. Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Hum Reprod* 2000; 6 (5):485-494.
58. Castellucci M, Scheper M, Scherren I. The development of the human placental villous tree. *Anat Embryology* 1990; 182:117-128.
59. Benirschke K, Kaufmann P. *Pathology of the Human Placenta*. 4th. Edition. Springer New York, 2000. 29-571.
60. Kaufmann P, Castellucci M. Extravillous trophoblast in the human placenta. *Trophob Res* 1997; 10:21-65.
61. Demir R, Kosanke G, Kohnen G, Kertschanska S, Kaufmann P. Classification of human placental stem villi: Structural and functional aspects-a review. *Microsc Res Tech* 1997; 38:29-41.
62. Schoenwolf GC, Francis-West PH, Philip Brauer R , Bleyl SB. Larsen's human embryology 4th ed. Philadelphia, PA: *Elsevier/Churchill Livingstone* 2009.
63. Keith L.Moore T.V.N.P., Çeviri Editörleri Dalçık H, Yıldırım M., *Klinik yönleriyle insan embriyolojisi*, 8. İngilizce Baskıdan çeviri, Nobel Tıp Kitapevleri, 96-143.
64. Jukim Y. Pathogenesis and promising non-invasive markers for preeclampsia. *Obstet Gynecol Sci* 2013; 56(1):2-7.
65. Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvascular Research* 2008; 75:1-8.
66. Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, Schulz LC, Danny J. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis Model Mech* 2012; 5:9-18.
67. Orendi K, Kivity V, Sammar M, Grimpel Y, Gonen R, Meiri H, Lubzens E, Huppertz B. Placental and trophoblastic in vitro models to study preventive and therapeutic agents for preeclampsia. *Placenta*. 2011; 32:49-54.
68. Healthy and preeclampsia placenta. (Erişim Tarihi 17.07.2013) www.nichd.nih.gov.
69. Mihiu D, Costin N, Blaga LD, Ciuchină S, Pop RB. Implication of tumor necrosis factor - alpha in preeclampsia. *Appl Med Inform* 2008; 23(3)(4):11–18.

70. Hertig A, Liere P. New markers in preeclampsia. *Clin Chim Acta* 2010; 11; 411(21-22):1591-5.
71. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, Assche VA. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101(8):669-74.
72. Chen G, Wilson R, Wang SH, Zheng HZ, Walker JJ, McKillop JH. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene polymorphism and expression in preeclampsia. *Clin Exp Immunol* 1996; 104:154-9.
73. Wang Y, Walsh SW. TNF alpha concentrations and mRNA expression are increased in preeclamptic placentas. *J Reprod Immunol* 1996; 32:157-69.
74. Haider S, Knofler M. Human Tumour Necrosis Factor: Physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta*. 2009; 30: 111-123
75. Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass K, Chun SH, Fisher SJ. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am J Pathol* 1997; 151(6): 1809-1818.
76. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 2009; 33(3):130-7.
77. O'Brien TE, Ray JG, Chan WS. Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview. *Epidemiology*. 2003; 14(3):368-74.
78. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004; 122:369–382.
79. Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rogers GM, McLaughlin MK. Lipid peroxidation in pregnancy: New perspectives on preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161(4):1025-34.
80. Bourdon E, Blache D. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3:293-311.
81. England K, Cotter TG. Direct oxidative modifications of signalling proteins in mammalian cells and their effects on apoptosis. *Redox Rep* 2005; 10:237–45.
82. Cross JV, Templeton DJ. Regulation of signal transduction through protein cysteine oxidation. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8:1819-27.
83. Poston L, Igosheva N, Mistry HD, Seed PT, Shennan AH, Rana S, Karumanchi SA, and Lucy C Chappell LC. Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders. *Am J Clin Nutr* 2011; 94:1980-5.

84. Zusterzeel PL, Rutten H, Roelofs HM, Peters WH, Steegers EA. Protein carbonyls in decidua and placenta of pre-eclamptic woman as markers for oxidative stress. *Placenta*. 2001; 22:213-219.
85. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3:28.
86. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011; 25(3): 287-299.
87. Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F. The molecular action of tumor necrosis factor- α . *Eur J Biochem* 1991; 202:3-14.
88. Beutler B, Cerami A. Cachectin--Tumour necrosis factor: A cytokine that mediates injury initiated by invasive parasites. *New Engl J Med* 1987; 316,379- 385.
89. Kriegler M, Perez C, De Fay K, Albert T, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 1988; 53:45-53.
90. Fukushima K, Miyamoto S, Komatsu H, Tsukimori K, Kobayashi H, Seki H, Takeda S, Nakano H. TNF α -induced apoptosis and integrin switching in human extravillous trophoblast cell line. *Biol Reprod* 2003; 68(5):1771-8.
91. Beutler B. Cerami A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:625-55.
92. Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2006; 11:47-55.
93. Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992; 13:151-153.
94. Calleja-Agius J, Jauniaux E, Muttukrishna S. Placental villous expression of TNF α and IL-10 and effect of oxygen tension in euploid early pregnancy failure. *Am J Reprod Immunol* 2012; 67(6):515-25.
95. Esposito E, Cuzzocrea S. TNF- α as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma. *Curr Med Chem* 2009; 16(24):3152-67.
96. Ashkenazi A, Dixit VM. Death Receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281(5381):1305-1308.
97. Serin IS, Özçelik B, Basbug M, Kiliç H, Okur D, Erez R. Predictive value of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in preeclampsia. *Reprod Biol* 2002; 100(2):143-145.

98. Seki H, Matuoka K, Inooku H, Takeda S. TNF- α from monocyte of patients with preeclampsia induced apoptosis in human trophoblast cell line. *J Obstet Gynaecol Res* 2007; 33(4): 408-416.
99. Carpentier PA, Dingman AL, Palmer TD. Placental TNF signaling in illness-induced complications of pregnancy. *Am J Pathol* 2011; 178(6).
100. Pollice PF, Rosier RN, Looney RJ, Puzas JE, Schwarz EM, O'Keefe RJ. Oral pentoxifylline inhibits release of tumor necrosis factor-alpha from human peripheral blood monocytes: A potential treatment for aseptic loosening of total joint components. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83(7):1057-61.
101. Kupsakova I, Docolomansky P, Rybar A. Carbonyl group of aliphatic side chain of pentoxifylline does not play role for P-glycoprotein antagonizing effect of pentoxifylline. *Gen Physiol Biophys* 2002; 21:471-478.
102. Tuckey JA, Parry BR, McCall JL. Methylxanthines in surgery: a bright future? *Austr NZ J Surg* 1992; 62:250-5.
103. Samlaska CP, Winfield EA. Pentoxifylline. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30:603-621.
104. Leenen D, Poll T, Levi M, Ten-Cate H, Deventer SJ, Hack CE, Aarden LA, Ten-Cate JW. Pentoxifylline attenuates neutrophil activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Immunol* 1993; 151:2318-2325.
105. Aviado DM, Porter JM. Pentoxifylline: a new drug for the treatment of intermittent claudication. Mechanism of action, pharmacokinetics, clinical efficacy and adverse effects. *Pharmacotherapy* 1984; 4:297-307.
106. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs*. 1987; 34:50-97.
107. Rieckmann P, Weber F, Gunther A *et al.* Pentoxifylline, a phosphodiesterase inhibitor, induces immune deviation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1996; 64:193-200.
108. Martins AMC, Nobre ACL, Almeida AC *et al.* Thalidomide and pentoxifylline block the renal effects of supernatants of macrophages activated with crotalus durissus cascavella venom. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37:1525-1530.
109. Lin HI, Chu SJ, Wang D, Feng NH. Pharmacological modulation of TNF production in macrophages. *J Microbiol Immunol Infect* 2004; 37:8-15.
110. Pentoksifilin Kimyasal Yapısı. (Erişim Tarihi 13.06.2013), www.ilactr.com.

111. Luehrmann JS, Ghosh S. Antigen-receptor signaling to nuclear factor κ B. *Immunity*. 2006; 25:701-715.
112. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Guis JM. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005; 446:475-482.
113. Lovas A, Weidemann A, Albrecht D, Wiechert L, Weih D, et al. p100 deficiency is insufficient for full activation of the alternative NF- κ B pathway: TNF cooperates with p52-RelB in target gene transcription. *PLoS ONE* 2012; 7(8): 427-41.
114. Neurath MF, Becker C, Barbutescu K. Role of NF- κ B in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut*. 1998; 43:856-860.
115. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev* 2004;18: 2195-2224
116. Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006; 25:6680-6684.
117. Li N, Karin M. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *Faseb J* 1999; 13(10):1137-43.
118. Barre B, Perkins ND. A cell cycle regulatory network controlling NF- κ B subunit activity and function. *EMBO J* 2007; 26:4841-4855.
119. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-1462
120. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. Review. *Nature*. 1992; 356(6368):397-400.
121. Offen D, Elkon H, Melamed E. Apoptosis as a general cell death pathway in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm Suppl* 2000; (58):153-66.
122. Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 1995; 146:3-15.
123. Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis, the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews* 1993; 14:133-144.
124. Ishizaki Y, Cheng L, Mudge AW, Raff MC. Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts and cancer cells. *Mol Bio Cell* 1995; 6(11):1443-1458.
125. Lambole C, Bringuier AF, Feldmann G. Induction of apoptosis in normal cultured rat hepatocytes and in Hep3B, a human hepatoma cell line. *Cell Biol Toxicol* 2000; 16(3):185-200.
126. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett* 2006; 11(4):506-525.

127. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22:299–306.
128. Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6(7):644–651.
129. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996; 85:803–815.
130. Muzio M., Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell*. 1996; 14;85(6):817-27.
131. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14(22):5579-5588.
132. Qin, Z. H., Wang, Y., Kikly, K. K., Sapp, E., Kegel, K. B., Aronin, N., and Di Figlia, M. Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J Biol Chem* 2001; 276, 8079–8086.
133. Sanchez I, Xu CJ, Juo P, Kakizaka A, Blenis J, Yuan J. Caspase-8 Is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron*. 1999; 22: 623-633.
134. Hartmann A, Troadec JD, Hunot S, Kikly K, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Agid Y, Hirsch EC. Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *J Neuro Sci* 2001; 21:2247-2255.
135. Benchoua A, Couriaud C, Guégan C, Tartier L, Couvert P, Friocourt G, Chelly J, Ménissier-de Murcia J, Onténiente B. Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly (ADP-ribose) polymerase-2. *J Biol Chem* 2002; 277:34217-34222.
136. Kruidering M, Evan GI. Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end" ? *IUBMB Life* 2000; 50(2):85-90.

137. Besnault-Mascard L, Leprince C, Auffredou MT, Meunier B, Bourgeade MF, Camonis J, Lorenzo HK, Vazquez A. Caspase-8 sumoylation is associated with nuclear localization. *Oncogene*. 2005; 24:3268-3273.
138. Kawahara A, Ohsawa Y, Matsumura H, Uchiyama Y, Nagata S. Caspase-independent cell killing by fas-associated protein with death domain. *J Cell Biol* 1998; 143(5):1353-1360.
139. Gauster M, Huppertz B. The paradox of caspase 8 in human villous trophoblast fusion. *Placenta*. 2010; 31(2):82-8.
140. Bodey B, Bodey V, Siegel, Nasır A, Coppola D, Hakam A, Kaiser H. Immunocytochemical detection of members of the caspase cascade of apoptosis in high-grade astrocytomas. *In vivo* 2004; 18: 593-602.
141. Shankland SJ, Wolf G. Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation and apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278(4):515-529.
142. Junquiera LC, Carneiro J, Çeviri Editörleri: Aytekin Y, Solakoğlu S, *Temel Histoloji*, 10. Baskıdan Çeviri, Nobel Tıp Kitapevleri, 2006, 57- 63.
143. Michelle D. Garrett. Cell cycle control and cancer. *Curr Sci* 2001; 81:515-522.
144. Foster I. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*. 2008; 14:144-149.
145. Giovanni Maga and Ulrich Hübscher. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 2003; 116, 3051-3060.
146. Shivji MKK, Kenny MK, Woods RD. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell*. 1992; 69:367-374.
147. Bravo, R. and H. Macdonald-Bravo, Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *EMBO J* 1985; 4(3): p. 655-61.
148. Almendral J, Huebsch M, Blundell PA, Macdonald-Bravo H, Bravo R. Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: homology with DNA-binding proteins. *P Natl Acad Sci* 1987; 84:1575-1579.
149. 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, 1096–1102.

150. Krishna TSR, Kong XP, Gary S, Burger PM, Kuriyan J. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell*. 1994; 79:1233–1243.
151. Essers J, et al. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol* 2005; 25(21):9350-9.
152. Paunesku T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol* 2001; 77(10):1007-1021.
153. Liu HN, Cai JT, Lin QH, He KR, Yu R. Expression of caveolin-1 and the invasion of choriocarcinoma. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2008; 33(4):331-7.
154. Aplin JD. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 1991; 99, 681-692.
155. Rangamani P, Sirovich L. Survival and Apoptotic Pathways Initiated By TNF- α : Modeling and Predictions. *Biotechnol Bioeng* 2007; 97(5):1216-29.
156. Jiang ZY, Guo YY, Ren HB, Zou YF, Fan MS, Lv Y, Han P, De W, Sun LZ. Tumor necrosis factor (TNF)- α upregulates progesterone receptor-A by activating the NF- κ B signaling pathway in human decidua after labor onset. *Placenta*. 2012; 33(1):1-7.
157. Renaud SJ, Postovit LM, Macdonald-Goodfellow SK, McDonald GT, Caldwell JD, Graham CH. Activated macrophages inhibit human cytotrophoblast invasiveness in vitro. *Biol Reprod* 2005; 73(2):237-43.
158. Cohen M, Meisser A, Haenggeli L, Bischof P. Involvement of MAPK pathway in TNF- α induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod* 2006; 12(4): 225–232.
159. Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, Maitra A, Reddy JL, Matta H, Miyajima K, Timmons CF, Tomlinson GE, Mastrangelo D, Hay RJ, Chaudhary PM, Gazdar AF. Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res* 2002; 15;62(20):5897-901.
160. Chen Y, Tu C, Hung K, Wu K, Tsai T, Hsieh B. Inhibition by pentoxifylline of TNF- α stimulated fractalkine production in vascular smooth muscle cells: evidence for mediation by NF- κ B down-regulation. *Brit J Pharmacol* 2003; 138, 950-958.

- 161.Deree J, Martins JO, Melbostad H, Loomis WH, Coimbra R. Insights into the regulation of TNF- α production in human mononuclear cells: The effects of non-specific phosphodiesterase inhibition. *Clinics*. 2008; 63(3):321-8.
- 162.Caballero I, Ghareeb SA, Basatvat S, Sánchez-López JA, Montazeri M, Maslehat N, Elliott S, Chapman NR, Fazeli A. Human trophoblast cells modulate endometrial cells nuclear factor κ B response to flagellin in vitro. *PLoS ONE* 2013; 8(1): 394-41.
- 163.Li X, Zhao Y, Zhang Y, Du N, Ren H. Tumor necrosis factor α stimulates Her-2 cleavage by activated caspase-8. *Cell Physiol Biochem* 2012; 30(4):889-97.
- 164.Rokhlin OW, Glover RA, Cohen MB. Fas-mediated apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines occurs via activation of caspase-8 and caspase-7. *Cancer Res* 1998; 58:5870-5875.
- 165.Gu C, Casaccia-Bonofil P, Srinivasan A, Chao MV. Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase Activation. *J Neurosci* 1999; 15;19(8):3043-9.
- 166.Czeczuga-Semeniuk E, Wołczyn'ski S, Dabrowska M, Dzieciol J, Anchim T. The effect of doxorubicin and retinoids on proliferation, necrosis and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol* 2004; 42(4):221-227.
- 167.Guzel E, Basar M, Ocak N, Arici A, Kayisli UA. Bidirectional interaction between unfolded-protein-response key protein HSPA5 and estrogen signaling in human endometrium. *Biol Reprod* 2011; 85:121-7.
- 168.Ji L, Brkić J, Liu M, Fu G, Peng C, Wang YL. Placental trophoblast cell differentiation: Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol Aspects Med* 2013; 34(5):981-1023.
- 169.Li P, Guo W, Du L, Zhao J, Wang Y, Liu L, Hu Y, Hou Y. MicroRNA-29b contributes to pre-eclampsia through its effects on apoptosis, invasion and angiogenesis of trophoblast cells. *Clin Sci* 2013;124(1):27-40.
- 170.Smárasón AK, Sargent IL, Starkey MP, Redman CW. The effect of placental syncytiotrophoblast microvillous membranes from normal and pre-eclamptic women on the growth of endothelial cells in vitro. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100(10):943–949.
- 171.Geusens N, Hering L, Verlohren S, Luyten C, Drijkoningen K, Taube M, et al. Changes in endovascular trophoblast invasion and spiral artery remodelling at term in a transgenic preeclamptic rat model. *Placenta*. 2010; 31:320-6.

- 172.Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2003; 59:167-173.
- 173.Redman CW. Immunological aspects of pre-eclampsia. *Baillier Clin Ob Gy* 1992; 3:601-615.
- 174.Conrad KP, Benyo DF. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37:240-9.
- 175.Conrad KP, Miles TM, Benyo DF. Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1998; 10:102-11.
- 176.Sampaio EP, Moraes MO, Nery JA, Santos AR, Matos HC, Sarno EN. Pentoxifylline decreases in vivo and in vitro tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). *Clin Exp Immunol* 1998; 111(2):300-8.
- 177.Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:649–681.
- 178.Winyard PG, Blake DR. Antioxidants, redox-regulated transcription factors, and inflammation. *Adv Pharmacol* 1997; 38:403-421.
- 179.Vaughan JE, Walsh SW. Activation of NF- κ B in placentas of women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2012; 31(2): 243-251.
- 180.Hansen JM, Moriarty-Craige S, Jones DP. Nuclear and cytoplasmic peroxiredoxin-1 differentially regulate NF- κ B activities. *Free Radical Bio Med* 2007;43:282-288.
- 181.Ilad RS, Fleming SD, Murphy CR, Fazleabas AT. Immunohistochemical study of the ubiquitin-nuclear factor- κ B pathway in the endometrium of the baboon (*Papio anubis*) with and without endometriosis. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22(7):1118-30.
- 182.Huxford T, Huang DB, Malek S, Ghosh G. The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. *Cell*. 1998;95:759-70.
- 183.Malek S, Chen Y, Huxford T, Ghosh G. I κ B β , but not I κ B α , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimers by masking both NF- κ B nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem* 2001; 276:45225–35.
- 184.Verma IM. Nuclear factor (NF)- κ B proteins: Therapeutic targets. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:57-61.

185. Lessard L, Bégin LR, Gleave ME, Mes-Masson AM, Saad F. Nuclear localisation of nuclear factor-kappaB transcription factors in prostate cancer: An immunohistochemical study. *Brit J Cancer* 2005; 93:1019-1023.
186. Lee SH, Hannink M. Characterization of the nuclear import and export functions of IkappaB (epsilon). *J Biol Chem* 2002; 22:22.
187. Swinney DC, Xu YZ, Scarafia LE, Lee I, Mak AY, Gan QF, et al. A small molecule ubiquitination inhibitor blocks NF-kappa B-dependent cytokine expression in cells and rats. *J Biol Chem* 2002; 277:23573–81.
188. Martino RB, Coelho AMM, Kubrusly MS, Leitão R, Sampietre SN, Machado MCC, Bacchella T, D’Albuquerque LAC. Pentoxifylline improves liver regeneration through downregulation of TNF- α synthesis and TGF- β 1 gene expression. *World J Gastrointest Surg* 2012; 27;4(6):146-151.
189. Kamran MZ, Gude RP. Preclinical evaluation of the antimetastatic efficacy of Pentoxifylline on A375 human melanoma cell line. *Biomed Pharmacother* 2012; 66(8):617-626.
190. Cai Z, Capoulade C, Moyret-Lalle C, Amor-Gueret M, Feunteun J, Larsen AK, Paillerets BB, Chouaib S. Resistance of MCF7 human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function. *Oncogene*. 1997; 4;15(23):2817-26.
191. Kuninaka S, Yano T, Yokoyama H, Fukuyama Y, Terazaki Y, Uehara T, Kanematsu T, Asoh H, Ichinose Y. Direct influences of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNF-alpha, IL-6) on the proliferation and cell-surface antigen expression of cancer cells. *Cytokine*. 2000; 12(1):8-11.
192. Alexandrakis MG, Passam FH, Dambaki K, Passam AM, Nalbanti F, Stathopoulos ES, Kyriakou DS. The assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining in myelodysplastic syndromes and its prognostic significance. *Eur J Histochem* 2005; 49(1):27-32.
193. Yang P, Peairs JJ, Tano R, Zhang N, Tyrell J, Glenn J, Jaffe GJ. Caspase-8-mediated apoptosis in human RPE cells. *Invest Ophth Vis Sci* 2007; 48(7):3341-9.
194. Wang L, Du F, Wang X. TNF- α Induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*. 2008; 133:693-703.

195. Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N, Huppertz B. Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ* 2004; 11:90-98.
196. Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG, Guilbert LJ. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta*. 1994; 15:819-835.
197. Phillips TA, Ni J, Hunt JS. Death-inducing tumour necrosis factor (TNF) superfamily ligands and receptors are transcribed in human placentae, cytotrophoblasts, placental macrophages and placental cell lines. *Placenta*. 2001; 22:663-672.
198. Huppertz B, Frank HG, Kingdom J, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol* 1998; 110:495-508.
199. Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korr H, Kaufmann P. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: Analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Invest* 1999; 79:1687–1702.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Erengül	Soyadı	Tokay
Doğ.Yeri	Prizren	Doğ.Tar.	17.09.1984
Uyruğu	Kosova	TC Kim No	
Email	Erengul18@hotmail.com	Tel	05546474313

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.	2013
Lisans	Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Con Buzuku Fen Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	Orta	İyi		
Sırpça	Çok iyi	İyi	Çok iyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	Çok iyi
MS Excell	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

ULUSAL BİLDİRİLER

- 1) İlkay Özdemir, Murat Başar, Erengül Tokay, Birsen Durmazkeser, Nihal Koç, Murat Mengi, Halil Tunalı, Oktay Arda. Kronik Alkol Tüketimine Bağlı Oluşan Böbrek Hasarında PARP 1'in Rolü. Türk Elektron Mikroskopi Derneği 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. 2011 Kemer Antalya (Sözlü Bildiri)
- 2) Nihal Koç, Murat Mengi, Erengül Tokay, Aslı Gümüşel, Halil Tunalı. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı oluşturulmuş deneysel sıçan modelinde endoplazmik retikulum stresi, GRP78 ve Defibrotid'in etkisi. 6-10 Ekim 2012 Türkiye Solunum Araştırmaları Derneği 34. Ulusal Kongresi.
- 3) Sonmez A, Tokay E, Yaprak E. Hyperglycemia affects the cytotoxicity of cancer agents in C6 glioma cells: Ifosfamide and etoposide. May 3-4-5 2013 4th International Medical Students Research Congress. Istanbul-Turkey.

ULUSLARARASI BİLDİRİLER

1. Sonmez A, Tokay E, Yaprak E. Hyperglycemia affects the cytotoxicity of ifosfamide and etoposide in C6 glioma cells. 4-7 september 2013 24th European Students Conference. Berlin-Germany

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Yüzme

El sanatları

Dağcılık