



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***İN VİTRO* PREEKLAMPSİ MODELİNDE
TÜNEL OLUŞTURAN NANOTÜPLERİN (TNT) VE
WNT/ β -KATENİN SİNYAL YOLAĞININ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Gizem İLTER AKTAŞ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

Ankara, 2023

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***İN VİTRO* PREEKLAMPSİ MODELİNDE
TÜNEL OLUŞTURAN NANOTÜPLERİN (TNT) VE
WNT/ β -KATENİN SİNYAL YOLAĞININ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Gizem İLTER AKTAŞ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

**Bu araştırma; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2244 nolu proje ile
desteklenmiştir.**

Ankara, 2023

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İn Vitro Preeklampsi Modelinde Tünel Oluşturan Nanotüplerin (TNT) ve
Wnt/ β -Katenin Sinyal Yolağının Rolünün Araştırılması

Gizem İLTER AKTAŞ

Doktora Tezi

02.02.2023

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Habibe Meltem ÖZGÜNER

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Habibe Meltem ÖZGÜNER

Prof. Dr. Sevil ÇAYLI

Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI

Prof. Dr. Oya EVİRGEN

Dr. Öğr. Üyesi Şule KIZIL

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Doktora derecesi için
gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Doç. Dr. Sena KAPLAN
Enstitü Müdürü

Bu tezin Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

02.02.2023

Gizem İLTER AKTAŞ



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin ilk gününden beri beni destekleyen, akademik bilgisinin yanı sıra hayata dair tecrübelerinden ve güçlü duruşundan her zaman ilham alacağım, bana her zaman yol gösterecek bir ışık olan çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Habibe Meltem ÖZGÜNER'e,

Her zaman bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, doktora eğitim hayatım boyunca çok şey öğrendiğim ve desteğini hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sevil ÇAYLI'ya, çok değerli tecrübeleriyle yol gösteren, farklı bakış açıları kazandıran ve her zaman desteğini hissettiren Prof. Dr. Çevik TUFAN'a, doktora eğitimim ve tez sürecim boyunca bilgisi ve desteğiyle hep yanımda olan Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI'ya, benden bilgi, yardım ve güler yüzünü hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Hilal NAKKAŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Bahar KARTAL'a, destekleri ve yardımlarıyla her zaman yanımda olduklarını hissettiren bölüm arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Tuba ÖZDEMİR SANCI, Dr. Öğr. Üyesi Ebru Alimoğulları ve Dr. Öğr. Üyesi İlkay PİŞKİN'e,

Doktora eğitimim sayesinde tanıştığım, çok güzel anılar biriktirdiğim ve desteği sayesinde tez sürecimdeki her zorluğu beraber aştığım kıymetli bölüm arkadaşım Arş. Gör. Şeyma KİPEL'e, kendisinden kısa sürede çok şey öğrendiğim için şanslı hissettiğim, akademik bilgi ve yeteneklerini her zaman örnek alacağım Dr. Cansu ŞAHİN'e ve birlikte eğitim almaktan mutluluk duyduğum Dr. Gülben AKCAN, Dr. Büşranur ÖZALPER, Andaç KİPALEV NEŞELİOĞU, Simge ÇELEBİ AYLAN ve bütün değerli bölüm arkadaşlarıma, tez sürecimde yardım ve destekleriyle hep yanımda olan Translasyonel Tıp Anabilim Dalı'ndan değerli asistan arkadaşlarım Kübra FİDAN KAYA ve Büşra GÖRGÜN'e,

Bana her zaman sonsuz sevgileriyle destek olan biricik annem ve babama,

Sevgisi ve desteğiyle hayatımın her anında yol arkadaşı olan sevgili eşime,

Sonsuz teşekkürlerimle..

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Embriyonik Gelişimin Başlangıcı	3
2.2. Plasenta.....	3
2.2.1. Plasenta Yapısı	4
2.2.2. Plasenta Gelişimi	6
2.2.3. Trofoblast Hücrelerinin Gelişimi	7
2.2.4. Spiral Arterlerin Yeniden Şekillenmesi.....	8
2.3. Preeklampsi	9
2.4. Hipoksi	12
2.4.1. Tanımı ve Tarihçesi.....	12
2.4.2. Hipoksi Mekanizması.....	12
2.4.3. Hipoksinin Önemi ve Hastalıklardaki Rolü	13
2.5. Preeklampsi ve Hipoksi.....	14
2.6. Wnt Sinyal Yolağı.....	15
2.6.1. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı.....	16
2.6.2. Trofoblastlarda Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı	18
2.7. Tünel Oluşturan Nanotüpler.....	20

3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Materyaller	24
3.1.1. Hücre Hatları	24
3.1.2. Hücre besiyerleri	24
3.1.3. Antikorlar	24
3.1.4. Mikroskoplar	25
3.1.5. Kullanılan Diğer Kimyasallar ve Solüsyonlar.....	25
3.2. Yöntemler.....	26
3.2.1. Hücre Kültürü.....	26
3.2.2. Morfolojik Değerlendirme.....	26
3.2.3. Hipoksi İndüklemesi.....	27
3.2.4. Akım Sitometri ile Hücre Canlılık Analizi.....	28
3.2.5. Western Blot Analizi için Örneklerin Hazırlanması	30
3.2.6. BCA Assay ile Protein Miktar Tayini	30
3.2.7. Western Blot Analiz Protokolü	31
3.2.8. İmmün İşaretleme Yöntemi.....	32
3.2.9. İmmünfloresan Boyama Yöntemi	33
3.2.10. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR	36
4.1. Morfolojik Değerlendirme Bulguları	36
4.2. HIF-1 α Protein Ekspresyonunun Western Blot Analizi ile Değerlendirilmesi.....	39
4.3. Akım Sitometrisi ile Canlılık Analizi Bulguları	42
4.4. İmmün İşaretleme ile HIF-1 α Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	44
4.5. Tünel Oluşturan Nanotüp (TNT) Oluşumlarının Değerlendirilmesi.....	48
4.6. Wnt-1 ve β -katenin Protein Ekspresyonlarının Western Blot Analizi ile Değerlendirilmesi	58

4.7. Wnt-1 ve β -katenin Protein Ekspresyonlarının İmmün İşaretleme ile Değerlendirilmesi	60
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
7. KAYNAKLAR.....	75
8. EKLER.....	86
EK-1. Özgeçmiş	86



ÖZET

***In Vitro* Preeklampsi Modelinde Tünel Oluşturan Nanotüplerin (TNT) ve Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağının Rolünün Araştırılması**

Preeklampsi, anormal plasenta gelişimi nedeniyle ortaya çıkan gebeliğe özgü bir hastalıktır. Preeklampsinin mekanizması hakkında az şey bilinmekte olup kesin bir tedavisi de bulunmamaktadır. Hipoksi preeklampsi patofizyolojisinde önemli rol oynar. Hücreler arası iletişimin hastalıklardaki önemi bilinmektedir. Tünel oluşturan nanotüpler (TNT) yeni bir iletişim mekanizması olarak dikkat çekmektedir. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının preeklampsi patofizyolojisinde rol alabileceğini gösteren az sayıda çalışma mevcuttur.

Çalışmamızda *in vitro* preeklampsi modeli oluşturmak amacıyla HTR-8/SVneo ve JEG-3 hücre hatlarında CoCl₂ (kobalt klorür) ile hipoksi oluşturulmuştur. Hücrelerdeki HIF-1 α (Hipoksi indüklenebilir faktör-1 alfa) protein düzeyleri Western blot ve immün işaretleme yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Hücreler arasındaki TNT oluşumları immüno floresan boyama ile değerlendirilmiştir. Wnt-1 ve β -katenin düzeyleri Western blot ve immün işaretleme yöntemleri ile araştırılmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel analizler kullanılarak anlamlılık düzeyleri değerlendirilmiştir.

Hipoksi oluşturulan hücrelerde HIF-1 α 'nın normoksiye kıyasla arttığı belirlenmiştir. Hipoksik HTR-8/SVneo hücrelerinde TNT sayısında ve uzunluklarında artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hipoksizde Wnt-1 ve β -katenin protein ekspresyon düzeylerinin HTR-8/SVneo hücrelerinde anlamlı olarak azaldığı, JEG-3 hücrelerinde ise anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir.

Bu bulgular ışığında, hipoksinin ve HIF-1 α 'nın preeklampside önemli bir role sahip olduğu tespit edildi. Hücreler arası iletişimde yeni bir mekanizma olan TNT'lerin preeklampsi patofizyolojisinde önemli bir katkısının olabileceği ilk kez bu çalışma ile gösterildi. Ayrıca Wnt/ β -katenin sinyal yolağının preeklampsi mekanizmasında etkili bir role sahip olduğu *in vitro* olarak belirlenmekle birlikte ileride yapılacak kapsamlı çalışmalarla preeklampsi için terapötik olarak hedeflenebileceği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Hipoksi, Preeklampsi, Tünel oluşturan nanotüpler, Wnt/ β -katenin.

ABSTRACT

Investigating the Role of Wnt/ β -catenin Signalling Pathway and Tunneling Nanotubes in an *in vitro* Preeclampsia Model

Preeclampsia is a pregnancy-specific disease caused by abnormal placental development. Little is known about the mechanism of preeclampsia and even further there is no effective treatment. Hypoxia plays an important role in the pathophysiology of preeclampsia. The importance of intercellular communication in diseases is well-known. Tunneling nanotubes (TNTs) attract attention as a new intercellular communication mechanism. There are few studies showing that the Wnt/ β -catenin signaling pathway may play a role in the pathophysiology of preeclampsia.

In our study, hypoxia was induced with CoCl₂ (Cobalt chloride) in HTR-8/SVneo and JEG-3 cell lines to create an *in vitro* preeclampsia model. HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 alpha) protein levels in cells were examined using Western blot and immunolabeling methods. Intercellular TNT formations were evaluated by immunofluorescence staining. Wnt-1 and β -catenin levels were investigated by Western blot and immunolabeling methods. The significance levels of the obtained data were evaluated using statistical analysis.

It was determined that HIF-1 α increased in hypoxia-induced cells compared to normoxia. It has been shown that there is an increase in TNT number and length in hypoxic HTR-8/SVneo cells. In addition, it was determined that Wnt-1 and β -catenin protein expression levels in hypoxia were significantly decreased in HTR-8/SVneo cells and increased significantly in JEG-3 cells.

In the light of these findings, it was concluded that hypoxia and HIF-1 α have an important role in preeclampsia. This study showed for the first time that TNT formations, a new mechanism in intercellular communication, may have an important contribution to the pathophysiology of preeclampsia. In addition, it was determined as an *in vitro* model study that the Wnt/ β -catenin signaling pathway has an effective role in the mechanism of preeclampsia, and it can be targeted therapeutically for preeclampsia in future comprehensive studies.

Keywords: Hypoxia, Preeclampsia, Tunneling nanotubes, Wnt/ β -catenin.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
AEC	: Aminoetil karbazol
APC	: Adenomatöz polipozis koli
BCA	: Bikinkoninik asit
bHLH	: Temel sarmal-döngü-sarmal alanı (basic helix-loop-helix domain)
CK1	: Kazein kinaz-1
CO ₂	: Karbondioksit
CoCl ₂	: Kobalt (II) klorür
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	: 4', 6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorür
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DVL	: Dishevelled
ECL	: Artırılmış kemilüminesans (Enhanced chemiluminescence)
EPO	: Eritropoietin
EVT	: Ektravillöz trofoblast
FBS	: Fetal sığır serum
Fz	: Frizzled
G	: Gram
GSK3β	: Glikojen sentez kinaz 3β
hCG	: İnsan koryonik gonadotropin
HIF	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör
HIF-1	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1

HIF-1 α	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 alfa
HIF-1 β	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 beta
HIF-2 α	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör-2 alfa
HIF-3 α	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör-3 alfa
HRE	: Hipoksi yanıt elemanı (hypoxia response element)
IUGR	: İntrauterin gelişme geriliği
kDa	: Kilodalton
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
O ₂	: Oksijen
ODDD	: Oksijen bağımlı yıkım domaini (oxygen dependent degradation domain)
PAS	: Per-ARNT-Sim domain
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PC12	: Pheochromocytoma
PE	: Preeklampsi
PFA	: Paraformaldehit
PHD	: Prolil-hidroksilaz proteini
PI	: Propidyum iyodür
pVHL	: Von Hippel Lindau proteini
RIPA	: Radioimmunoprecipitation assay
RPM	: Dakikadaki devir sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TCF/LEF	: T-hücre faktörü/lenfoid artıracı faktör
TNT	: Tünel oluşturan nanotüp (Tunneling nanotube)
V	: Volt

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

WB : Western blot



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Blastosist oluşumu ve implantasyon	3
Şekil 2.2.	Plasentanın oluşumu ve önemli bileşenleri	4
Şekil 2.3.	Plasentanın genel yapısı	5
Şekil 2.4.	Plasentanın yapısal bileşenleri ve hücreleri	6
Şekil 2.5.	Plasental gelişim ve değişen oksijen konsantrasyonu	7
Şekil 2.6.	Koryonik villusların şematik gösterimi	8
Şekil 2.7.	Spiral arterlerin yeniden şekillenmesi ve EVT'lerin rolünün şematik gösterimi	9
Şekil 2.8.	Preeklampsi tanı kriterleri	10
Şekil 2.9.	Sağlıklı gebelik ve preeklampside spiral arterlerin yeniden şekillenmesi ve plasental hipoksi oluşumu	11
Şekil 2.10.	HIF alt birimleri ve fonksiyonel yapıları	12
Şekil 2.11.	Hipoksi mekanizması	13
Şekil 2.12.	Hipoksi ve HIF sinyal yolağının rol aldığı olaylar ve ilişkili genler	14
Şekil 2.13.	Preeklampsinin patofizyolojik mekanizmaları	15
Şekil 2.14.	Wnt/ β -katenin sinyal yolağı	17
Şekil 2.15.	Tünel oluşturan nanotüplerin şematik gösterimi	20
Şekil 2.16.	TNT'nin yapısı ve genel bileşenleri	21
Şekil 3.1.	Hücrelerde Hematoksilen ve Eozin boyama işlemi	27
Şekil 3.2.	Toz halindeki kobalt klorür'den uygun konsantrasyonlarda solüsyon hazırlanıp hücrelere uygulanması	28
Şekil 3.3.	Akım sitometri analizinin çalışma prensibi	29
Şekil 3.4.	BCA protein miktar tayini için örneklerin cihazda okutulması	30
Şekil 3.5.	Western blot yürütme cihazına örneklerin yüklenmesi ve Ponceu boyaması ile membrandaki bantların görüntülenmesi	31
Şekil 3.6.	Floresan mikroskop ile örneklerin görüntülenmesi	33
Şekil 4.1.	HTR8/SVneo ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinin morfolojik değerlendirilmesi	36
Şekil 4.2.	HTR8/SVneo ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinin morfolojik değerlendirilmesi	37

Şekil 4.3.	HTR8/SVneo ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinin morfolojik değerlendirilmesi.....	37
Şekil 4.4.	JEG-3 koryokarsinom hücrelerinin morfolojik değerlendirilmesi.....	38
Şekil 4.5.	JEG-3 koryokarsinom hücrelerinin morfolojik değerlendirilmesi.....	38
Şekil 4.6.	HTR-8/SVneo hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanan CoCl ₂ sonrası HIF-1 α proteini için Western Blot analizi bant görüntüleri.....	39
Şekil 4.7.	HTR-8/SVneo hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanan CoCl ₂ sonrası HIF-1 α için WB analiz sonuçlarının birbiriyle istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.8.	HTR-8/SVneo hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanan CoCl ₂ sonrası HIF-1 α için WB sonuçlarını karşılaştırma grafiği.....	40
Şekil 4.9.	JEG-3 koryokarsinom hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanan CoCl ₂ sonrası HIF-1 α proteini için WB analizi bant görüntüleri.....	41
Şekil 4.10.	JEG-3 koryokarsinom hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanan CoCl ₂ sonrası HIF-1 α Western Blot analiz sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	41
Şekil 4.11.	JEG-3 hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanan CoCl ₂ sonrası HIF-1 α için WB sonuçlarını karşılaştırma grafiği.....	42
Şekil 4.12.	Akım sitometrisi ile canlılık analizi sonuçları.....	43
Şekil 4.13.	HTR-8/SVneo ve JEG-3 hücrelerinde hücre canlılık analizi sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılması.....	44
Şekil 4.14.	HTR-8/SVneo hücrelerinde HIF-1 α protein ekspresyonunun normoksi ve hipoksi gruplarında görüntülenmesi.....	45
Şekil 4.15.	JEG-3 hücrelerinde HIF-1 α protein ekspresyonunun normoksi ve hipoksi gruplarında görüntülenmesi.....	46
Şekil 4.16.	Hücrelerde immün işaretleme ile gösterilen HIF-1 α ekspresyon düzeyinin gruplar arası karşılaştırılması.....	47
Şekil 4.17.	HTR-8/SVneo hücrelerinde HIF-1 α protein ekspresyonunun immünfloresan görüntüsü.....	47

Şekil 4.18. HTR-8/SVneo hücrelerindeki TNT sayım sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılma grafiği.....	48
Şekil 4.19. HTR-8/SVneo hücrelerindeki TNT uzunluk ölçümü sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılma grafiği.	49
Şekil 4.20. HTR-8/SVneo hipoksi grubu (A) ve JEG-3 hipoksi grubu (B) hücrelerinde TNT oluşumlarının invert mikroskop görüntüsü	50
Şekil 4.21. HTR-8/SVneo normoksi grubunda TNT oluşumu.....	51
Şekil 4.22. HTR-8/SVneo hipoksi grubunda TNT oluşumlarının uzunluk ölçümleri	51
Şekil 4.23. HTR-8/SVneo normoksi grubuna ait hücrelerde TNT oluşumlarının görüntülenmesi ve uzunluk ölçümü	52
Şekil 4.24. HTR-8/SVneo hipoksi grubuna ait hücrelerde TNT oluşumlarının görüntülenmesi ve uzunluk ölçümü	52
Şekil 4.25. HTR-8/SVneo hipoksi grubuna ait hücrelerde TNT oluşumlarının görüntülenmesi ve uzunluk ölçümü	53
Şekil 4.26. HTR-8/SVneo hipoksi grubuna ait hücrelerde TNT oluşumlarının görüntülenmesi ve uzunluk ölçümü	54
Şekil 4.27. JEG-3 normoksi grubuna ait hücrelerde TNT oluşumu	55
Şekil 4.28. JEG-3 hipoksi grubuna ait hücrelerde TNT oluşumu	56
Şekil 4.29. JEG-3 hipoksi grubuna ait hücrelerde TNT oluşumu	57
Şekil 4.30. HTR-8/SVneo ve JEG-3 hücrelerindeki β -katenin ve Wnt-1 protein düzeylerinin WB analizi bant görüntüleri.....	58
Şekil 4.31. HTR-8/SVneo hücrelerindeki β -katenin ve Wnt-1 protein düzeylerinin WB analizi sonrası gruplar arası karşılaştırılması.....	59
Şekil 4.32. JEG-3 hücrelerindeki β -katenin ve Wnt-1 protein düzeylerinin WB analizi sonrası gruplar arası karşılaştırılması	59
Şekil 4.33. HTR-8/SVneo hücrelerinde β -katenin ekspresyonunun normoksi ve hipoksi gruplarında görüntülenmesi.....	60
Şekil 4.34. JEG-3 hücrelerinde β -katenin ekspresyonunun normoksi ve hipoksi gruplarında görüntülenmesi.....	61
Şekil 4.35. Hücrelerde β -katenin ekspresyonunun normoksi ve hipoksi grupları arasında karşılaştırılması.	62

Şekil 4.36. HTR-8/SVneo hücrelerinde Wnt-1 ekspresyonunun normoksi ve hipoksi gruplarında görüntülenmesi.....	63
Şekil 4.37. JEG-3 hücrelerinde Wnt-1 ekspresyonunun normoksi ve hipoksi gruplarında görüntülenmesi	63
Şekil 4.38. Hücrelerde Wnt-1 ekspresyonunun normoksi ve hipoksi grupları arasında karşılaştırılması.....	64



TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Farklı hücre tiplerindeki TNT özellikleri	22
Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan hücre hatlarına ait bilgiler	24
Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları	25
Tablo 3.3. Deney ve analizlerde kullanılan mikroskoplar	25
Tablo 4.1. Hücre canlılık analizi sonuçları ve gruplar arası karşılaştırma sonucu istatistiksel p değerleri.....	42
Tablo 4.2. HTR-8/SVneo hücrelerindeki TNT sayımı sonuçları.....	48
Tablo 4.3. HTR-8/SVneo hücrelerindeki TNT uzunluk (mikrometre) ölçümü sonuçları.....	49
Tablo 4.4. Hücrelerde β -katenin ve Wnt-1 protein düzeyleri için yapılan WB analiz sonuçları	58

1. GİRİŞ

Preeklampsi, hamilelik sırasında görülen bir hastalıktır. Preeklampsinin karmaşık patogenezinin birçok nedeni vardır. Spesifik etki mekanizması hala belirsizliğini korusa da hipoksinin preeklampsi ile yakın ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Plasentasyonun en önemli özelliği, plasental trofoblast hücrelerinin desidua ve miyometriyuma derin bir şekilde invazyonudur. Bu invazyon, uterin spiral arterlerin yeniden şekillenmesi ve normal fetal gelişim için yeterli bir maternal kan tedariki sağlamak için gereklidir. Bu invazyonun ve vasküler şekillenmenin yetersiz kalmasıyla plasental hipoksi meydana gelir ve preeklampsi ortaya çıkar (1,2). Preeklampsi, hem maternal hem fetal ölüm ile sonuçlanabilmektedir. Klinik olarak gebeliğin 20. haftasından sonra hipertansiyon başlangıcı ve proteinüri ile karakterize olan preeklampsinin günümüzde uygulanan etkili bir önleme yolu ya da tedavisi halen kısıtlıdır (3).

Hastalıklarda hücrelerin birbirleri ile olan iletişimi büyük rol oynamakta ve karmaşık mekanizmalar içermektedir. Tünel oluşturan nanotüpler (TNT) bu iletişim yollarından biridir ve çeşitli hücre türleri arasında oluşabilen, uzun ve geçici filamentöz membran uzantıdır. TNT'lerin, hücreler arasında çeşitli moleküller ile çeşitli hücresel kargoların hücreler arası transferine aracılık ettiği böylece hücre fonksiyonlarını düzenlemede rol aldığı gösterilmiştir (4). Dolayısıyla TNT'ler hastalıkların gelişimi ve ilerlemesinde de önemli role sahiptir. Plasentasyon süreci boyunca, trofoblastların proliferasyon ve apoptoz gibi süreçlerini düzenlemede pek çok sinyal yolağı rol almaktadır ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağı da bunlardan biridir. Wnt/ β -katenin sinyal yolunun anormal aktivasyonu, özellikle kanserde ve çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli roller oynayabilmektedir. Son çalışmalar, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının preeklampsiye katkıda bulunabileceğini göstermiştir (5,6).

Geleneksel hayvan modelleri ile insan denemeleri arasındaki boşluğu dolduran *in vitro* modeller, canlı dokuların çevresel ve kimyasal karmaşıklığını iyi bir şekilde

taklit ederek insan fizyolojisini ve hastalık patofizyolojilerini araştırmak için alternatif ve yeni bir araştırma yöntemi olarak dikkat çekmektedir (7,8).

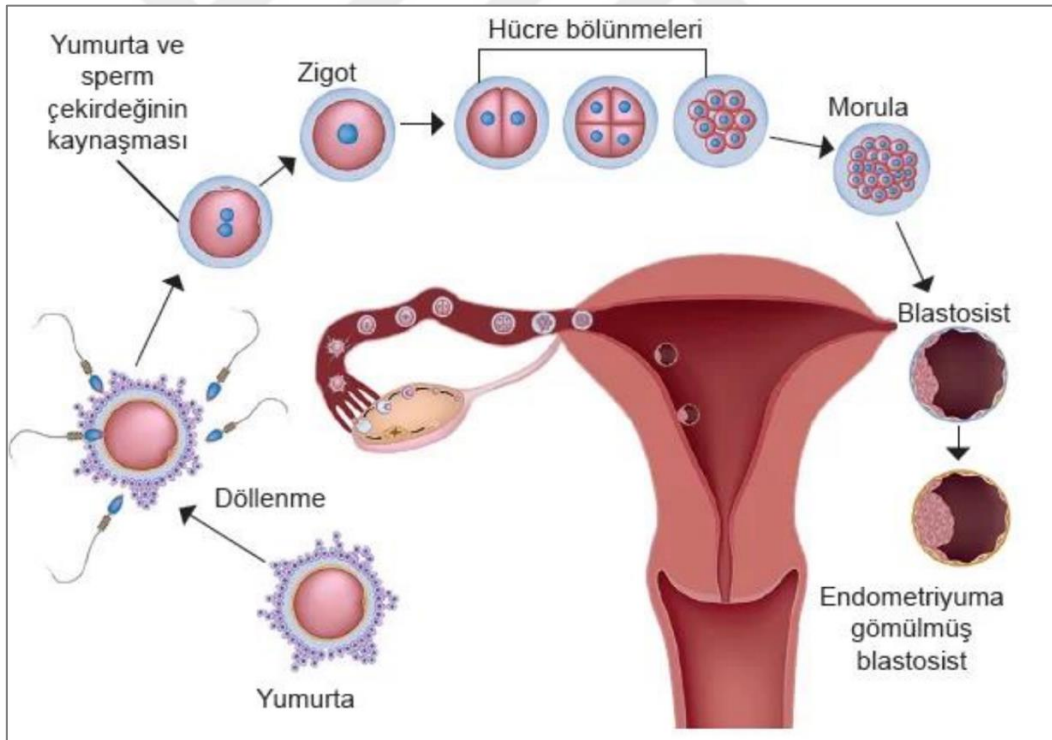
Son yıllarda yapılan *in vitro* preeklampsi model çalışmalarında kullanılan hücre hatları; BeWo, Jar, JEG-3 ve HTR-8/SVneo trofoblast hücre hatlarıdır. Bu çalışmalarda *in vitro* model oluşturmak için trofoblast hücrelerine hipoksik koşullandırma uygulanmış ve proliferasyon, invazyon parametrelerine bakılarak preeklampsi için uygun *in vitro* modeller olduğu gösterilmiştir (9).

Bu bilgilerden yola çıkılarak çalışmamızın ilk basamağında, HTR-8/SVneo ekstravillöz trofoblast ve JEG-3 koryokarsinom hücre hatlarında hipoksi indüklemesi ile *in vitro* preeklampsi modeli oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışmanın sonraki basamağında hipoksi oluşturulmuş hücrelerde TNT oluşumlarının sayı ve uzunluklarının değerlendirilmesi ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağının olası rollerini araştırmak için de Wnt-1 ve β -katenin ekspresyon düzeylerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Embriyonik Gelişimin Başlangıcı

İnsanda embriyonik gelişim; sperm ve yumurtanın birleşmesi yani fertilizasyon ile başlar. Fertilizasyonda oluşan zigot, art arda mitoz bölünmeler geçirerek yarıklanır ve blastomerler meydana gelir. Fertilizasyondan yaklaşık 3 gün sonra, embriyonun tekrar bölünmeler geçirmesiyle 12-32 hücreli morula yapısı oluşur. Morulada iç hücre kitlesi ve dış hücre kitlesi meydana gelir. Uterus boşluğundaki sıvı, iç hücre kitlesinin hücrelerarası boşluğuna sızar ve oradaki boşlukların genişleyip birleşmesiyle blastosel adı verilen tek bir boşluk oluşur. Bu aşamadaki embriyoya blastosist adı verilir. İç hücre kitlesinden embriyonik dokular, dış hücre kitlesinden ise plasentayı oluşturacak olan trofoblastlar gelişir (10).

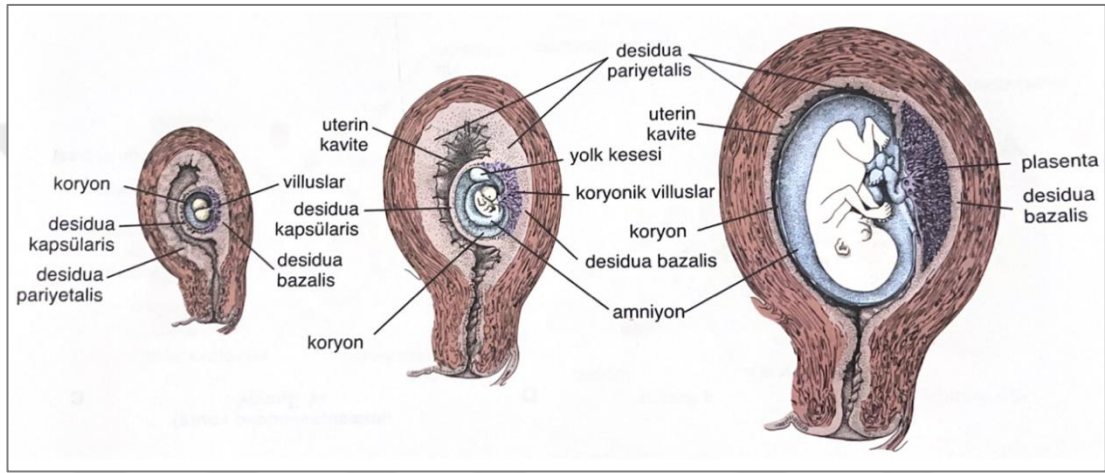


Şekil 2.1. Blastosist oluşumu ve implantasyon (11).

2.2. Plasenta

Plasenta; fetal kan damarlarını içeren stroma, onu çevreleyen çift katmanlı trofoblast ve villus olarak adlandırılan dallanmış yapılardan meydana gelen, gebelik

döneminde oluşan geçici bir endokrin organ olup anne ile embriyo/fetüs arasındaki iletişimi sağlamaktadır. Plasentanın temel fonksiyonları arasında; maternal ve fetal plazma arasında gaz alışverişi, besinlerin ve atıkların transferi, anneden fetüse immüoglobulinlerle bağışıklığın transferi ve fetal büyüme ve gelişme için önemli olan hormonların salgılanması bulunmaktadır (12–15). Plasentanın oluşumu, başarılı bir gebelik ve fetal sağlık için çok önemlidir. Gebelik boyunca plasenta, annenin fizyolojik adaptasyonundan, gelişen embriyonun immünolojik kabulüne, beslenmesine ve desteklenmesine kadar pek çok görevi yerine getirir (16).

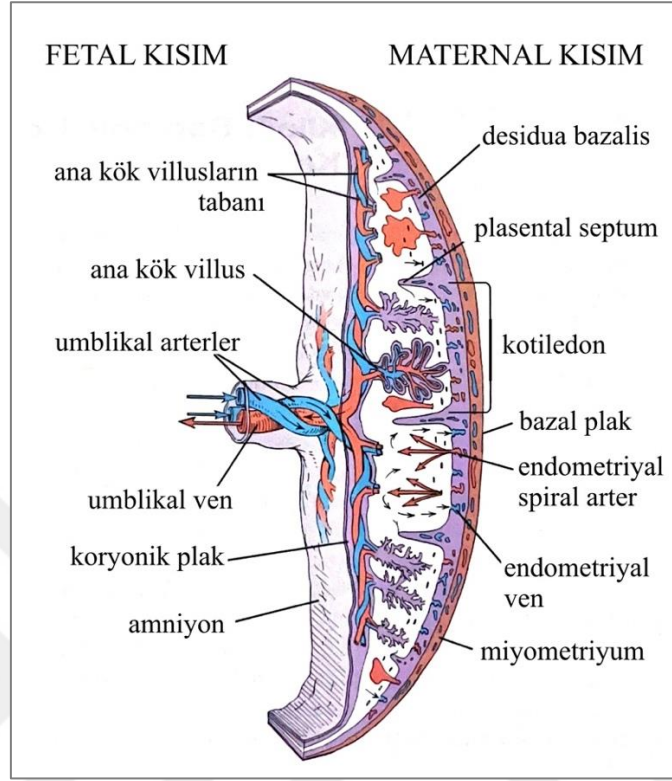


Şekil 2.2. Plasentanın oluşumu ve önemli bileşenleri (17).

2.2.1. Plasenta Yapısı

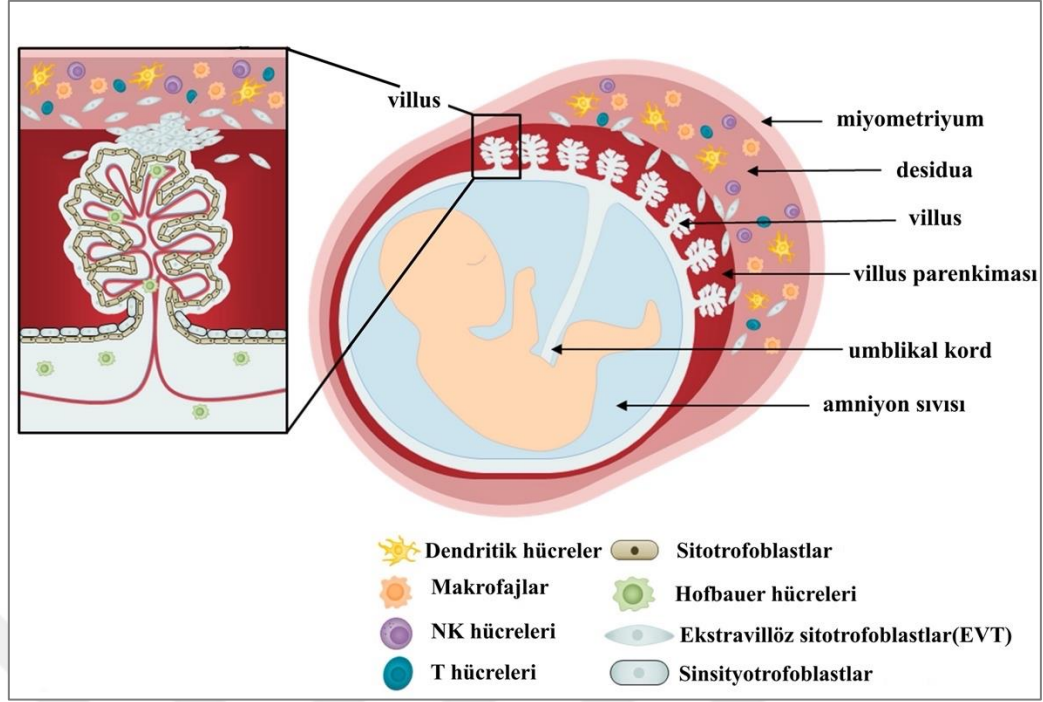
İnsanlarda olgun bir plasenta yaklaşık 3 cm kalınlığında ve 500 g ağırlığındadır. Plasenta, maternal ve fetal kısımlardan meydana gelir. Plasentanın amniyotik membran komşuluğundaki fetal yüzü düzdür. Gebelikte uterusun endometriyumu olan desidua tabakası üçe ayrılır ve bunlardan ilki olan desidua bazalis; plasentanın maternal kısmını oluşturur. Desidua kapsülaris; gelişen embriyo ve koryonik keseyi kaplayan yüzeysel bir tabakadır. Desidua pariyetalis; embriyonun olmadığı uterus boşluğunda bulunan kısımdır (18,19). Plasentanın fetal bölümünü ise koryon frondozum oluşturur. Desidua bazalisten gelişen plasenta septumları koryonik plağa doğru uzanırken 30-35 loba ayrılır. Her lob birçok kotiledon içerir, kotiledonlar ana kök villus ve dallarından oluşur. Desidua kapsülarisin üzerindeki villusların dejenere olmasıyla koryon leve (düz koryon) oluşur. Koryon frondozum villusların

çıkıldığı tabaka olan koryon plağı ve sitotrofoblastlar tarafından oluşturulan koryonik villuslardan oluşur (14,15).



Şekil 2.3. Plasentanın genel yapısı (20).

Maternal ve fetal yapılar arasındaki intervillöz alanda maternal kan dolaşır, besin ve atıkların değişiminin gerçekleştiği yerlerdir. Koryonik villuslar mezenkimal bağ dokudan oluşan villus stroması ile arteriyoller ve kapillerleri içeren fetal kan damarlarına sahiptir. Stroma fibroblastlara farklılaşan mezenkimal hücreler ve fetal plasental antijen sunan hücreler olan fagositoz yeteneğine sahip Hofbauer hücrelerinden oluşur (14,21,22).

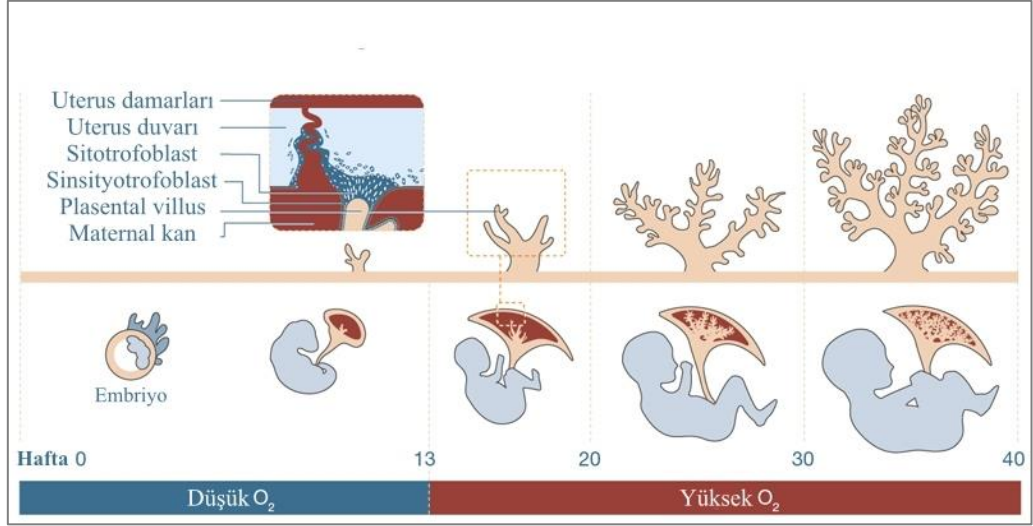


Şekil 2.4. Plasentanın yapısal bileşenleri ve hücreleri (23).

Plasental koryonik villusları içeren stromal bağ dokusu sitotrofoblastlar ve sinsiyotrofoblastlar ile çevrilidir. Sinsiyotrofoblastlar postmitotik hücrelerdir, intervillöz aralıkta maternal kan ile temas ederler ve çok sayıda mikrovillus içerirler. Onların altında bulunan ve bazal lamina üzerine oturan sitotrofoblastlar mitoz bölünerek sinsiyotrofoblastlara farklılaşırlar (24). Plasentanın villöz olmayan kısımları ise ekstravillöz trofoblastları (EVT), fibrinoid ve desiduaı içerir (25).

2.2.2. Plasenta Gelişimi

Blastosistin, fertilizasyondan yaklaşık 7 gün sonra embriyonik kutuptan uterus duvarına tutunmasıyla (implantasyon) fetüs ve plasentanın gelişimi başlar. Ekstraembriyonik dokulardan köken alan plasenta, yapısını ve işlevini dinamik olarak değiştirerek gebeliğin ilk haftalarında hızla gelişir. Trofoblastların hızla çoğalması, koryonik kesenin ve villusların gelişmesi bu süreç ile karakterizedir. Üçüncü haftanın sonunda plasenta için gerekli anatomik düzenlemeler oluşturulur. Dördüncü haftanın sonunda ise gaz, besin ve metabolik atıkların değişimine izin veren kompleks bir vasküler ağ gelişir. Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde plasenta, fetüsün büyümesiyle birlikte genişler ve kalınlaşır. Aynı zamanda toplam villus yüzeyi de genişler (14,24,26).



Şekil 2.5. Plasental gelişim ve değişen oksijen konsantrasyonu (26).

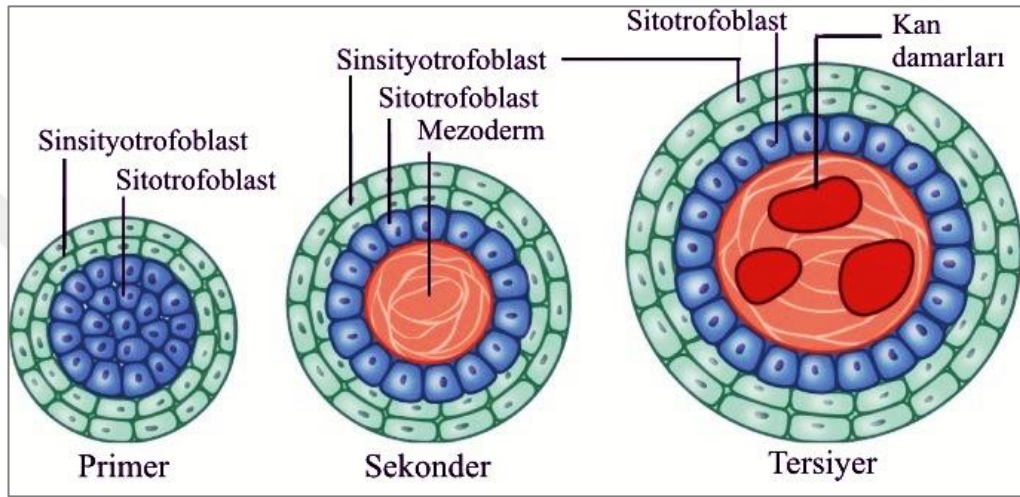
2.2.3. Trofoblast Hücrelerinin Gelişimi

Trofoblastlar, embriyoya besin sağlayan ve plasentanın büyük bir bölümünü oluşturan hücrelerdir.

Maternal dokuya temas etmeyen içteki hücelere sitotrofoblast, dışta yer alan ve maternal dokuya temas halinde bulunan hücelere ise sinsityotrofoblast adı verilmektedir (27).

Gelişimin yaklaşık 7. gününde, blastosistin implantasyonu gerçekleşirken, trofoblast hücreleri, maternal uterin hücelere invazyon sağlamak için endometriyal desidual epitel ile etkileşime girer. Trofoblast hücreleri, maternal dokuları aşındıran çok çekirdekli sinsityotrofoblasta (dış) ve aktif olarak çoğalan tek çekirdekli sitotrofoblasta (iç) farklılaşır. Gelişimin 9. gününde sinsityotrofoblast içinde boşluklar oluşur. Sinsityotrofoblast maternal dokuları aşındırarak uterus spiral arterlerinden anne kanının laküner ağına girmesine izin verir. Böylece erken uteroplasental dolaşım 2. haftanın sonunda kurulur. Bu arada sitotrofoblast, sinsityotrofoblasta nüfuz eden ve genişleyen primer koryonik villusları (parmak benzeri çıkıntılar) oluşturmaya başlar. Üçüncü haftada, ekstra-embriyonik mezoderm bu villusların içine doğru girerek gevşek bağ dokusundan oluşan bir merkez oluşturur ve bu noktada bu yapılara sekonder koryonik villus adı verilir. Üçüncü haftanın sonunda, sekonder koryonik villusun embriyonik mezoderminde embriyonik damarlar oluşmaya başlar ve tersiyer

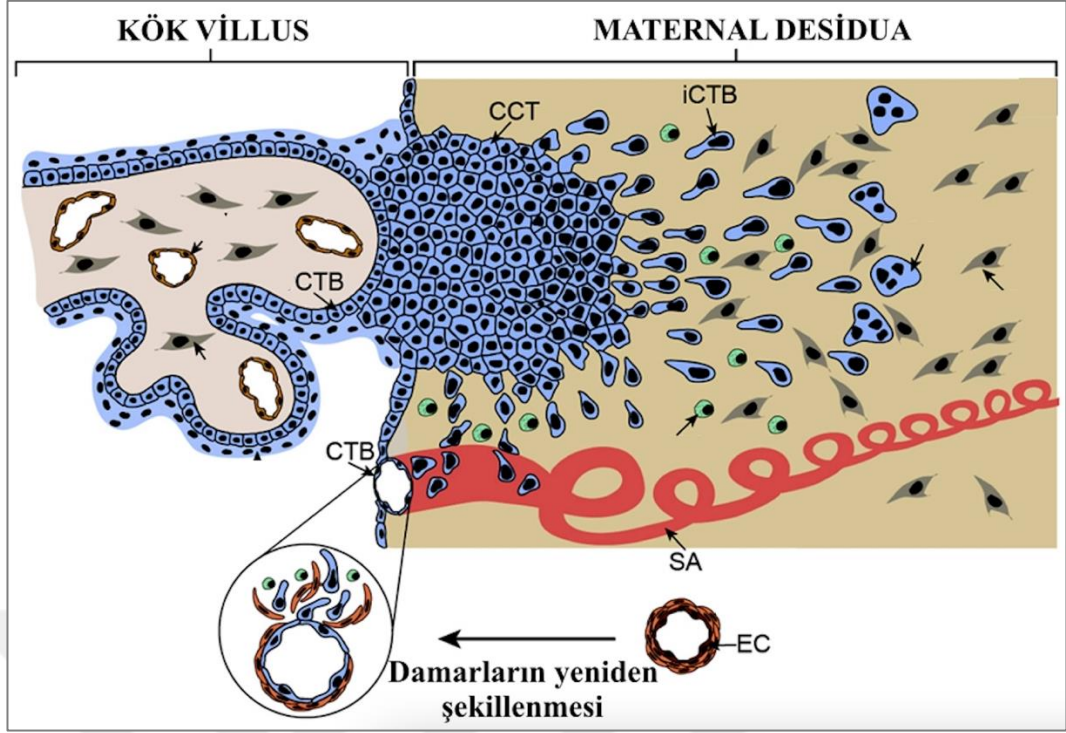
koryonik villus oluşmuş olur. Tersiyer villustaki sitotrofoblast hücreleri, maternal uterusun desidua bazalisine doğru büyür ve sitotrofoblastik bir kabuk oluşturmak için üzerine yayılır. Sitotrofoblastik kabuk aracılığıyla desidua bazalise bağlanan villuslar, kök villusları olarak bilinir ve plasentayı uterus duvarına bağlar. Kök villuslardan intervillöz boşluk içinde dışa doğru büyüyen villuslara ise dallanan villuslar denir ve bu villuslar anne ile fetüs arasındaki metabolitlerin değişimi için yüzey alanı sağlar (28–31).



Şekil 2.6. Koryonik villusların şematik gösterimi.

2.2.4. Spiral Arterlerin Yeniden Şekillenmesi

Plasental gelişim sürecinde maternal spiral arterler, fetüsün ihtiyaçlarını karşılamak için direnci düşük ancak kan akışı yüksek bir koşul oluşturmak üzere yeniden şekillenir. Sitotrofoblast hücreleri maternal spiral arterleri istila eder ve maternal endotelin yerini alarak damarın çapını artırır. Spiral arterleri yeniden şekillendirmenin yanı sıra, sitotrofoblastlar ayrıca hamileliğin ilk haftalarında implantasyon bölgesinin altındaki desidua bazaliste spiral arterleri tıkayan trofoblast tıkaçları oluşturur. Bu tıkaçlar, 6-7. gebelik haftasına kadar kan akışını tamamen engeller. Bunun bir sonucu olarak, plasenta ilk trimesterin çoğunluğunda düşük oksijenli bir ortamdır. Bu ortamın plasenta gelişimi, vaskülogenez ve anjiyogenez için oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Plasenta oluşumundaki problemler, embriyonik büyüme ve gelişmeyi tehlikeye atabilir. Anormal plasentasyon; düşük, ölü doğum, erken doğum, intrauterin gelişme geriliği (IUGR) ve preeklampsi gibi çeşitli gebelik komplikasyonlarının temel sebeplerinden biridir (32–37).



Şekil 2.7. Spiral arterlerin yeniden şekillenmesi ve EVT'lerin rolünün şematik gösterimi (CTB: Sitotrofoblast, SA: Spiral arter, EC: Endotel hücre) (38).

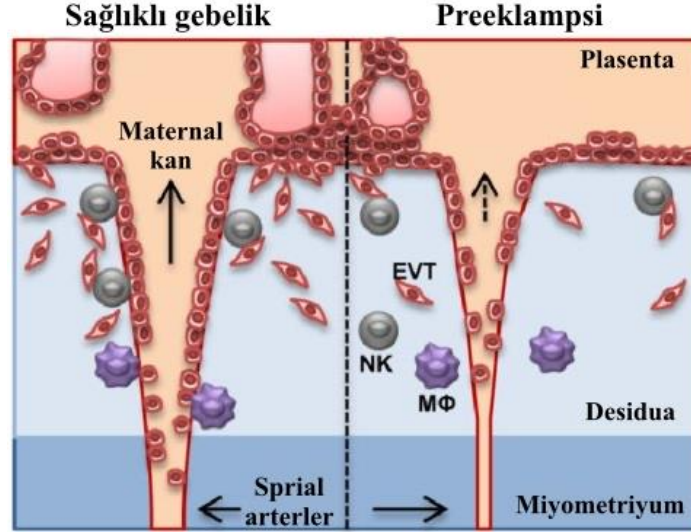
2.3. Preeklampsi

Preeklampsi (PE), anormal plasentasyonun bir sonucu olarak yüksek tansiyon ve proteinüri ile karakterize, gebeliğe özgü bir hastalıktır. Tüm gebeliklerin %5-10'unu etkileyen PE, dünya çapında perinatal ve maternal morbiditenin başlıca sebeplerinden biri olarak kabul edilmiştir (39,40). Preeklampsi, maternal organ yetmezliği ile birlikte gebeliğin 20. haftasından sonra başlayan hipertansiyon ile tanımlanır. PE'nin başlıca klinik belirtileri ödem, baş ağrısı, böbrek yetmezliği, epigastrik ağrı, düşük trombosit sayısı, anormal karaciğer enzim değerleri ve fetal sendromdur (40). Tanı kriterleri; preeklampsinin klinik çeşitliliğine, patogenezinin, multisistemik etkilerine ve prognostik belirteçlerine uygun olarak kanıta dayalı rehberler eşliğinde Amerikan Jinekoloji ve Obstetri Derneği (The American Congress of Obstetricians and Gynecologists-ACOG) tarafından yeniden tanımlanmıştır (41) (Bkz. Şekil 2.8.).

	Preeklampsi	Şiddetli Preeklampsi
Hipertansiyon	Daha önce normotansif bir gebede, 20.gebelik haftasından sonra en az dört saat ara ile yapılan iki ölçümde SKB ≥ 140 mmHg yada DKB ≥ 90 mmHg olmasıdır.	Yatak istirahatinde 4 saat ara ile yapılan iki ölçümde SKB ≥ 160 mmHg yada DKB ≥ 110 mmHg olması durumu (Antihipertansif tedavinin başlanmadığı durumda)
VE		
Proteinüri	•24 saatlik idrarda ≥ 300 mg proteinüri •Protein/Kreatinin ≥ 0.3 mg/dL •İdrar çubuğu ile yapılan ölçümde 1+ proteinüri olmasıdır.*	
Veya proteinüri yoksa, yeni başlayan hipertansiyon ile birlikte aşağıdakilerden birinin yeni başlaması durumunda		
Trombositopeni	Trombosit sayısı < 100.000 /mikrolitre olmasıdır.	
Böbrek Yetmezliği	Serum kreatinin konsantrasyonunun > 1.1 mg/dL ya da Başka bir böbrek hastalığının yokluğunda serum kreatinin konsantrasyonunun iki kat artmasıdır.	
Bozulmuş Karaciğer Enzimleri	Karaciğer transaminazlarının (ALT, AST) normal konsantrasyonun iki katına kadar artmasıdır.	
Bozulmuş Karaciğer Enzimleri		Başka bir tanı ile açıklanamayan süregelen şiddetli sağ üst kadranda ağrısının varlığı Tedaviye yanıt vermeyen epigastrik ağrının olması veya her ikisinin birlikte olmasıdır.
Serebral ve Görme Bozuklukları		Yeni başlayan serebral ve görme bozukluklarının olmasıdır.
* Diğer kantitatif ölçümlerin yapılamadığı durumlarda kullanılır.		

Şekil 2.8. Preeklampsi tanı kriterleri.

Preeklampsi, sadece plasenta varlığında oluşan ve doğum sonrası plasentanın çıkarılması ile düzelen bir patolojidir. Preeklampsi gelişiminde azalmış plasental perfüzyonun yol açtığı plasental hipoksi kaynaklı değişiklikler önemli rol oynar (40,42,43).



Şekil 2.9. Sağlıklı gebelik ve preeklampside spiral arterlerin yeniden şekillenmesi ve plasental hipoksi oluşumu (44). EVT: Ekstravillöz trofoblast, NK: Doğal öldürücü hücreler, M: Makrofajlar.

Preeklampsi genellikle iki aşamalı bir hastalık olarak kabul edilir:

a) Erken gebelikte, uterin spiral arterlerin yetersiz yeniden şekillenmesi damarların daralmasına neden olur,

b) daha sonra plasenta iskemi, hipoksi ve oksidatif strese maruz kalır ve maternal dolaşıma bazı toksik (reaktif oksijen türevleri gibi) faktörleri salarak klinik preeklampsiye yol açan vasküler ve glomerüler endotelial hasara neden olur (43). Preeklampsinin nedeni hala tartışılırken, klinik ve patolojik çalışmalar bu sendromun patogenezinde esas merkezin plasenta olduğunu göstermektedir (45).

Sahip olduğu öneme rağmen, insan plasenta oluşumu ve trofoblast hücrelerinin fonksiyon ve farklılaşması gibi olaylardaki moleküler mekanizmalar, çoğunlukla uygun hücrel model sistemlerinin eksikliğinden dolayı, yeterince aydınlatılamamıştır (9)..

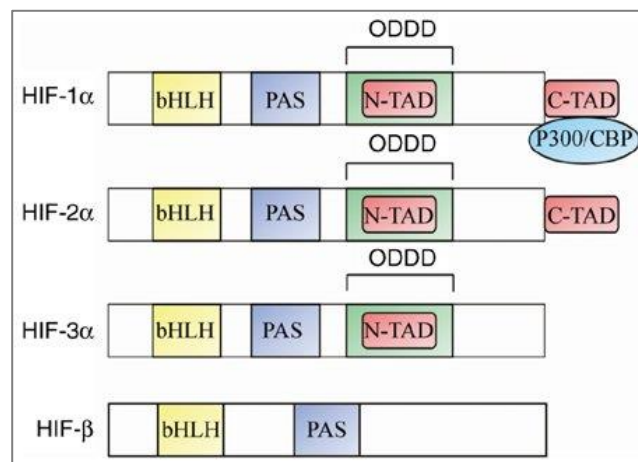
2.4. Hipoksi

2.4.1. Tanımı ve Tarihçesi

Hipoksi, hücre ve dokularda yeterli oksijenin sağlanamaması durumudur. O₂ alımı ve tüketimi arasındaki dengesizlik, hücresel işlevi sürdürmek için yetersiz kalır ve hipoksi oluşur. Hipoksiyi ilk olarak 1991 yılında Semenza ve ark. böbrek ve karaciğerde hipoksik koşulların, eritropoietin (EPO) ekspresyonunu artıran nükleer faktörlerin üretimini indüklediğini göstererek raporlamıştır. Ratcliffe ve ark. daha sonra bu oksijen algılama sisteminin memelilerde her dokuda bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. 1995'te Semenza ve ark. HIF-1'in HIF-1 α ve HIF-1 β olmak üzere iki alt birim içerdiğini göstermiş, 2019 yılında ise insan ve hayvan hücrelerinin oksijen ihtiyacını nasıl algıladığı ve buna nasıl uyum sağladığını keşfeden çalışmalarından dolayı Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'ne layık görülmüşlerdir (46,47).

2.4.2. Hipoksi Mekanizması

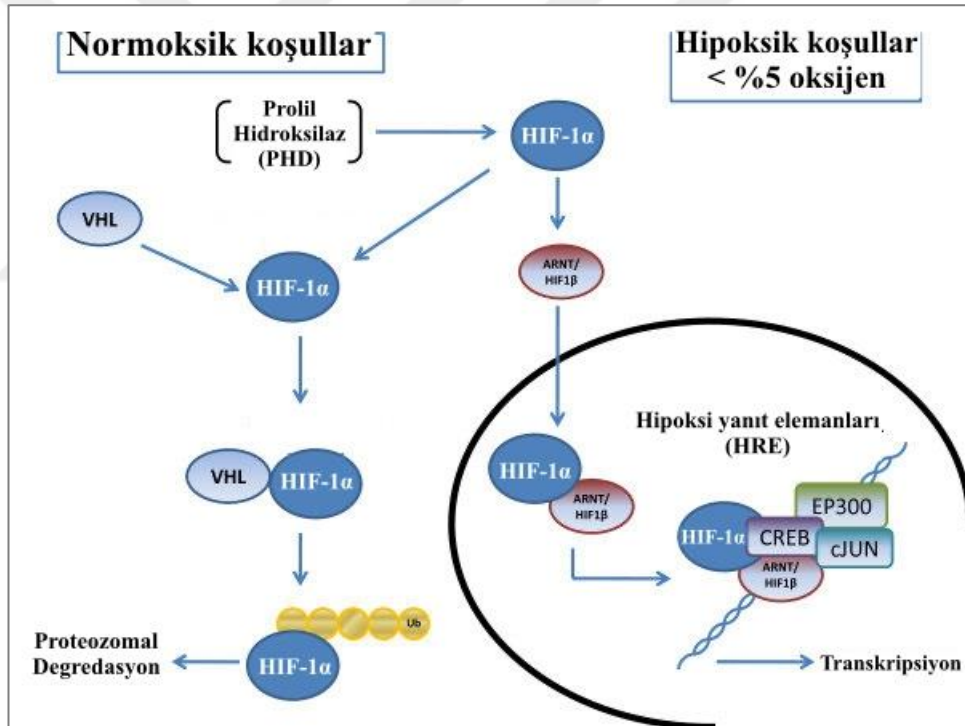
Hipoksi ile ilişkili olayların çoğuna, hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) adı verilen bir transkripsiyon faktörü aracılık eder. HIF ailesi iki farklı alt birim içerir: α ve β . Bunlardan α kısmı HIF-1 α , HIF-2 α ve HIF-3 α 'dan oluşur; β kısmı ise sadece HIF-1 β içerir. HIF-1 α tüm vücut dokularında yaygın olarak ifade edilirken, HIF-2 α ve HIF-3 α sadece birkaç spesifik dokuda ifade edilmektedir (48).



Şekil 2.10. HIF alt birimleri ve fonksiyonel yapıları (49).

Normoksik (yeterli oksijen saturasyonlu) koşullar altında, HIF- α proteinleri (HIF-1 α , HIF-2 α ve HIF-3 α), prolil-hidroksilaz proteini (PHD-1) yoluyla hidroksile edilir. Bir E3 ubikuitin ligazı olan Von Hippel Lindau proteini (pVHL), hidroksile HIF-1 α 'ya bağlanır, bu da HIF proteininin ubikütinizasyonuna ve proteozomal yıkımına yol açar ve HIF-1 α inaktive edilir.

Hipoksik koşullar altında ise, HIF- α hidroksilasyonunu ve ubikütin aracılı proteazom bozulmasını önleyen PHD'nin enzimatik aktivitesi inhibe edilir. Daha sonra, HIF- α alt birimi, bir transkripsiyonel kompleks dimerizasyonu oluşturmak için HIF-1 β ile etkileşime girer, daha sonra çekirdeğe girer ve hipoksi yanıt elemanları (HRE'ler) ile birleşerek çok sayıda genin transkripsiyonunun indüklenmesinde rol oynar (50–52).

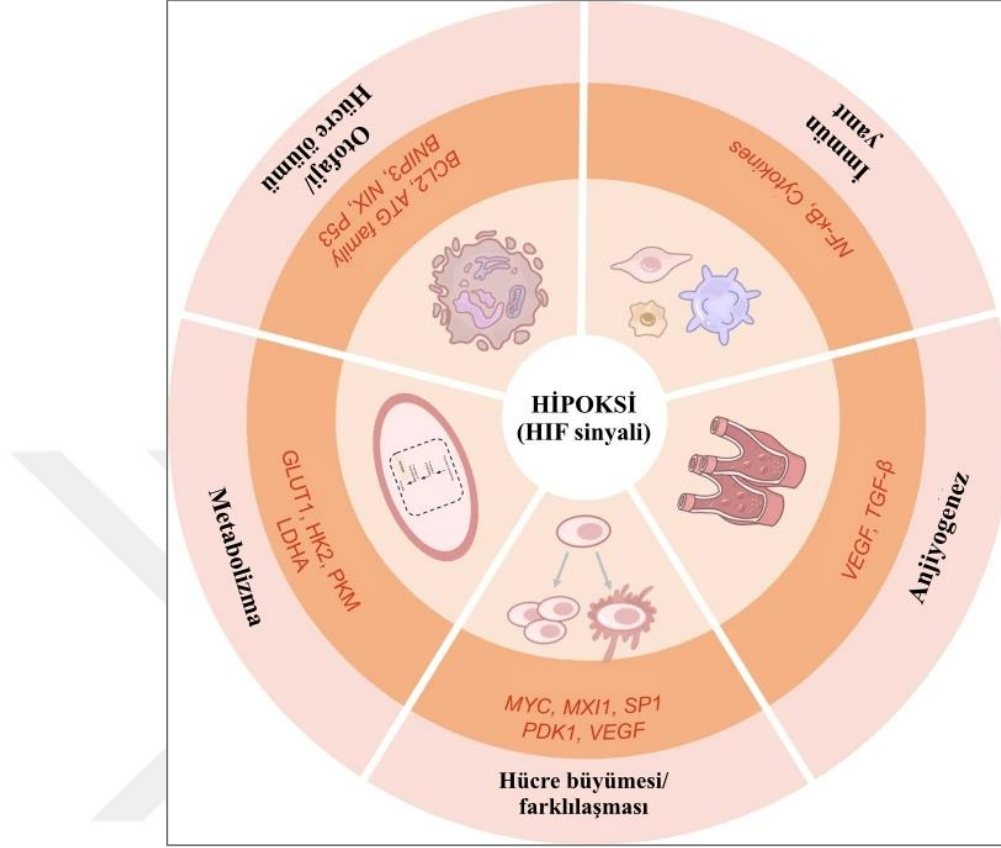


Şekil 2.11. Hipoksi mekanizması (53).

2.4.3. Hipoksinin Önemi ve Hastalıklardaki Rolü

Hipoksi süreci, mikrobiyal enfeksiyon, kanser, akut ve kronik hastalıklar ve diğer stres tepkileri dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerle bağlantılıdır. Hücrelerin oksijen değişikliklerine verdiği yanıtın altında yatan mekanizma oldukça önem taşır. Hipoksiye bağlı değişimleri incelemek için yapılan çalışmalar, hastalık

patogenezinin altında yatan mekanizmalar hakkında daha iyi fikir vermektedir (53–56).



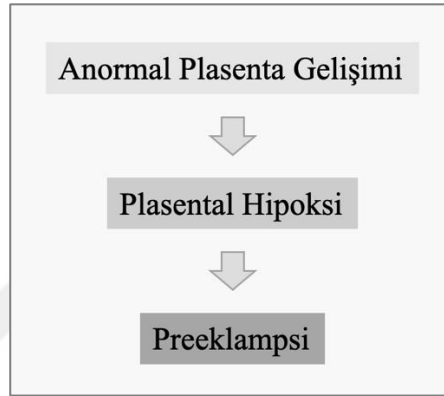
Şekil 2.12. Hipoksi ve HIF sinyali yolağının rol aldığı olaylar ve ilişkili genler.

Fetal gelişimde önemli bir fizyolojik rol oynayan hipoksi; plasentasyon, anjiyogenez ve hematopoez gibi önemli embriyonik süreçlerde yer alır. Patolojik olarak da kanser, miyokardiyal iskemi, metabolik hastalıklar, kronik kalp ve böbrek hastalıklarının yanı sıra üreme sistemi hastalıklarında da (preeklampsi ve endometriozis gibi) kritik rol oynadığı bilinmektedir (57,58).

2.5. Preeklampsi ve Hipoksi

Normal gebelik sürecinde plasenta intervillöz alanındaki spiral arterlerin lümeni genişler ve arter duvarları düz kas içerecek şekilde yeniden şekillenerek daha dirençli hale gelir. Bu süreçte fetal trofoblastlar maternal damarlara invaze olarak endotelin yerini alır, trofoblast ve fibrinoid matriks internal elastik lamina ve düz kas ile yer değiştirir. Böylelikle intervillöz alanda geniş çaplı ve direnci düşük kan akımı

sağlanır. Normal gebelikte 20. haftaya dek tamamlanan bu süreç preeklampside spiral arterlerin sitotrofoblastlarca invazyonu tamamlanamadığı ve değişikliğe uğrayamadığı için bozulmuştur (1,42,45,58). Spiral arterlerdeki yeniden şekillenme desidual kısım ile sınırlı kalır, artan uterin doku direnci ve invazyondaki eksiklik ikinci trimester sonunda intervillöz kanlanmanın bozulmasına neden olur (136,137). Uteroplental perfüzyonun azalması plasentada hipoksiye yol açar. Preeklampside gelişen hipoksik süreçler hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 (HIF-1) artışına sebep olur.



Şekil 2.13. Preeklampsinin patofizyolojik mekanizmaları.

Preeklampsinin karmaşık patogenezinin mekanizması hala belirsizliğini korusa da hipoksinin trofoblast fonksiyonlarına dolayısıyla preeklampsia patogenezinin önemli bir katkıda bulunduğu bilinmektedir. Yüzeysel ve yetersiz olan trofoblast invazyonundan ve spiral arterlerin yeniden şekillenirken oldukça dar kalmasından kaynaklanan plasental hipoksi preeklampsinin en belirgin özelliğidir (57–63).

2.6. Wnt Sinyal Yolağı

Wnt sinyali ilk olarak *Drosophila*'nın erken embriyogenezinde segment polarite geni Wingless (Wg) keşfedilerek tanımlanmıştır. Daha sonra farelerde yapılan viral karsinogenez deneyleri, fare meme tümörü virüsünün Int-1 adlı genin promotörü içinde ortak entegrasyon bölgesinin keşfine yol açmıştır. Dizi analizleri, Int-1'in *Drosophila* Wg genine ortolog olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle, memeli Int-1 geni ve onun paralogları için terimler birleştirilerek 'Wnt' adı üretilmiştir (64).

Wnt sinyali, insanlarda embriyonik modelleme, hücre çoğalması, farklılaşma, göç ve apoptoz dahil olmak üzere çok sayıda hücrel ve gelişimsel süreçte yer alır.

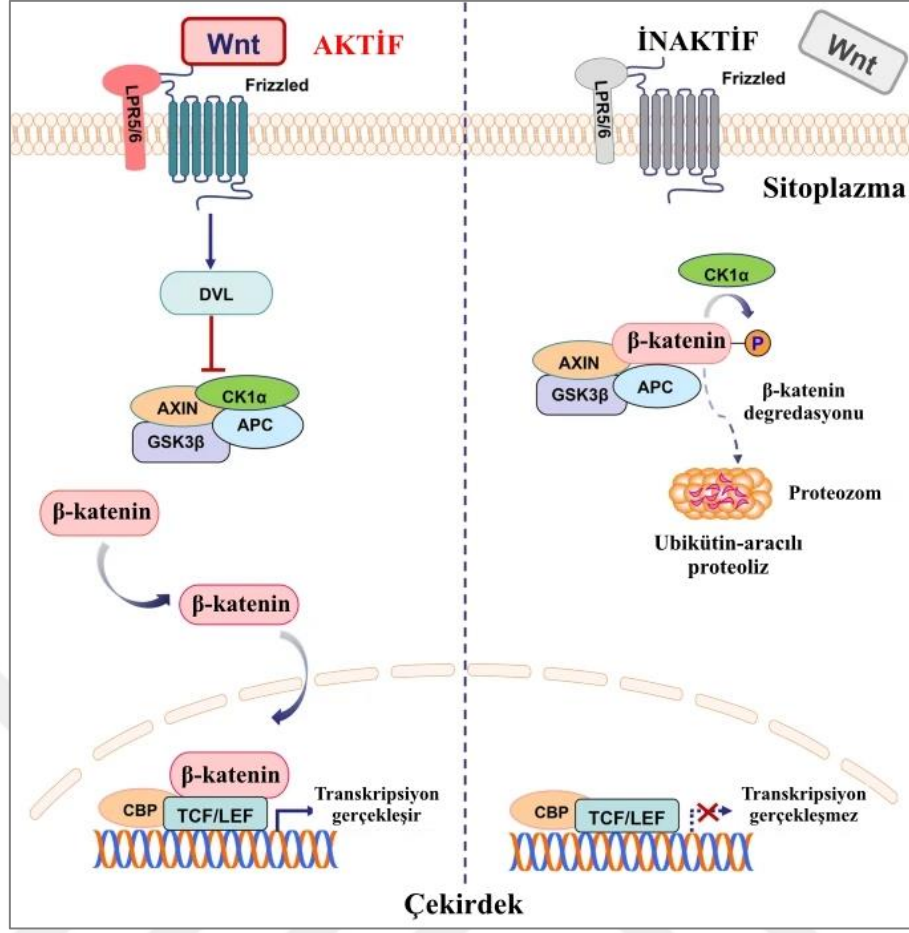
Üç farklı Wnt sinyal yolu vardır;

- a. Kanonik Wnt/ β -katenin yolu ve
- b. Kanonik olmayan Wnt/ Ca^{++} yolu
- c. Kanonik olmayan Wnt/Planar Hücre Polarite yolu

Kanonik Wnt sinyali, kök hücre yenilenmesi ve farklılaşması gibi hücre kaderinin belirlenmesinde yer alırken; kanonik olmayan Wnt sinyali genellikle hücre hareket, morfolojik değişiklikler ve doku organizasyonu ile ilgilendirilir (65,66). Kanonik olmayan Wnt sinyali, β -kateninden bağımsız Wnt yollarını belirtir (66).

2.6.1. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolu

Kanonik Wnt yolu olarak da adlandırılan Wnt/ β -katenin sinyal yolu, normal hücrelerde bir Wnt ligandı tarafından başlatılan ve β -katenin protein seviyesinin stabilizasyonu ile sonuçlanan çok basamaklı moleküler bir süreçtir. Wnt/ β -katenin sinyal yolu esas olarak hücredeki β -katenin seviyesine bağlıdır. Kanonik Wnt yolu aktivasyonu, bir Wnt ligandının, Frizzled reseptör ve LRP5/6 yardımcı reseptöründen oluşan aynı kökenli reseptör kompleksine bağlanmasıyla başlar (64,67,68).



Şekil 2.14. Wnt/β-katenin sinyal yolağı (69).

Bu bağlanma sonucunda oluşan sinyal önce sitoplazmaya geçer ve Dishevelled (DVL) molekülünün fosforilasyonu uyarılır. Fosforile olan DVL; Axin, APC (adenomatöz polipozis koli), CK1 (kazein kinaz-1) ve GSK-3β (glikojen sentaz kinaz 3β) ile birleşerek, β katenin kompleksinin fosforile edilmesini engeller. Fosforillenmemiş β-katenin ubikütinizasyon ve proteazomal degradasyondan kaçır ve sitoplazmada birikir. Daha sonra sitoplazmada artan β-katenin'in çekirdeğe translokasyonu gerçekleşir. Çekirdeğe geçen β-katenin, transkripsiyon faktör ailesi olan TCF/LEF (T-hücre faktörü/lenfoid artırıcı faktör) üyelerine bağlanarak çekirdekteki hedef genlerin transkripsiyonuna neden olur (70–72). Wnt yokluğunda β-katenin, GSK-3β'yi içeren multiprotein yıkım kompleksi tarafından fosforile edilir ve ubikütin proteozomal sistem tarafından yıkımı gerçekleşir. β-katenin sitoplazmada yıkıma uğradığından çekirdeğe geçerek nükleer transkripsiyonu aktive edemez (5,70,72–74).

Kanonik Wnt yolağındaki sinyalde bozulmalar tümör gelişimi ve kanser ile de ilişkilidir. Bugüne kadar Wnt yolu hepatosellüler karsinom, meme kanseri gibi birçok kanser türüyle ilişkilendirilmiştir (5,70).

İnsanda, 19 Wnt geni tanımlanmıştır (75). Drosophila'da Wingless'in antikor boyaması yapılan bir çalışma, Wnt proteinlerinin uzak komşu hücreler üzerinde hareket etmek için konsantrasyona bağlı bir şekilde uzun menzilli morfogenetik moleküller olarak işlev gördüğünü göstermiştir. Wnt-1, Wnt-3a ve Wnt-8b kanonik Wnt ligandlarına; Wnt-4, Wnt-5a ve Wnt-11 ise kanonik olmayan Wnt ligandlarına örnek verilebilir (70,75).

β -katenin geni (CTNNb1) tarafından kodlanan β -katenin proteini ilk olarak hücre adezyon bağlantılarının bir bileşeni olarak keşfedilmiştir. β -katenin; kadherinleri aktin filamentine bağlayarak hücre adezyon bağlantılarını destekler. Hücre tipine bağlı olarak sitoplazmada ve bazen çekirdekte değişken düzeyde serbest β -katenin bulunmuştur, bu da β -katenin'in transkripsiyonel düzenlemede de bir fonksiyonu olduğunu göstermiştir. Bu nedenle β -katenin, bir transkripsiyon faktörü olarak kabul edilir. Normal fizyolojik koşullarda sitoplazmada serbest β -katenin protein düzeyi sıkı bir şekilde kontrol edilir. Sitoplazmik β -katenin, normal hücrelerin çoğunda herhangi bir Wnt uyarıcısı veya aktive edici mutasyonun yokluğunda, düşük düzeyde tutulması için proteozomal sistem tarafından sürekli olarak yıkılır (64,67,76).

2.6.2. Trofoblastlarda Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı

Trofoblast hücrelerinin hızlı oluşumunun, plasenta gelişimine katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir (60). Wnt sinyal yolu, organ gelişimi ve doku homeostazında çok önemli bir role hizmet ettiğinden, trofoblastların gelişimi ve farklılaşmasında da önemli rollere sahip olması muhtemeldir (61).

Yakın zamanda yapılan bir çalışma, insan plasentasında 14 Wnt ligandının eksprese edildiğini göstermiştir, bu da plasental gelişimde Wnt sinyal yolunun önemli bir fonksiyonu olduğuna işaret etmektedir (62).

Wnt sinyali, erken trofoblastların gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (68-70). Çeşitli çalışmalar ayrıca ekstraembriyonik dokuların gelişiminde özellikle plasentanın vaskülarizasyonunda Wnt sinyalinin rolünü göstermiştir (71,72).

Wnt sinyali ayrıca trofoblast invazyonuna da katkıda bulunmaktadır (78). Yapılan bir çalışmada Wnt1, Wnt7A, Wnt10A ve Wnt10B ekspresyon seviyelerinin ilk trimester trofoblastlarında term trofoblastlarla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülürken, Wnt1 ve Wnt2B'nin EVT'lerde daha güçlü eksprese edilmesi, Wnt'nin trofoblast invazivliğini düzenleyebileceğini düşündürmektedir (62). Wnt/ β -katenin sinyal yolunun hiperaktivasyonu, koryokarsinom gibi trofoblast bozukluklarına yol açabilirken, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun downregülasyonu preeklampsiye yol açabilir. Bir çalışmada, normal plasental dokulara kıyasla preeklampside Wnt2 ve β -katenin ekspresyon seviyelerinin azalması, Wnt sinyal yolunun plasental dokuların gelişiminde bir rol oynayabileceğini göstermiştir. (14,16).

Wnt/ β -katenin sinyal yolunun aynı zamanda blastokistleri de etkileyebileceği ve meydana gelen en önemli patolojik değişikliklerden biri olan spiral arterin yeniden şekillenmesinde yaşanan anormalliklerin ana nedeni olabileceği düşünülmektedir. Wnt1, en önemli Wnt ligandlarından biridir ve term trofoblastlarla karşılaştırıldığında, ilk trimester trofoblastlarında Wnt1'in ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiş, bu sebeple Wnt1'in trofoblast invazyonunu düzenleyebileceğini düşündürmektedir (77,78).

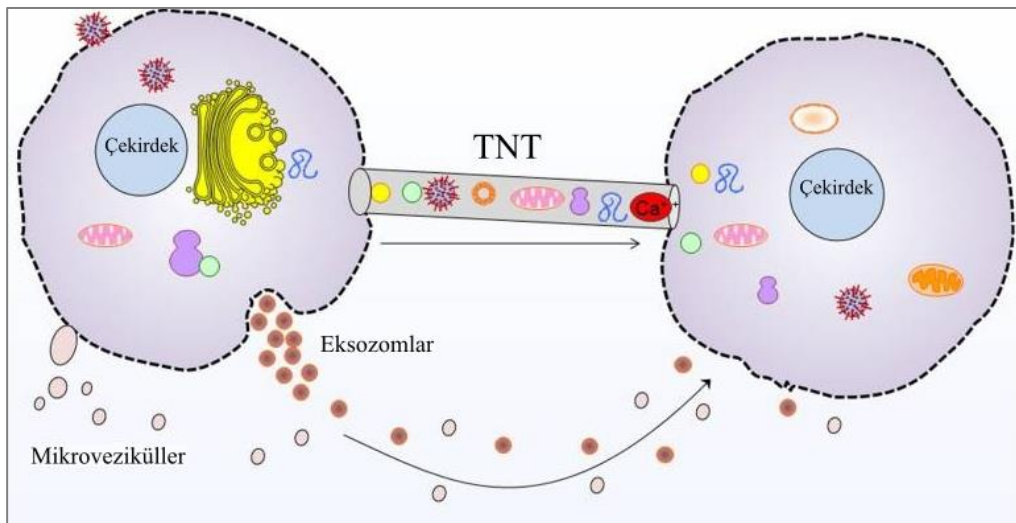
Wnt-sinyal yolağı bileşenlerinin, gestasyonel hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patogenezinde yer aldığı ortaya çıkmıştır. APC ve sFRP2 genleri ve koryokarsinom hücreleri ile yapılan bir çalışmada, Wnt sinyalinin inaktivasyonunun trofoblastik kanser hücrelerinin patogenezinde önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir (82). Bu sonuçlar, Wnt sinyal yolunun preeklampsi ile yakından ilişkili olduğuna dair kuvvetli kanıtlar sunmaktadır.

Birçok hastalıkta anormal Wnt/ β -katenin sinyali gözlenmiştir. Preeklampsi patogenezinin daha iyi anlaşılması için gelecekteki çalışmalar, trofoblastlar içindeki Wnt/ β -katenin sinyalinin preeklampsi gelişimine katılıp katılmadığını doğrulamaya yardımcı olacaktır (78).

2.7. Tünel Oluşturan Nanotüpler

Hücrelerin normal düzeyde çoğalması ve fonksiyon görmesi için çok büyük önem taşıyan hücreler arası iletişim mekanizmaları, hücreler arası iletişimi ifade eder. Çok hücreli organizmalar, hücreler arasında iletişim bağlantıları kurarak hücre davranışını koordine eder, morfogenezini düzenler ve doku homeostazını sürdürürler. Hücreler, birbirleriyle doğrudan temas yoluyla veya bir hücreden başka bir hücreye madde salınmasıyla birbirlerine sinyal verirler (79,80). Diğer hücrelerden gelen sinyallere yanıt verme yeteneğini kaybeden hücreler ise kanser hücreleri haline gelebilir. İntegrinler, tetraspaninler ve kaderinler gibi hücre yapışma moleküllerini içeren reseptör aracılı etkileşimler ve komşu hücreler arasındaki hücreler arası bağlantılar (gap junctionlar vb), hücreler arasında doğrudan fiziksel temas ile oluşturulan biyolojik iletişim ve sinyal iletimi mekanizmalarıdır. Ayrıca sitokinlerin ve kemokinlerin salgılanması, mikroveziküller veya eksozomların salınması da hücreler arası iletişim mekanizmalarındandır (4,81,82).

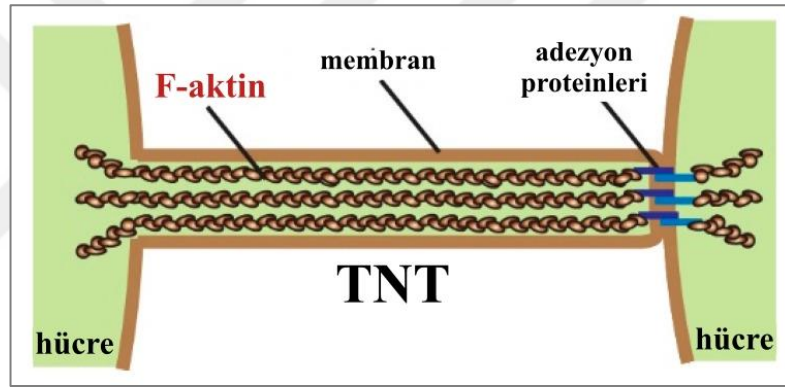
İlk olarak 2004 yılında Rustom ve arkadaşları tarafından PC12 hücrelerinde tanımlanan tünel oluşturan nanotüpler (TNT), F-aktin içeren ince filamentöz membranöz uzantılı yapılar olarak tanımlanmaktadır (83). TNT'ler, hücreler arası iletişimde en yeni ve güncel mekanizmalardan biri olması sebebiyle dikkat çekmektedir (84).



Şekil 2.15. Tünel oluşturan nanotüplerin şematik gösterimi (4).

TNT'ler, biyolojik materyali özellikle uzun mesafede bulunan hücreler arasındaki sitoplazmik köprüler yoluyla taşır ve değişimini kolaylaştırır. Bu uzantılar, küçük moleküller (örneğin kalsiyum iyonları), makromoleküller (nükleik asitler, proteinler, vb.), miRNA'lar hatta organeller gibi (veziküller, lizozomlar, mitokondri, otofagozomlar, vb.) çeşitli büyüklükteki kargoların hücreler arasında taşınmasına olanak sağlayan eşsiz yapılardır (85,86).

Metabolik ihtiyaçların, besinlerin, nükleik asitlerin ve ayrıca stres faktörleri ve organellerin hızlı bir şekilde temas halinde olmayan hücreler arasındaki uzun mesafeli değişimler yoluyla hızlı bir şekilde dengelenmesine izin veren bu TNT'ler, mesafe ve doku çeşitliliğinden bağımsız olarak hücreler arasında hızlı ve spesifik yanıtları kolaylaştırır (87).



Şekil 2.16. TNT'nin yapısı ve genel bileşenleri (88).

TNT'lerin genel karakteristik özellikleri aşağıda listelenmiştir.

- 1) F-aktin molekülü içerirler.
- 2) 50-700 nm arasında bir çapa sahiptirler (ortalama 200 nm).
- 3) Hücre tipine ve hareketine göre farklılık göstermekle birlikte uzunlukları çoğu hücre tipinde 10-100 μm arasında değişir (maks. 300 μm).
- 4) Bağlı hücrelerin plazma membranının sürekliliğini sağlarlar.
- 5) Açık uçlu ve kapalı uçlu olabilirler.
- 6) Çeşitli büyüklüklerdeki hücresel kargoların taşınmasını sağlarlar.
- 7) Farklı hücre tiplerinde uzunlukları, kalınlıkları ve bileşenleri farklılık gösterebilir (89).

Tablo 2.1. Farklı hücre tiplerindeki TNT özellikleri (90).

Hücre adı	Uzunluk	Kalınlık	Hücre iskeleti
PC12	Ort. 6 µm	50 - 200 nm	aktin var, mikrotübül yok
HEK293	N/A	< 500 nm	aktin var, mikrotübül yok
Jurkat T hücreleri	Ort. 22 µm, maks. 100 µm	< 380 nm	aktin var, mikrotübül yok
ARPE-19	Ort. 44 µm, maks. 120 µm	50 – 300 nm	aktin var, mikrotübül yok
NRK	Maks. 70 µm	N/A	aktin var, mikrotübül yok
HeLa	Ort. 17.7 µm, maks. 40 µm	N/A	aktin var, mikrotübül yok
Kardiyak miyoblast H9c2 hücreleri	Maks. 100 µm	< 1000 nm (AFM)	aktin var, mikrotübül yok
İnsan akciğer karsinom A549	Maks. 105 µm	400 – 1500 nm	aktin var, mikrotübül yok
İnsan monosit-kökenli makrofajlar	N/A	700 nm	aktin ve mikrotübül var

TNT'ler yüzlerce mikrometre uzaklıktaki hücreleri doğrudan birbirine bağlar. Bu benzersiz morfolojik özellikler onları filopodia ve sitonem gibi diğer hücresel TNT-benzeri uzantılardan farklı kılar. Oldukça hassas yapılar olan TNT'ler özellikle *in vitro* çalışmalarda gözlemlenebilmiştir. Dokulardaki TNT oluşumları, faz farkına neden olan yoğun ekstraselüler matriks nedeniyle *in vitro* çalışmalardaki gibi düz bir uzantı halinde ve kolay gözlemlenebilir değildir (90).

Yapılan çalışmalar ile elde edilen veriler, TNT'lerin gelişimsel süreçlerde, doku rejenerasyonunda, viral enfeksiyonlarda, patojen transferinde, kök hücre farklılaşmasında, bağışıklık tepkilerinde, nörodejeneratif bozukluklarda, kanserin ilerlemesinde ve pek çok hastalıkta rol aldıklarını göstermektedir (91–94).

TNT'lerin hücrelerin fizyolojik ve patolojik durumuyla yakından bağlantılı olduğu; oksidatif stres, iskemi veya hipoksi gibi patolojik değişikliklerin veya dalgalanan fizyolojik ve çevresel koşulların neden olduğu çeşitli stres faktörlerini dengelemek amacıyla da rolleri olduğu düşünülmektedir (93,94). Bu nedenle TNT'leri terapötik potansiyel hedefler olarak araştırmak gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

Bu bilgilerin ışığında; çalışmamızda HTR-8/SVneo ekstravillöz trofoblast ve JEG-3 koryokarsinom hücre hatlarında hipoksi indüklemesi ile *in vitro* preeklampsi modeli oluşturulması ve tünel oluşturan nanotüpler ile Wnt/ β -katenin sinyal yolağının preeklampsideki olası rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Hücre Hatları

Hücre kültürü deneyleri için insan plasenta dokusuna ait HTR-8/SVneo (ATCC® CRL- 3271) ekstrasvillöz trofoblast hücre hattı ve JEG-3 (ATCC® HTB-36) koryokarsinom hücre hattı kullanıldı. HTR-8/SVneo hücre hattı gebeliğin 1. trimesterine (6-12 hafta) ait sağlıklı trofoblast hücreleri olup adherent (yapışkan) özelliktedir. JEG-3 koryokarsinom hücre hattı adherent (yapışkan) özellikte tümörjenik hücrelerdir. Kullanılan hücre hatlarına ait bilgiler Tablo 3.1’de verilmiştir. Deneyler boyunca HTR-8/SVneo ve JEG-3 hücre hatlarının Pasaj 8-10 arasında kullanılmasına dikkat edilmiştir. Her deney öncesi morfolojileri kontrol edilerek deneylere devam edilmiştir.

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan hücre hatlarına ait bilgiler.

	Hücre Hatları	Hücre Tipi	Marka	Cat #
1	HTR8/Svneo	Ekstrasvillöz Trofoblast (1.trimester)	ATCC	CRL-3271
2	JEG-3	Koryokarsinom	ATCC	HTB-36

3.1.2. Hücre besiyerleri

HTR-8/SVneo (ATCC® CRL-3271) ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinin çoğaltılması ve sonraki deneyleri için RPMI-1640 (Capricorn) besiyeri kullanılmıştır. JEG-3 (ATCC® HTB-36) koryokarsinom hücrelerinin çoğaltılması ve sonraki deneyleri için MEM (Eagle’s Minimum Essential Medium) kullanılmıştır.

3.1.3. Antikorlar

Hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen immünolojik boyama yöntemlerinde ve Western Blot analizlerinde kullanılmak üzere uygun primer ve sekonder antikorlar

seçilmiştir. Deneyleerde kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Deneyleerde kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları.

	Antikor Adı	Marka	Cat #	Uygulama ve Dilüsyon Oranı
1	HIF1-alpha	Bioss	bs-0737r	WB (1:500), IF & ICC (1:100)
2	HIF1-alpha	St Johns Lab	STJ93498	WB (1:500), IF & ICC (1:100)
3	Wnt-1	Santa Cruz	sc-514531	WB (1:500), IF & ICC (1:100)
4	Beta-catenin	Santa Cruz	sc-7963	WB (1:500), IF & ICC (1:100)
5	Beta-actin	Bioss	bs-0061R	WB (1:1000)
6	Anti-rabbit Sekonder	Abcam		WB (1:1000)
7	Anti-mouse Sekonder	Abcam		WB (1:1000)
8	Alexa-Fluor 647 (sekonder)	Abcam		IF (1:100)
9	Alexa-Fluor 488 (sekonder)	Abcam		IF (1:100)
10	AEC Substrate System	Thermo Scientific		ICC

3.1.4. Mikroskoplar

Deneyleer ve analizler sırasında kullanılan mikroskop çeşitleri Tablo 3.3.'te sunulmuştur.

Tablo 3.3. Deneyleer ve analizlerde kullanılan mikroskoplar.

	Mikroskop Çeşitleri	Marka
1	Işık Mikroskop	Leica, DM5000B
2	Floresan Mikroskop	Olympus, BX43
3	Ters Işık Mikroskobu (Inverted)	Olympus, IX73

3.1.5. Kullanılan Diğer Kimyasallar ve Solüsyonlar

Western blot analizi için; yürütme tampon solüsyonu (40 ml SDS Buffer + 760 ml distile su), blotlama tampon solüsyonu (1 litre distile su içerisinde 3,025 gr Tris +

14,4 gr glisin + 200 ml metanol), bloklama tampon solüsyonu (%5 süt tozu, %0,1 Tween 20; 0,5 gr süt tozu + 50 ml (1x) PBS Tween), PBS Tween (500 ml (1x) PBS + 500 µl Tween), Ponceu boyası (%0,2 Ponceau S, %5 glasiyal asetik asit; 0,1 gr toz Ponceu S + 100 ml distile su + 1 ml asetik asit) kullanılmıştır. Solüsyonlar çoğunlukla taze olarak hazırlanarak kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Kültürü

Deneylerde kullanılan HTR-8/SVneo hücre hattı için RPMI-1640 (w/L- glutamine, HEPES) medyum içerisine %10 Fetal Sığır Serum (FBS) (Capricorn), %1 glukoz solüsyonu (Gibco, A24940-01), %1 sodyum piruvat (Gibco, 11360-070) ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) (Gibco, 15140-122) eklenerek kullanıldı. JEG-3 koryokarsinom hücre hattı için EMEM (EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) içerisine %10 Fetal Sığır Serum (FBS) (Capricorn) ve penisilin-streptomisin (Gibco, 15140-122) eklenerek kullanıldı. Hücre hatları 75 cm²'lik flasklarda, 37 °C ve % 5 CO₂ koşullarını sağlayan inkübatör içerisinde çoğaltıldı. Flask yüzeyini kaplayarak yaklaşık %80 konfluensiye ulaşan hücreler önce Dulbecco'nun fosfat tampon tuz çözeltisi (DPBS) (Capricorn) ile 2 kere yıkandı. Hücrelerin üzerine 2 ml Tripsin-EDTA (%0.25) (Gibco) eklendikten sonra 3 dakika 37°C inkübatörde bekletildi. Flask yüzeyinden kalkan hücreler Invert mikroskopta kontrol edildi. Flasklara medyum eklenip tripsinin aktivitesi durdurularak süspansiyon edildikten sonra, 15 ml'lik steril falkonlara alınan hücre süspansiyonu 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atılarak falkonun dibinde kalan hücre pelletine medyum eklenerek süspansiyon edildi. Daha sonra süspansiyon hücrelerden yeni bir 75 cm²'lik flaska ekim yapıldı. Üzerine medyum eklenerek yeniden çoğaltılmaları sağlandı. Bütün hücre kültürü işlemleri hepa filtreli steril laminar kabin içerisinde gerçekleştirildi.

3.2.2. Morfolojik Değerlendirme

HTR-8/SVneo ekstrasvillöz trofoblast hücre hattı ve JEG-3 koryokarsinom hücre hattı için morfolojik değerlendirme yapmak amacıyla Hematoksilen ve Eozin boyaması yapıldı.

Önce yuvarlak lameller yerleştirilen 6 kuyucuklu plaklara, her bir kuyucuğa 2 ml miktarında medyum içerisinde süspanse hücreler ekildi. Her bir kuyucuk için hücre konsantrasyonu ve sayısının yaklaşık/eşit olmasına dikkat edildi.



Şekil 3.1. Hücrelerde Hematoksilen ve Eozin boyama işlemi.

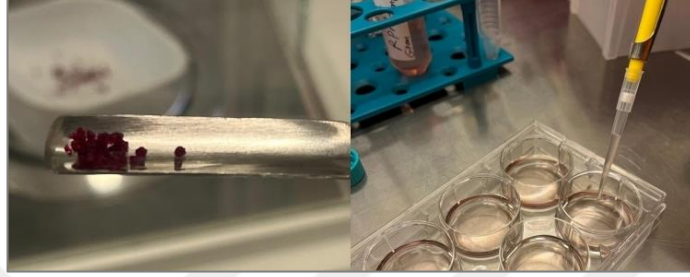
Lamellere yapışan ve yeterli konfluensiye ulaşan hücrelerin üzerinden medyum çekilerek PBS ile 2 kez yıkandı. Daha sonra %4 PFA (paraformaldehit) ile 10 dakika fikse edildi. Tekrar PBS ile yıkandı. Lam üzerine alınan lamellerin etrafı sonraki adımlarda uygulanacak solüsyonlar üzerine damlatılıp çekildiği için hidrofobik pap-pen ile çizildi. Azalan alkol serilerinden (%100-96-75) 2'şer dakika bekletilerek geçirildi. Hematoksilen ile 5 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandı. Eozin ile 1 dakika bekletildi. Artan alkol serilerinden (%75-96-100) hızlıca geçirildi. Ksilol ile 25-30 dakika bekletildi. Yeni ve temiz bir lam üzerine entellan damlatılıp hücrelerin olduğu lameller hücre yüzeyi altta kalacak şekilde ters çevrilerek kapatıldı. Görüntüleme için ışık mikroskop kullanıldı.

3.2.3. Hipoksi İndüklemesi

Kimyasal hipoksiyi indüklemek amacıyla kullanılan ve hücre büyüme ortamına verilen kobalt klorür (CoCl_2), HIF-1 α 'yı hidroksile edecek prolin hidroksilazlara bağlanarak onların aktivitesini durdurur. Böylece HIF-1 α hidroksile edilemez, proteozomal yıkımı gerçekleşemez ve hücredeki miktarı artar.

Hipoksiyi indüklemek amacıyla CoCl_2 (Sigma, CAS: 7791-13-1) toz halde temin edildi ve solüsyon hazırlanarak kullanıldı. Distile su içerisinde CoCl_2 çözülerek

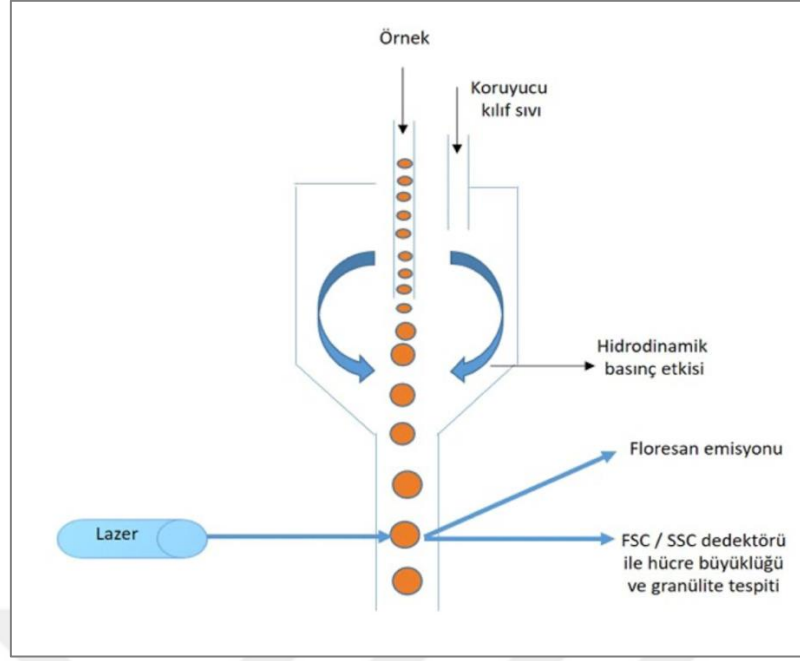
konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde stok solüsyon hazırlandı. Flasklarda çoğaltılan hücreler 6 kuyucuklu plaklara ekildi. Hücreler yüzeye yapıştıktan sonra medyum değiştirilirken yeni medyumlar içerisine 100 μ M, 150 μ M ve 250 μ M olacak şekilde stok solüsyondan eklendi ve düşük dozlar olan 100 μ M, 150 μ M için 24 saat, yüksek doz olan 250 μ M için ise 4 saat süresince inkübe edildi. Kobalt klorür (CoCl_2) her deney için taze hazırlandı.



Şekil 3.2. Toz halindeki kobalt klorür'den uygun konsantrasyonlarda solüsyon hazırlanıp hücrelere uygulanması.

3.2.4. Akım Sitometri ile Hücre Canlılık Analizi

Akım sitometrisi, tamponlu tuz bazlı bir çözelti (PBS) içinde hücreleri veya parçacıkları tekli veya çoklu lazerlerden geçerken ışık dağılım tespiti ile her parçacığı hızlı bir şekilde analiz edebilen gelişmiş bir teknolojidir. Canlı hücreleri ölçmek için hızlı ve güvenilir bir yöntem olan akım sitometrisi, hücrenin ilaç tedavilerine, kimyasallara veya diğer çevresel faktörlere tepkisini değerlendirmek için kullanılan önemli bir adımdır.



Şekil 3.3. Akım sitometri analizinin çalışma prensibi.

Propidyum iyodür (PI) reaktifi, akım sitometrisi analizlerinde ölü hücreleri canlı hücrelerden ayırt etmek için kullanılan, kullanımı kolay bir nükleik asit boyasıdır. Propidium iyodür membran geçirgen değildir. Membran bütünlüğünü kaybeden ölü hücrelerde DNA'ya bağlanır, böylece canlı ve ölü hücrelerin ayrımı yapılır (95,96).

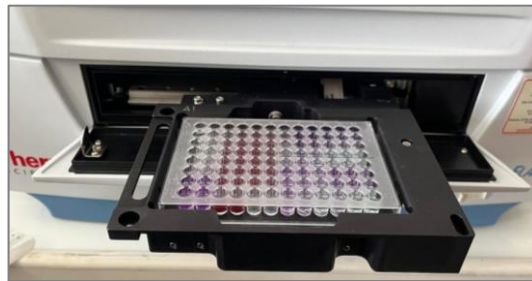
Deneylerde kullanılan HTR-8/SVneo ektravillöz trofoblast ve JEG-3 koryokarsinom hücreleri üzerinde CoCl_2 'nin hücre canlılığına etkisini incelemek amacıyla akım sitometrisi analizi yapıldı. Hücreler 6 kuyucuklu plaklara ekildikten ve yapıştıkları gözlemlendikten sonra hipoksi indüklemek amacıyla 100 μM , 150 μM ve 250 μM konsantrasyonlarında CoCl_2 uygulandı. Deney süreleri sonunda hücrelerin üzerindeki medyumlar 15 ml'lik falkon tüplere alındı. Hücreler daha sonra %0.25 Tripsin-EDTA ile 2 dakika 37°C'de inkübe edildi. Yüzeyden kalkan hücreler de medyumlarının olduğu 15 ml'lik falkonlara alınarak 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kalan pellete 2'şer ml PBS eklenerek ependorflara alındı ve santrifüj edildi. Ependorflardaki hücrelerin içerisine 5'er μl propidyum iyodür (PI) eklenerek 5 dakika oda ısısında ve karanlıkta inkübe edildi. Sonrasında örnekler Acea Novocyte Akım Sitometri Sistemi ve NovoExpress yazılımı ile analiz edildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildi.

3.2.5. Western Blot Analizi için Örneklerin Hazırlanması

Hücrelerde HIF-1 α , Wnt-1 ve β -katenin protein düzeylerini kantitatif olarak ölçmek amacıyla Western blot (WB) analizi yapıldı. Deney süresi sonunda 6 kuyucuklu plaklardaki hücrelerin medyumu çekilip PBS ile 3 kez yıkandı. Ardından taze hazırlanan ve 1:100 oranında proteaz inhibitör kokteyli eklenen RIPA lizis tamponundan her kuyucuğa 50 μ l eklenerek cell scraper ile kazıma ve parçalama işlemi yapıldı. Ependorflara alınan örnekler sonikatörden (Bandelin, Sonopuls) geçirildikten sonra 14000 rpm'de 10 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ependorfun alt kısmındaki bulutsu yapı bırakılarak üst kısmında kalan süpernatantı ayrı ependorfa konuldu ve -20°C'ye kaldırıldı. Protein denatürasyonunu önlemek amacıyla bütün işlemler kuru buz üzerinde gerçekleştirildi.

3.2.6. BCA Assay ile Protein Miktar Tayini

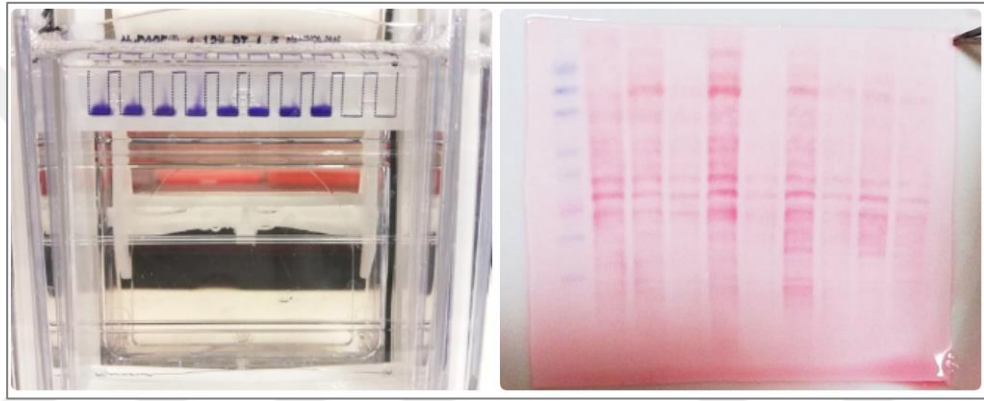
Hücrelerde Western blot analizi gerçekleştirilmeden önce örneklerin protein miktarını tayin etmek amacıyla Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Cat no: 23225) kullanıldı. Kitin içerisinde yer alan uygulama adımlarına uyularak önce standartlar ve uygun dilüsyonları kuyucuklara konularak hazırlandı. BCA Reagent A ve BCA Reagent B (50:1 oranında) karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Daha sonra da hücre örnekleri eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Sonuçlar spektrofotometre (Varioskan Plate Reader, Thermo) cihazında Skanlt yazılım programı ile 562 nm dalga boyunda okutuldu. Okunan değerlere göre hesaplama yapılarak Western blot analizi için her bir örneğin protein konsantrasyonuna göre RIPA lizis tamponu ile dilüsyonu yapıldı.



Şekil 3.4. BCA protein miktar tayini için örneklerin cihazda okutulması.

3.2.7. Western Blot Analiz Protokolü

Western blot analizinin gerçekleştirileceği gün -20°C 'den çıkarılan örneklerin her birinden 20 μl ayrı tüplere alındı ve üzerlerine 5'er μl (10X) örnek tamponu (sample buffer) (%4 SDS, %10 2- merkaptoetanol, %20 gliserol, %0,004 bromfenol mavisi, 0.125M Tris-HCl pH: 6.8) eklendi. Proteinler Dryblock cihazında 95°C 'de 10 dakika kaynatılarak denatüre edildi. Örnekler yürütme tamponu içerisindeki hazır jellere (Thermo, NuPAGE™ %4-12 Bis-Tris Protein Gels, 1.5 mm) yüklendi ve bir kuyucuğa da 10 μl marker (Benchmark protein ladder) yüklendi. Örnekler elektroforez yöntemiyle (120V, 1 saat 40 dakika) oda ısısında yürütüldü.



Şekil 3.5. Western blot yürütme cihazına örneklerin yüklenmesi ve Ponceu boyaması ile membrandaki bantların görüntülenmesi.

Proteinlerin membranlara transferi semi-dry (yarı-kuru) yöntem kullanılarak yapıldı. Yürütme tamamlanınca sandviç yöntemi ile Nitroselülöz membrana blotlama yapılması için membran blotlama solüsyonunda ıslatıldı. Blotlama cihazına 4 adet yuvarlak filtre kâğıdı koyulup blotlama solüsyonuyla iyice ıslatıldı ve sırasıyla membran ve jel koyuldu. Üzerine tekrar 4 kat ıslatılmış filtre kâğıdı koyuldu. Arasında hava kalmaması için özel merdane ile üstünden geçildi. Cihaz kapağı kapatılarak blotlama işlemi (200 mA, 1 saat 30 dakika) gerçekleştirildi. Proteinler Ponceau çözeltisiyle kontrol amaçlı (%0,2 Ponceau S, %5 glasiyal asetik asit) boyandı.

Spesifik olmayan bağlanmaları bloklamak için membran 1 saat bloklama tamponunda (%5 süt tozu, %0,1 Tween20) bırakıldı. Aralarda PBS Tween ile 3 kez 5'er dakikalık yıkamalar yapıldı. Membran primer antikolar ile (HIF-1 α , 1:1000, Bioss; Wnt-1, 1:500, Santa Cruz; B-catenin, 1:500, Santa Cruz) gece boyu $+4^{\circ}\text{C}$ 'de

inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tekrar PBS Tween ile yıkandı. Sekonder antikor taze hazırlandı (1:2000) ve 1 saat inkübe edildi. Ardından PBS Tween ile yıkama yapıldı. Görüntüleme için ECL solüsyonuna (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo) ait A ve B solüsyonları 1:1 oranında karıştırılıp hazırlandı ve membranın üzerini kaplayacak şekilde dökülüp karanlıkta 4 dakika inkübe edildi. Membran cihazın içerisine yerleştirilip “3 dakika, 2 saniye, 200.000 milisaniye” ayarında görüntüleme yapıldı. Oluşan ışımaya jel görüntüleme sisteminde (UVP-GelDoc-It2 310) izlendi. Western Blot analizinde elde edilen bantlarda yoğunluk belirleme çalışmaları Image J programı ile yapıldı, normalizasyon için β -aktin protein bant görüntüleri kullanıldı.

3.2.8. İmmün İşaretleme Yöntemi

Hücrelerde HIF-1 α , Wnt-1 ve β -katenin proteinlerinin sitoplazma ve nükleustaki yerleşim ve ekspresyonlarını göstermek amacıyla immün işaretleme yöntemi kullanıldı. Deney sonunda, 6 kuyucuklu plaklarda yuvarlak lameller üzerine yapışmış hücreler PBS ile 2 kez yıkandı. Hücreleri fikse etmek için %4 PFA ile 10 dakika inkübe edildi. Lamellar üzerine alınıp hidrofobik pap-pen ile etrafı çizilen örnekler tekrar PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için bloklama solüsyonu ile 1 saat inkübe edildi. PBS ile tekrar yıkandıktan sonra taze dilüe edilip hazırlanan primer antikor eklenerek gece boyu +4°C’de inkübe edildi.

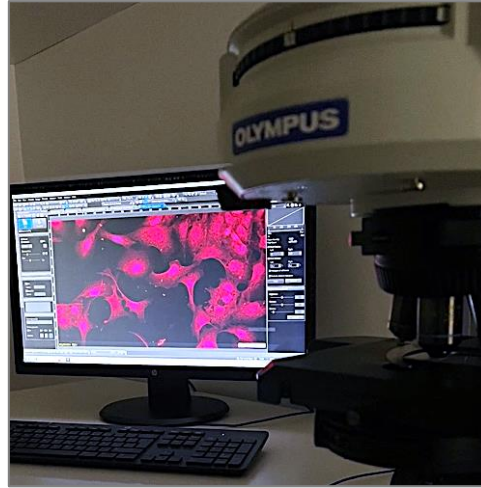
Ertesi gün primer antikor üzerlerinden çekilerek PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra Biotinli sekonder antikor ile 1 saat inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra Streptavidin solüsyonu ile 30 dakika inkübe edildi.

Reaksiyonun görünür hale gelebilmesi için AEC solüsyonu taze hazırlanıp üzerlerine eklendi ve mikroskop altında kontrol edilerek inkübasyon süresi ayarlandı. Yıkamanın ardından çekirdek boyanması için Mayer’s Hematoksilin ile 30 saniye inkübe edildi ve su bazlı kapatıcı ile kapatıldı. Değerlendirmeler ışık mikroskobu ile yapıldı.

3.2.9. İmmüfloresan Boyama Yöntemi

Hücrelerdeki HIF-1 α proteinini görüntülemek amacıyla immüfloresan boyama yapıldı. Hipoksi uygulamasının ardından 6 kuyucuklu plaklarda lameller üzerindeki hücrelerin medyumları hızlıca çekildi ve PBS ile yıkandı. Daha sonra %4 PFA ile oda sıcaklığında fikse edildi ve kuyucuklar içindeki lameller lam üzerine alınarak pap-pen ile etrafı çizildi. Ardından iki kez 1x PBS ile yıkandı. Ardından permeabilizasyon için %0.5 Triton X-100 ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücreler tekrar iki kez 1x PBS ile yıkandı. Sonrasında %5 FBS ile 30 dakika muamele edildi. Primer antikor (HIF-1 α , 1:100, Bioss) PBS ile dilüe edilerek taze hazırlandı. Hücrelerin üzerindeki FBS çekilerek PBS ile yıkandı ve primer antikor eklenerek +4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

Ertesi gün primer antikor çekilip PBS ile yıkandı ve sekonder antikor (Texas Red, 1:100) ile 1 saat karanlık ortamda inkübe edildi. Ardından sekonder antikor çekilerek PBS ile yıkandı ve DAPI içeren kapatma medyumunu ile kapatılarak görüntüleme yapılana kadar karanlık kutuda saklandı. Floresan mikroskop (Olympus) ve CellSens yazılım programı ile görüntüleme yapıldı.



Şekil 3.6. Floresan mikroskop ile örneklerin görüntülenmesi.

Hücrelerde TNT oluşumlarını göstermek için yapılan floresan boyamada Flash Phalloidin Green 488 (Cat no: 424201, Biolegend) kullanılmıştır. Phalloidin, bisiklik bir peptid moleküldür ve hücrelerde filamentli F-aktin'in görüntülenmesi ve stabilize

edilmesi için çok kullanışlı bir probdur. Boyama prosedürü için markanın kendi protokolü dikkate alınıp optimize edilerek çalışılmıştır.

Öncelikle Flash Phalloidin™ Green 488, 1.5 mL metanol ile sulandırılarak stok solüsyonu hazırlandı. Daha sonra 1x PBS içinde 1:20-100 dilüsyon aralığında seyreltilerek uygun konsantrasyon hazırlandı. Her uygulamada optimum performans için taze hazırlanarak kullanıldı. İçerisine yuvarlak lamel yerleştirilmiş kuyucuklardaki hücreler %4 PFA ile oda sıcaklığında fikse edildi ve lam üzerine alınarak pap-pen ile etrafı çizildi. Ardından iki kez 1x PBS ile yıkandı. Ardından permeabilizasyon için %0.5 Triton X-100 ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücreler tekrar iki kez 1x PBS ile yıkandı. Sonrasında %5 FBS ile 30 dakika muamele edildi.

Flash Phalloidin™ Green 488 stok solüsyondan 1x PBS içinde 1:100 oranında seyrelterek çalışma solüsyonu hazırlandı. Floresan ışımının solmaması için karanlıkta çalışıldı. Hücrelerin üzerindeki FBS çekilerek, hazırlanan Flash Phalloidin™ Green 488 çalışma solüsyonu eklendi ve 2 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Ardından solüsyon üzerinden çekilerek DAPI'li kapatma medyumu ile kapatıldı. Floresan mikroskop (Olympus) ile görüntüleme yapıldı. TNT oluşumlarını değerlendirmek için 10 farklı alanda x200 büyütmede sayım ve ölçüm yapıldı. Görüntüleme için hücre yoğunluğunun yaklaşık %30-40 olmasına dikkat edildi.

3.2.10. İstatistiksel Analiz

Hücrelerdeki protein ekspresyon düzeyleri, immün boyama sonrası elde edilen mikroskop görüntülerinde Image J programında IHC Profiler eklentisi ile analiz edildi. Skorum düzeyleri; yüksek pozitif bölge için 4, pozitif bölge için 3, düşük pozitif bölge için 2 ve negatif bölge için 1 olarak belirlendi.

Hücreler ile yapılan Western Blot analizinde elde edilen bantlarda yoğunluk (piksel) belirleme çalışmaları yine Image J programı ile yapıldıktan sonra proteinlerin ekspresyon düzeyleri ortalama \pm standart sapma (Mean \pm SD) olarak gösterildi. Western blot analizlerinde elde edilen protein bant görüntüleri β -aktin bant

görüntülerine oranlanıp normalizasyon yapılarak veriler istatistiksel olarak analiz edildi.

İmmün işaretleme ve Western Blot analizleri sonrası istatistiksel değerlendirmelerde IBM SPSS Statistics 26.0 programı ve GraphPad Prism programı kullanılarak karşılaştırma testleri (Student t-test ve tek yönlü ANOVA) yapıldı. Karşılaştırma verileri ortalama \pm standart sapma şeklinde (Mean \pm SD) gösterildi. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak kabul edildi. Anlamlılık düzeyleri için grafiklerde * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, ns: not significant (anlamli değil) olarak belirtildi. Bütün analiz sonuçları üç kez tekrar edilen deneyler sonucunda elde edildi.

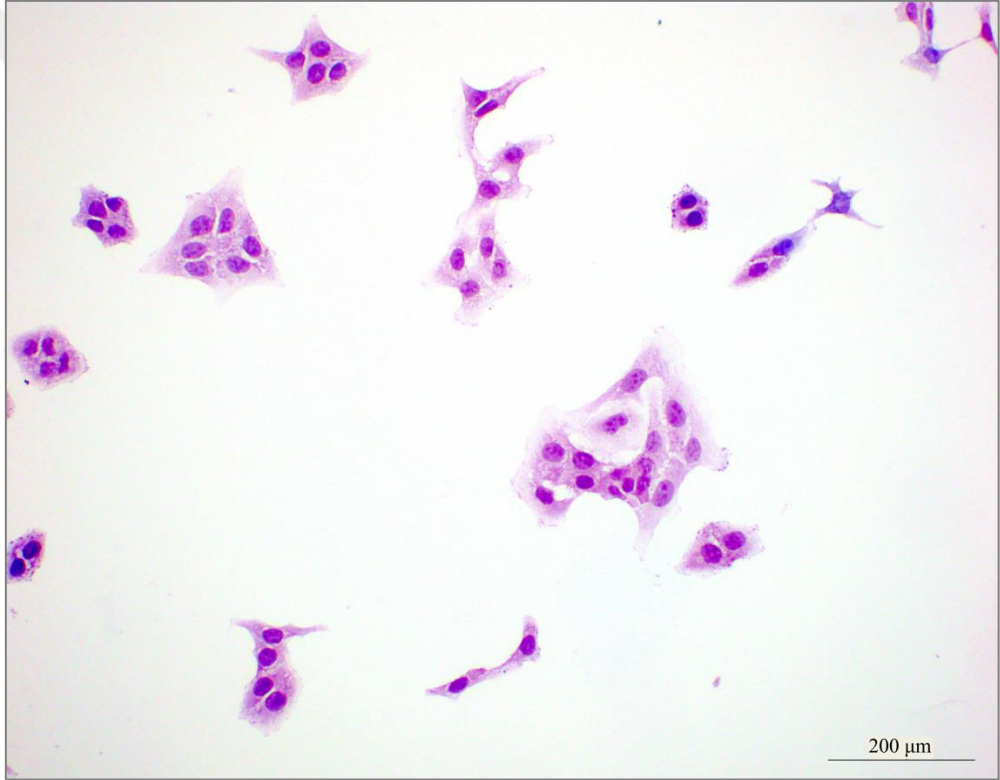


4. BULGULAR

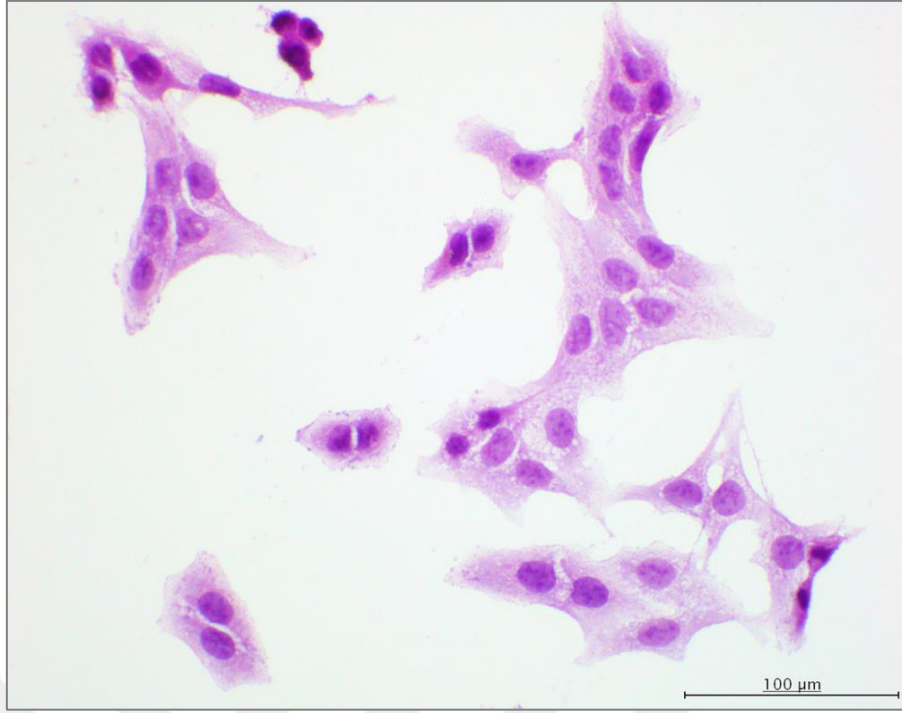
4.1. Morfolojik Değerlendirme Bulguları

Hücrelerin deneylerden önce morfolojik olarak değerlendirmesi için Hematoksilen ve Eozin ile boyama yapıldı.

HTR8/SVneo ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinin (Bkz. Şekil 4.1-3) ve JEG-3 koryokarsinom hücrelerinin (Bkz. Şekil 4.4-5) morfolojilerinin normal olduğu gözlemlendi.



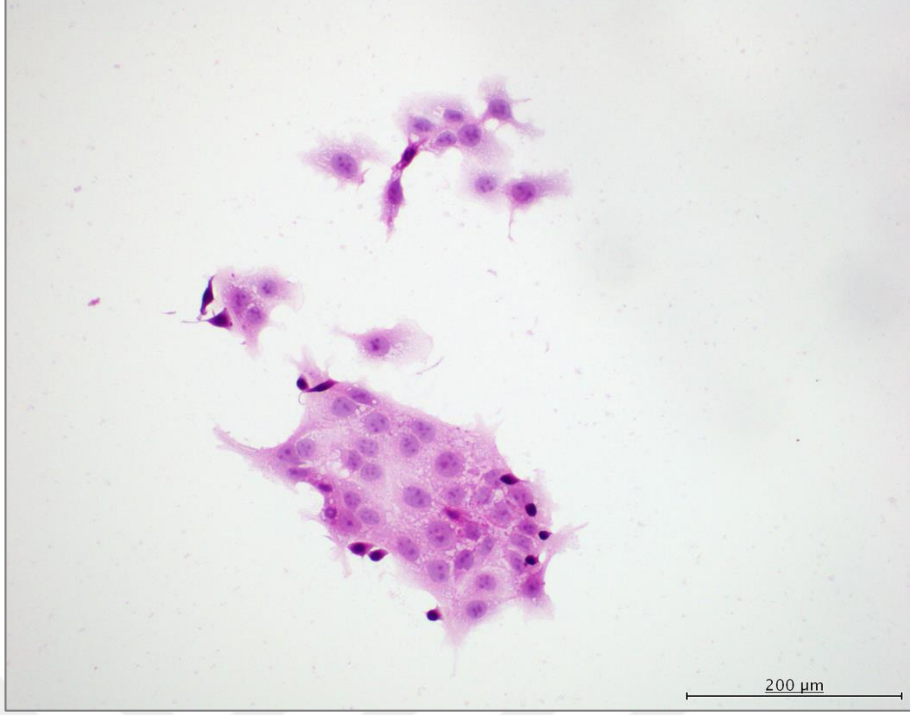
Şekil 4.1. HTR8/SVneo ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinin morfolojik değerlendirilmesi. Hematoksilen ve Eozin (Bar: 200 µm, x200 büyütme).



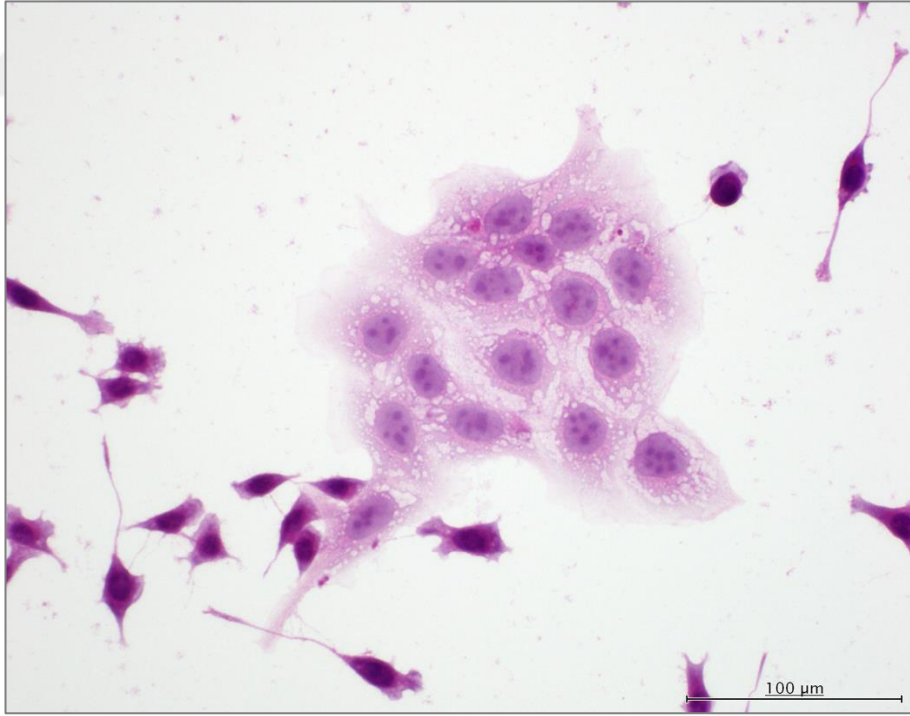
Şekil 4.2. HTR8/SVneo ekstravillöz trofoblast hücrelerinin morfolojik değerlendirilmesi, Hematoksilen ve Eozin (Bar: 100 µm, x400 büyütme).



Şekil 4.3. HTR8/SVneo ekstravillöz trofoblast hücrelerinin morfolojik değerlendirilmesi, Hematoksilen ve Eozin (Bar: 100 µm, x400 büyütme).



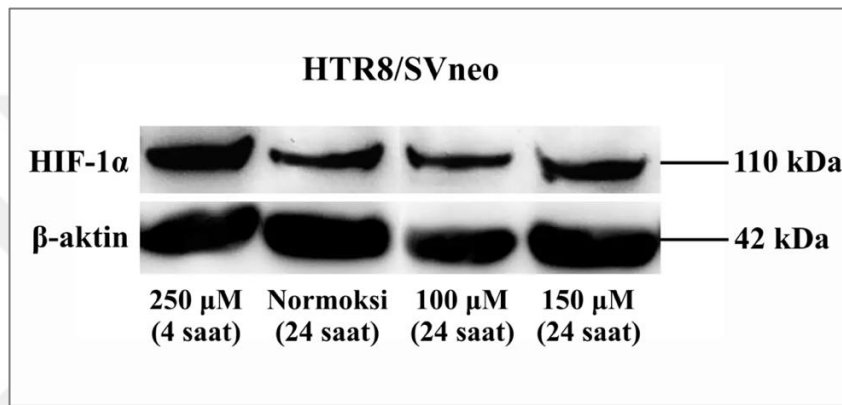
Şekil 4.4. JEG-3 koryokarsinom hücrelerinin morfolojik değerlendirilmesi, Hematoksilen ve Eozin (Bar: 200 µm, x200 büyütme).



Şekil 4.5. JEG-3 koryokarsinom hücrelerinin morfolojik değerlendirilmesi, Hematoksilen ve Eozin (Bar: 100 µm, x400 büyütme).

4.2. HIF-1 α Protein Ekspresyonunun Western Blot Analizi ile Değerlendirilmesi

Hipoksi indüklemesi sonrasında hücrelerdeki HIF-1 α protein ekspresyon seviyelerini incelemek amacıyla Western Blot analizi yapıldı. HTR-8/SVneo hücreleri için, 24 saat 100 μ M, 150 μ M ve 4 saat 250 μ M konsantrasyonunda CoCl₂ uygulanan örneklerin Western Blot analizlerinden elde edilen bantlar, proteinlerin moleküler ağırlıklarına (kDa) göre incelendi (Bkz. Şekil 4.6.). Normalizasyon için total proteini belirten β -aktin protein ekspresyon düzeyi kullanıldı.



Şekil 4.6. HTR-8/SVneo hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanan CoCl₂ sonrası HIF-1 α proteini için Western Blot analizi bant görüntüleri.

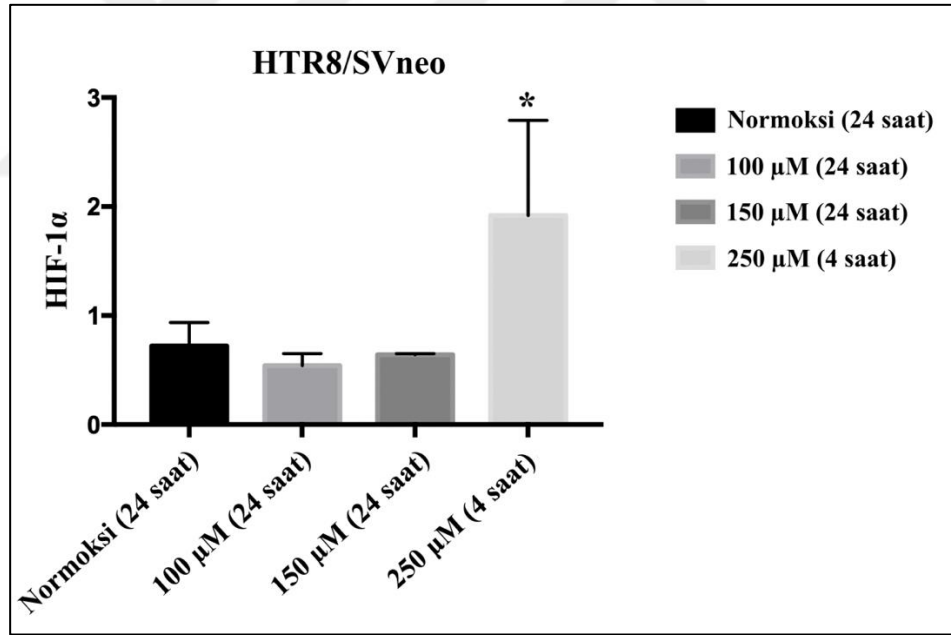
Hücrelere farklı konsantrasyonlarda CoCl₂ uygulamaları sonrası elde edilen bant görüntüleri Image J programı ile değerlendirildikten sonra veriler istatistiksel olarak tek yönlü ANOVA testi ve Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilip grafik üzerinde gösterildi. Analizlerde $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Western Blot analizi sonuçlarına göre, HTR-8/SVneo hücre hattında farklı konsantrasyonlarda CoCl₂ uygulaması sonrası HIF-1 α protein ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı (Bkz. Şekil 4.7.).

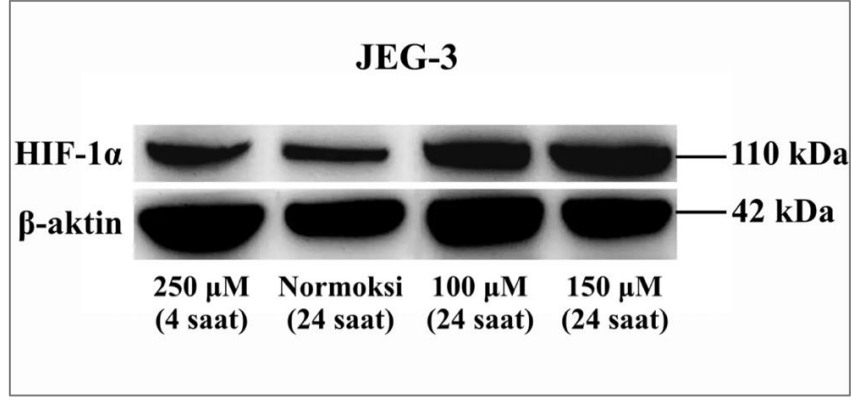
Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi		p değeri
Normoksi (24 saat) vs. 100 μ M (24 saat)	ns	0.9297
Normoksi (24 saat) vs. 150 μ M (24 saat)	ns	0.9930
Normoksi (24 saat) vs. 250 μ M (4 saat)	*	0.0291

Şekil 4.7. HTR-8/SVneo hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanan CoCl_2 sonrası HIF-1 α için WB analiz sonuçlarının birbiriyle istatistiksel olarak karşılaştırılması. (Birim: piksel yoğunluğu, HIF-1 α / β -aktin oranı).

Normoksi ile karşılaştırıldığında 4 saat 250 μ M konsantrasyonunda HIF-1 α protein ekspresyon düzeyinin anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi (Şekil 4.8.) (* $p=0.0291$, $p \leq 0.05$). Bu nedenle, daha sonraki deneylere HTR-8/SVneo hücreleri için 4 saat 250 μ M konsantrasyonu ile devam edildi ve “HTR-8/SVneo hipoksi grubu” olarak tanımlandı.



Şekil 4.8. HTR-8/SVneo hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanan CoCl_2 sonrası HIF-1 α için WB sonuçlarını karşılaştırma grafiği. (* $p=0.0291$, $p \leq 0.05$). (Birim: piksel yoğunluğu, HIF-1 α / β -aktin oranı).

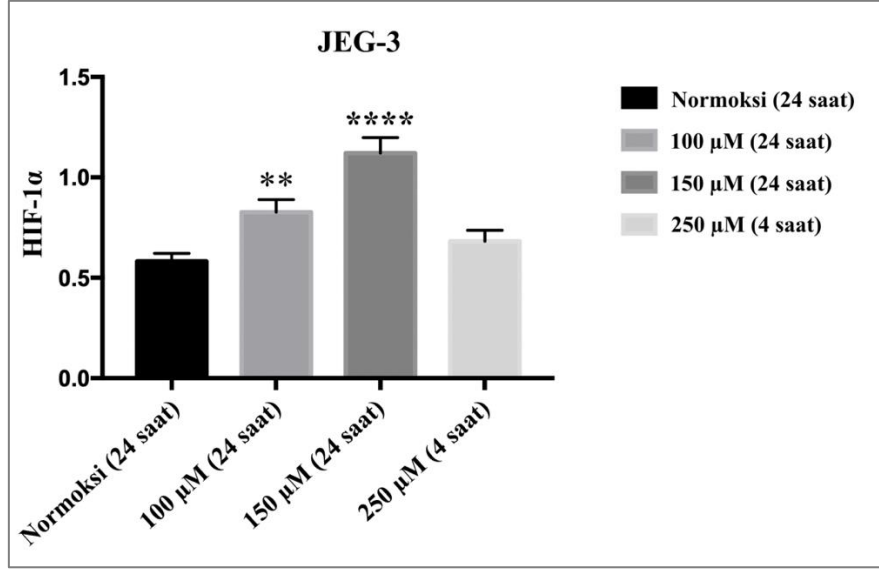


Şekil 4.9. JEG-3 koryokarsinom hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanan CoCl_2 sonrası HIF-1 α proteini için WB analizi bant görüntüleri.

Western Blot analizi sonuçlarına göre, JEG-3 hücre hattında farklı konsantrasyonlarda CoCl_2 uygulaması sonrası HIF-1 α protein ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı (Bkz. Şekil 4.9.). HIF-1 α protein ekspresyon düzeyleri normoksi ile karşılaştırıldığında 24 saat 100 μM ve 24 saat 150 μM konsantrasyonunda anlamlı bir şekilde arttığı görüldü (Bkz. Şekil 4.10.) (** $p=0.0028$, $p\leq 0.01$; **** $p=0.0001$, $p\leq 0.0001$). İstatistiksel olarak en anlamlı artışın 24 saat 150 μM konsantrasyonunda olduğu gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.11.). Bu nedenle, daha sonraki deneylere JEG-3 hücreleri için 24 saat 150 μM konsantrasyonu ile devam edildi ve “JEG-3 hipoksi grubu” olarak tanımlandı.

Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi		p değeri
Normoksi (24 saat) vs. 100 μM (24 saat)	**	0.0028
Normoksi (24 saat) vs. 150 μM (24 saat)	****	0.0001
Normoksi (24 saat) vs. 250 μM (4 saat)	ns	0.1745

Şekil 4.10. JEG-3 koryokarsinom hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanan CoCl_2 sonrası HIF-1 α Western Blot analiz sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması. (Birim: piksel yoğunluğu, HIF-1 α / β -aktin oranı).



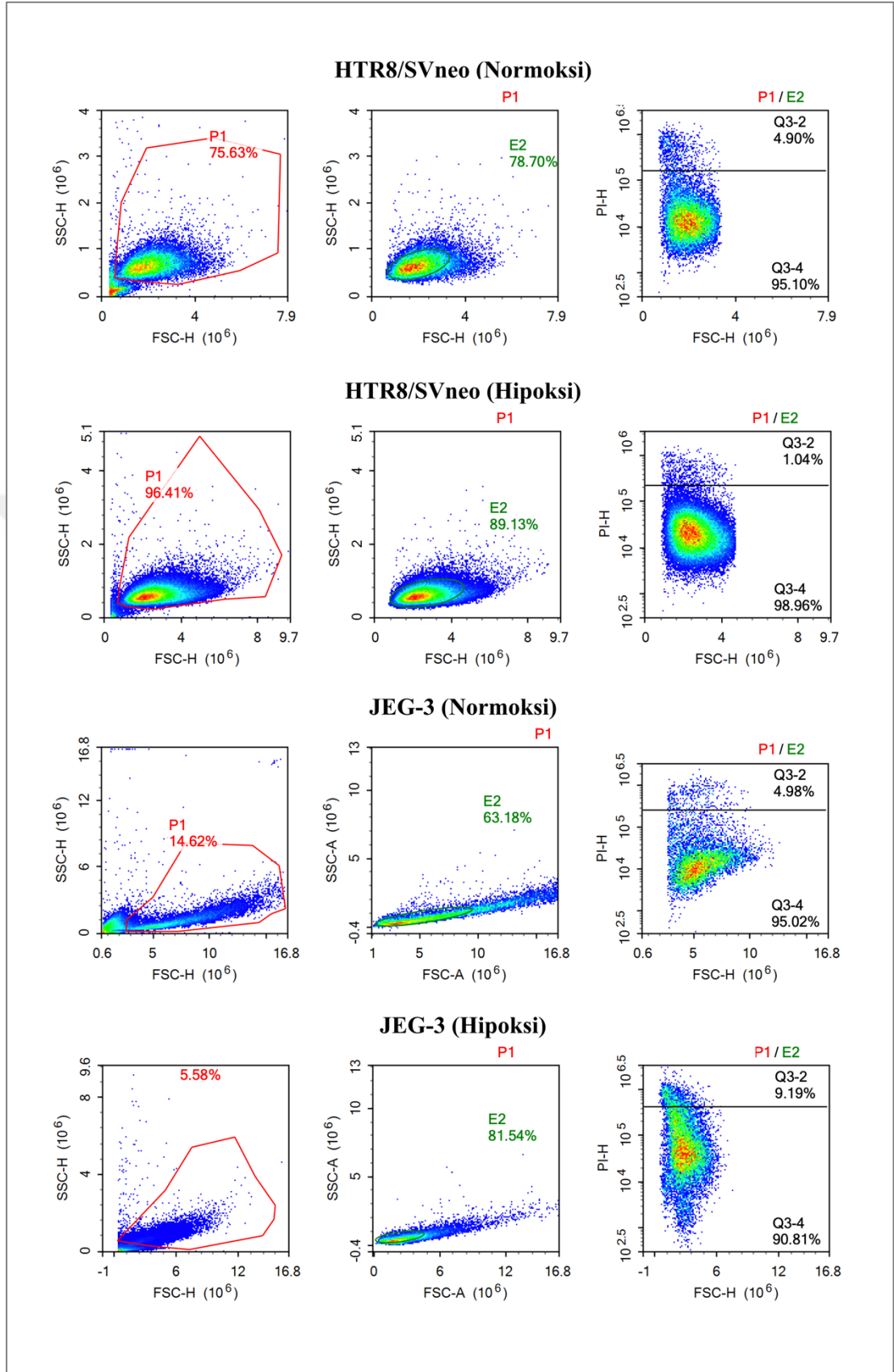
Şekil 4.11. JEG-3 hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanan CoCl_2 sonrası HIF-1 α için WB sonuçlarını karşılaştırma grafiği. (** $p=0.0028$, $p \leq 0.01$; **** $p=0.0001$, $p \leq 0.0001$). (Birim: piksel yoğunluğu, HIF-1 α / β -aktin oranı).

4.3. Akım Sitometrisi ile Canlılık Analizi Bulguları

Hipoksi oluşturmak amacıyla kullanılan CoCl_2 'ün hücre canlılığına etkisini incelemek için akım sitometrisi analizi yapıldı. Hem HTR-8/SVneo hem de JEG-3 hücrelerinde hipoksi ve normoksi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.15$, $p \leq 0.05$; $p=0.131$, $p \leq 0.05$). Analiz üç tekrarlı yapılarak sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde (Mean \pm SD) gösterildi (Bkz. Tablo 4.1.) (Bkz. Şekil 4.12).

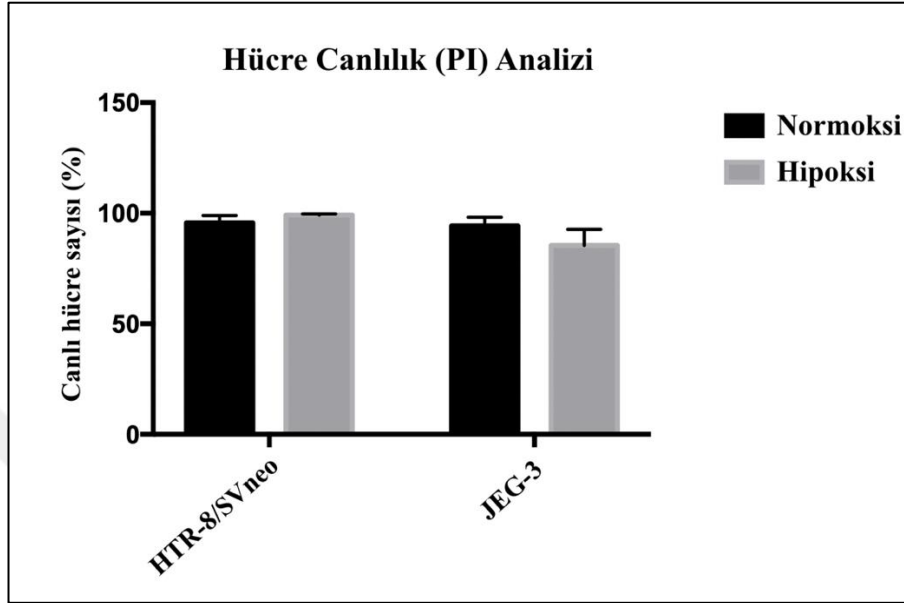
Tablo 4.1. Hücre canlılık analizi sonuçları ve gruplar arası karşılaştırma sonucu istatistiksel p değerleri.

	Gruplar	Ortalama \pm SD (Canlı hücre sayısı %)	p değeri (sig.)
HTR-8/SVneo	Normoksi	95.6533 \pm 3.34451	$p=0.15$, $p > 0.05$
	Hipoksi	99.1267 \pm 0.52042	
JEG-3	Normoksi	94.3467 \pm 3.78519	$p=0.131$, $p > 0.05$
	Hipoksi	85.4433 \pm 7.19312	



Şekil 4.12. Akım sitometrisi ile canlılık analizi sonuçları.

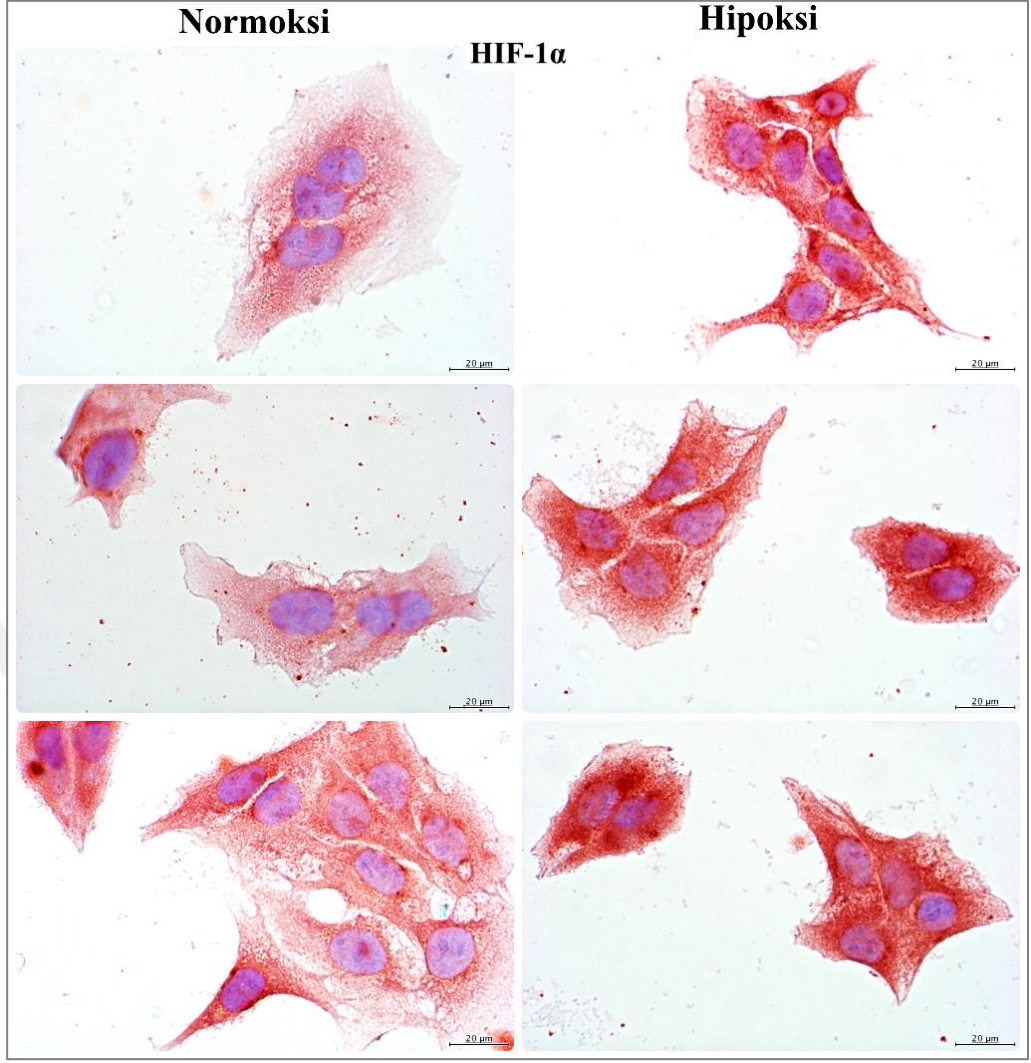
Hipoksi ve normoksi grupları arasında anlamlı fark bulunmaması ile CoCl_2 'ün kullanılan konsantrasyonlarının HTR-8/SVneo ve JEG-3 hücrelerinde hücre canlılığını olumsuz yönde etkilemediği gösterildi (Bkz. Şekil 4.13). Böylece bu konsantrasyonlar ile sonraki deneylere devam edildi.



Şekil 4.13. HTR-8/SVneo ve JEG-3 hücrelerinde hücre canlılık analizi sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılması.

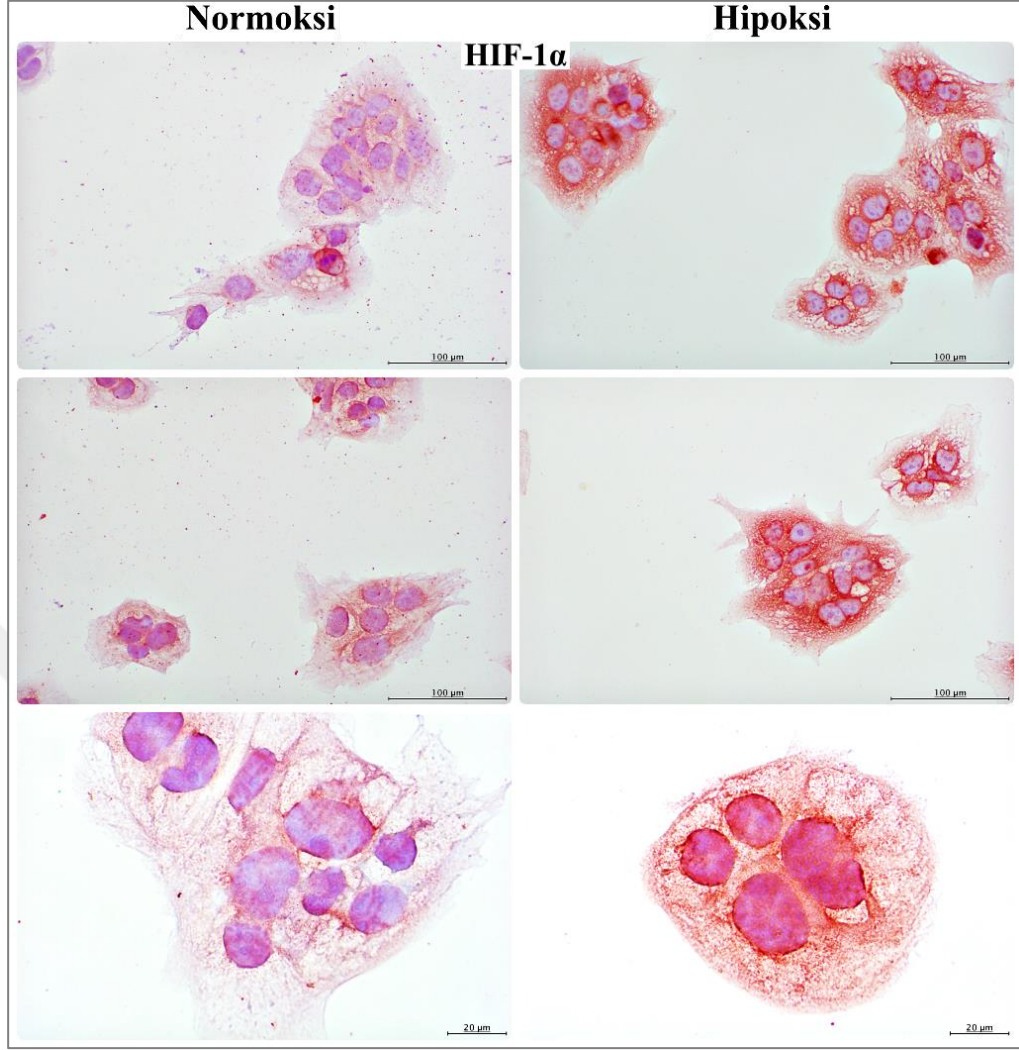
4.4. İmmün İşaretleme ile HIF-1 α Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

HIF-1 α protein ekspresyonunu hücrede görüntülemek amacıyla HIF-1 α antikoru ile immün işaretleme yapıldı. HTR-8/SVneo hücrelerinde hem normoksi hem de hipoksi grubunda HIF-1 α için sitoplazmik ve çekirdek boyanmaları gözlemlendi. Normoksi grubuna kıyasla hipoksi grubundaki HIF-1 α proteinin çekirdek ve sitoplazmik olarak daha yoğun boyandığı gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.14.).



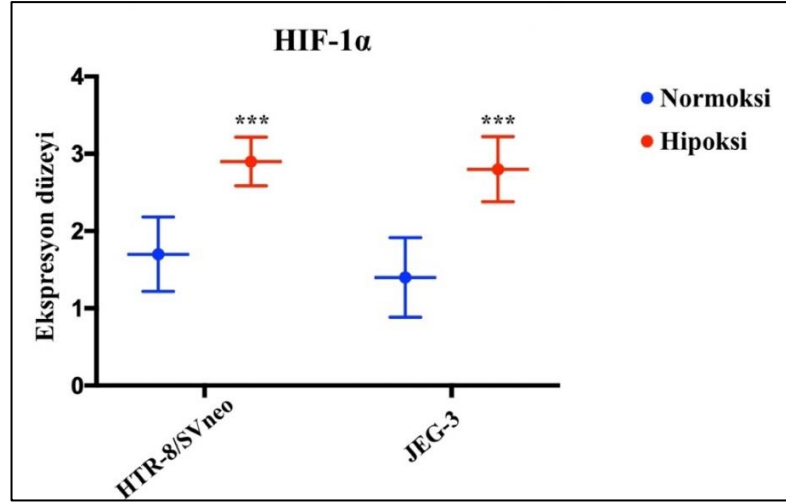
Şekil 4.14. HTR-8/SVneo hücrelerinde HIF-1 α protein ekspresyonunun normoksi ve hipoksi gruplarında görüntülenmesi (Bar: 20 μ m, x1000 büyütme).

JEG-3 hücrelerinde de hem normoksi hem de hipoksi grubunda HIF-1 α için sitoplazmik ve çekirdek boyanmaları gözlemlendi. Normoksi grubuna kıyasla hipoksi grubunda çekirdek ve sitoplazmik olarak daha yoğun HIF-1 α protein ekspresyonu olduğu gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.15.).



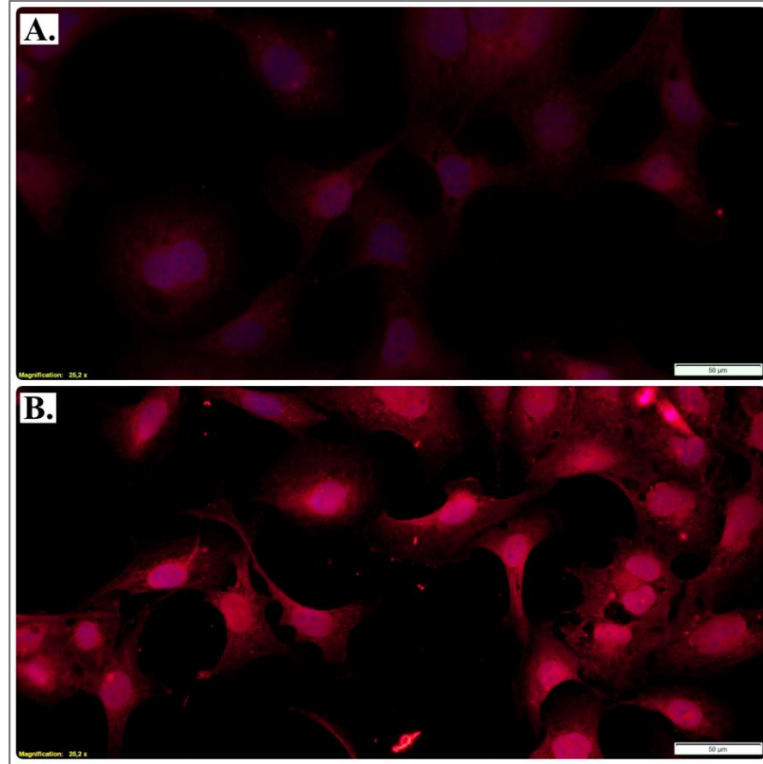
Şekil 4.15. JEG-3 hücrelerinde HIF-1 α protein ekspresyonunun normoksi ve hipoksi gruplarında görüntülenmesi (Bar: 100 μ m, x400 büyütme, Bar: 20 μ m, x1000 büyütme).

HTR-8/SVneo ve JEG-3 hücrelerindeki HIF-1 α immün işaretleme sonrası yapılan Image J analizinin istatistiksel bulgularına göre; her iki hücrede de hipoksi grubundaki HIF-1 α ekspresyon düzeyinin normoksiye kıyasla anlamlı olarak arttığı belirlendi (Bkz. Şekil 4.16.) (**p=0.000, p \leq 0.001).



Şekil 4.16. Hücrelerde immün işaretleme ile gösterilen HIF-1 α ekspresyon düzeyinin gruplar arası karşılaştırılması.

HTR-8/SVneo hücrelerinde HIF-1 α protein ekspresyonu için ayrıca immüno Floresan boyama yapıldı. Hem normoksi hem de hipoksi grubunda sitoplazmik ve çekirdek boyanmaları gözlenmekle birlikte hipoksi grubunda HIF-1 α proteininin daha yoğun boyandığı belirlendi (Bkz. Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. HTR-8/SVneo hücrelerinde HIF-1 α protein ekspresyonunun immüno Floresan görüntüsü. Çekirdek (DAPI) ve HIF-1 α (Texas Red) birlikte görüntülendi. (A) Normoksi, (B) Hipoksi. (Bar: 50 μ m, x400 büyütme).

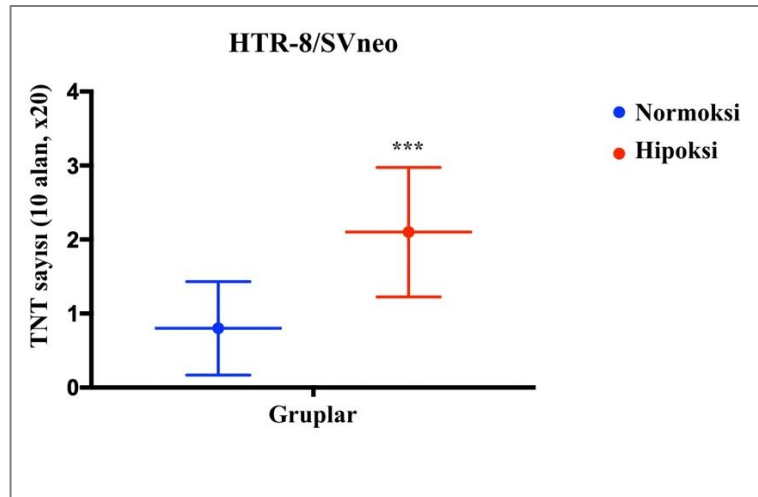
4.5. Tünel Oluşturan Nanotüp (TNT) Oluşumlarının Değerlendirilmesi

HTR-8/SVneo ve JEG-3 hücrelerinde TNT'leri görüntülemek amacıyla F-aktin (Phalloidin) boyaması yapıldı. HTR-8/SVneo hücrelerinde hem invert mikroskop görüntülerinde hem de immünfloresan boyamalarda TNT oluşumları gözlenirken (Bkz. Şekil 4.20-26), JEG-3 koryokarsinom hücrelerinde yapılan incelemelerde çok nadir TNT oluşumu gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.27-29). İstatistiksel olarak yeterli sayıda oluşum gözlenmediği için sadece HTR-8/SVneo hücreleri için istatistiksel analizler gerçekleştirildi.

HTR-8/SVneo hücrelerindeki TNT oluşumlarının sayımı (Bkz. Tablo 4.2.) ve uzunluk ölçümleri (Bkz. Tablo 4.3.) yapıldı. Normoksi ve hipoksi gruplarındaki sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. TNT oluşumlarının sayım analizleri sonucuna göre, HTR-8/SVneo hipoksi grubunda normoksi grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Bkz. Şekil 4.18) ($p=0.001$, $p\leq 0.05$).

Tablo 4.2. HTR-8/SVneo hücrelerindeki TNT sayımı sonuçları.

	Gruplar	Ortalama \pm SD	p değeri
TNT sayısı	Normoksi	0.80 \pm 0.632	*** $p=0.001$, $p\leq 0.05$
	Hipoksi	2.10 \pm 0.876	

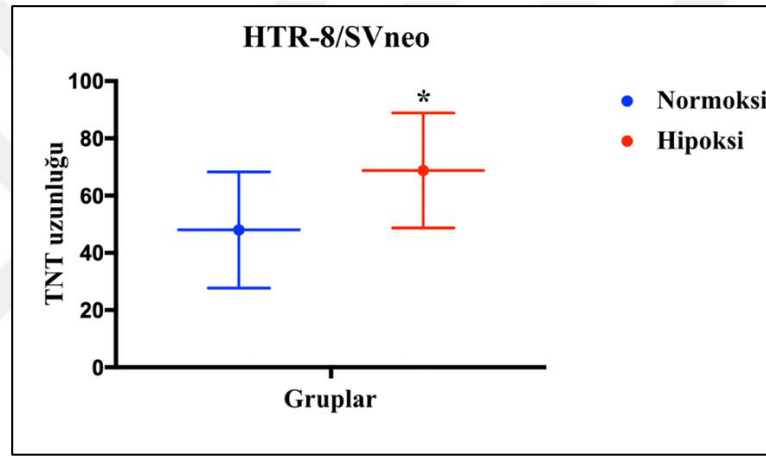


Şekil 4.18. HTR-8/SVneo hücrelerindeki TNT sayım sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılma grafiği.

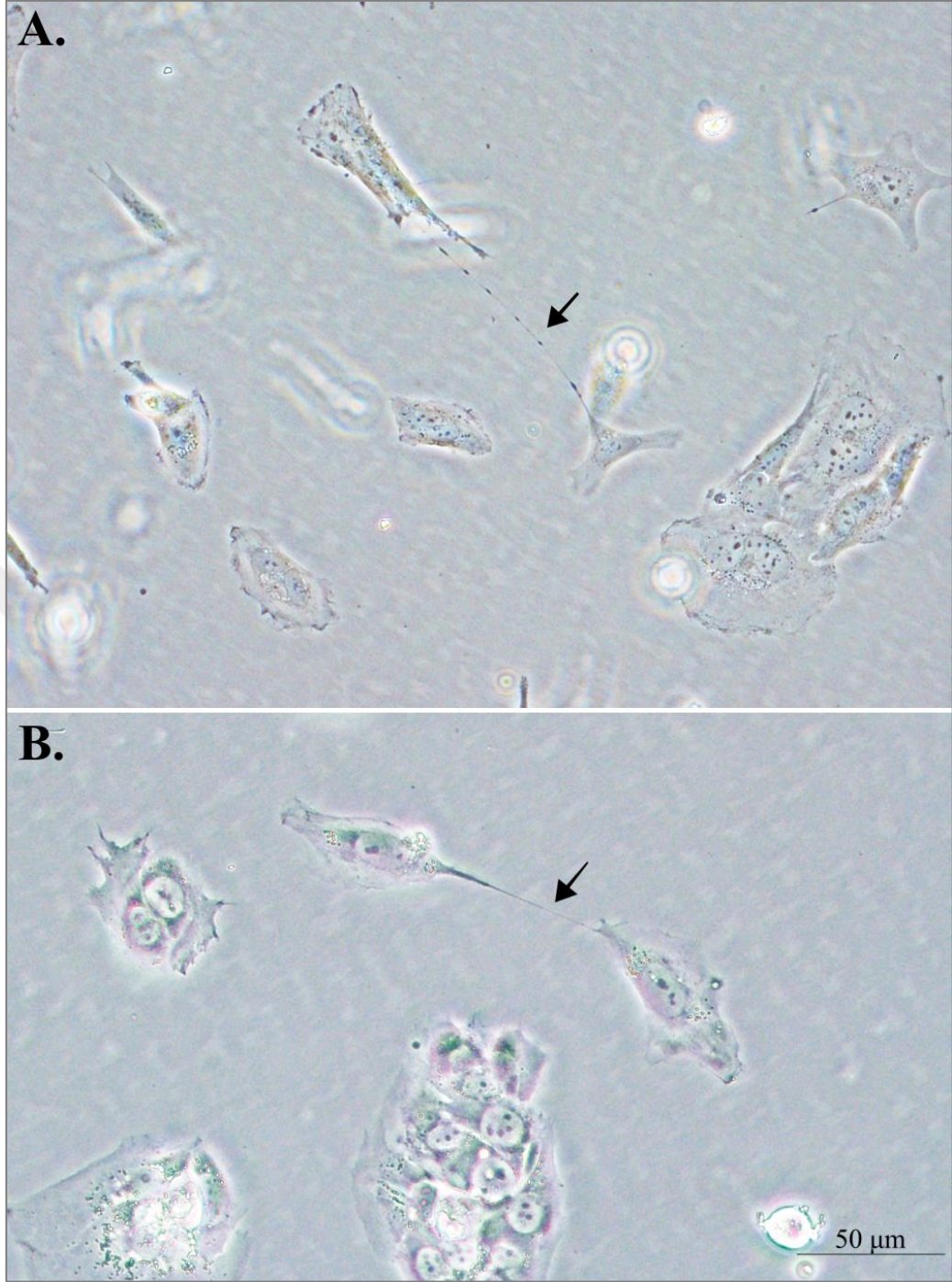
Ayrıca HTR-8/SVneo hücrelerindeki TNT oluşumlarının uzunluk ölçümleri yapıldı (Bkz. Tablo 4.3). Ölçüm sonuçlarına göre, normoksi grubuna kıyasla hipoksi grubundaki TNT uzunluklarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Bkz. Şekil 4.19) ($p=0.033$, $p\leq 0.05$).

Tablo 4.3. HTR-8/SVneo hücrelerindeki TNT uzunluk (mikrometre) ölçümü sonuçları.

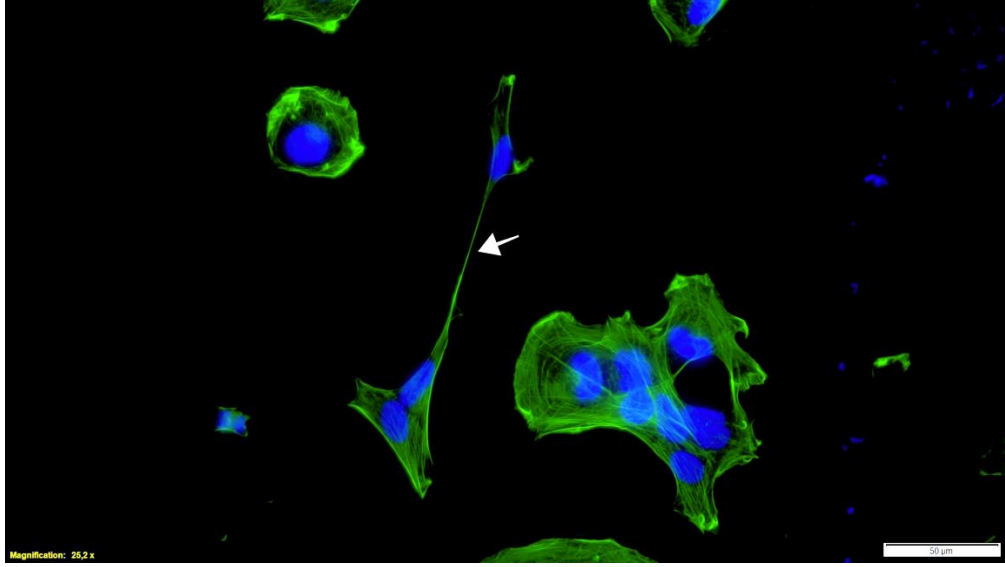
	Gruplar	Ortalama \pm SD	p değeri
TNT uzunluğu	Normoksi	48.0040 \pm 20.28944	* $p=0.033$, $p\leq 0.05$
	Hipoksi	68.8000 \pm 20.09772	



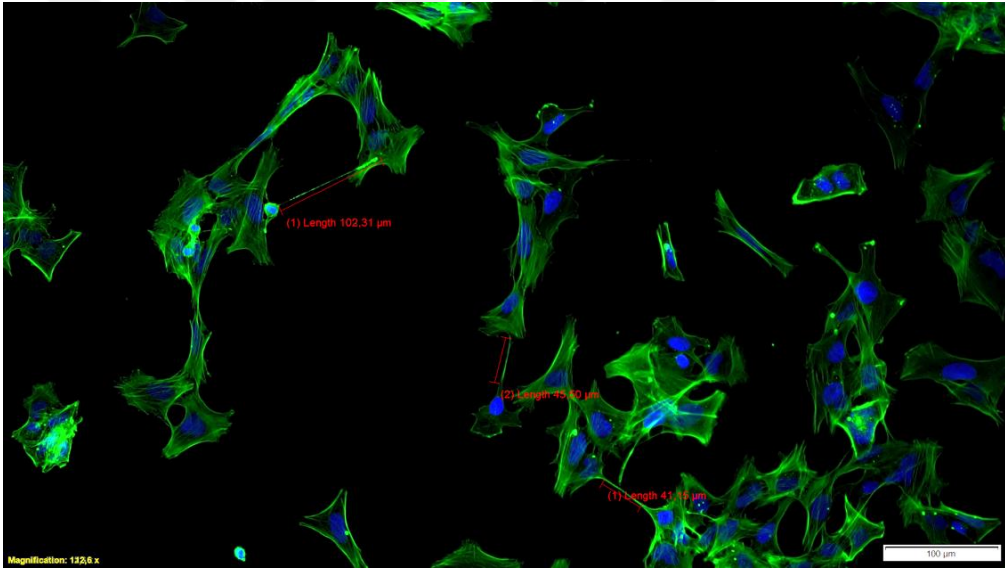
Şekil 4.19. HTR-8/SVneo hücrelerindeki TNT uzunluk ölçümü sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılma grafiği.



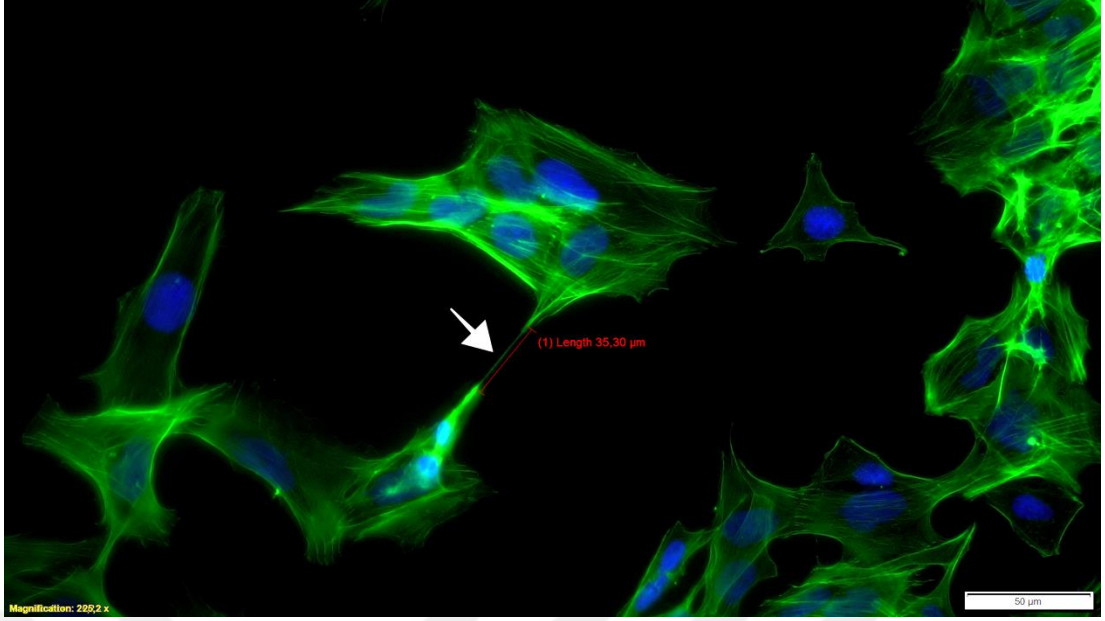
Şekil 4.20. HTR-8/SVneo hipoksi grubu (A) ve JEG-3 hipoksi grubu (B) hücrelerinde TNT oluşumlarının invert mikroskop görüntüsü. (ok işareti ile gösterildi) (Bar: 50 µm, x400 büyütme).



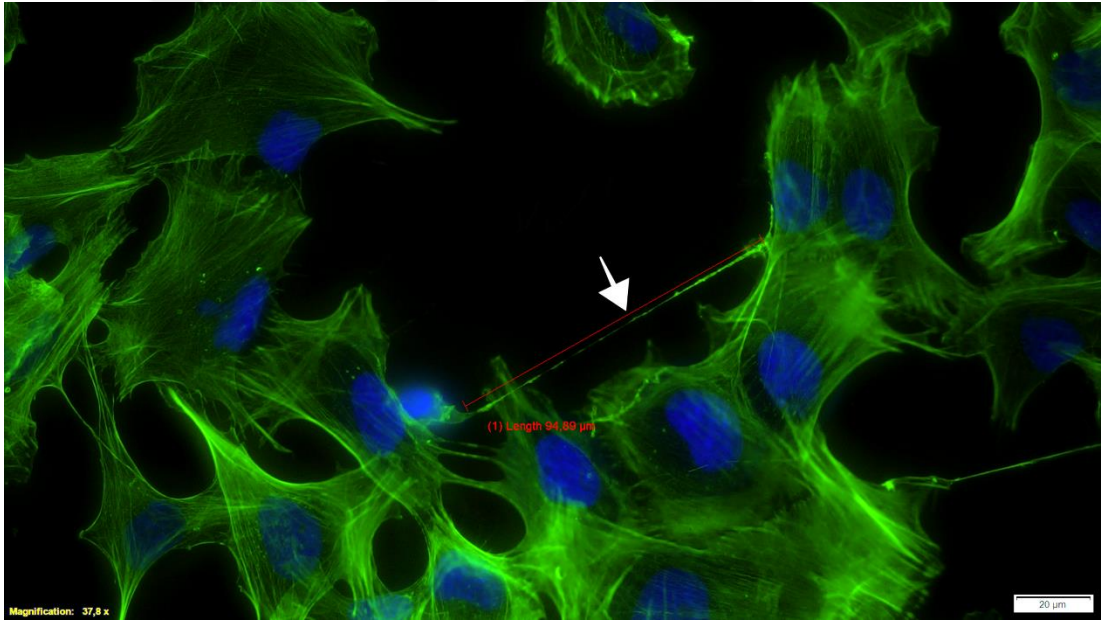
Şekil 4.21. HTR-8/SVneo normoksi grubunda TNT oluşumu. (Bar: 50 µm, x400 büyütme).



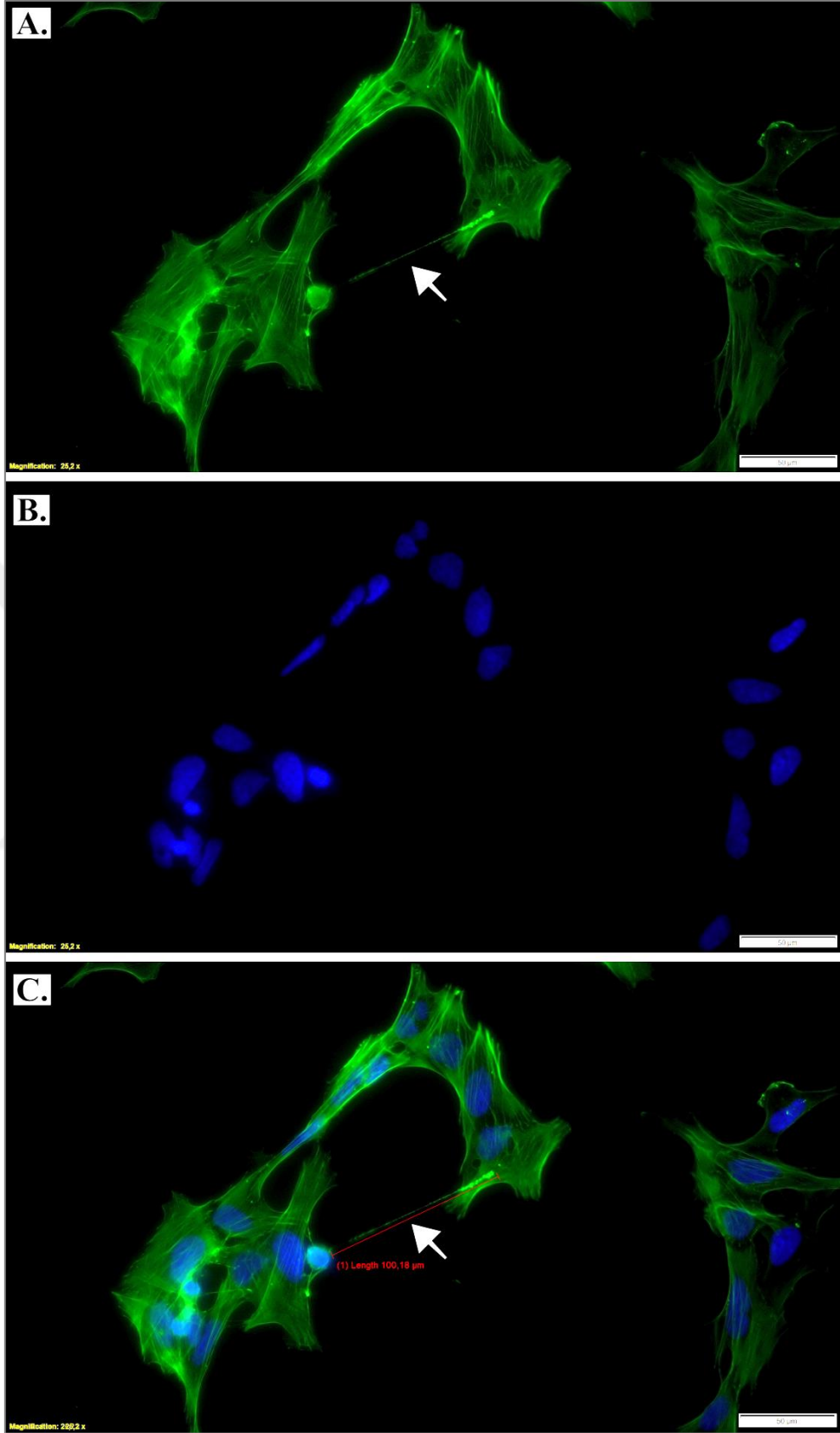
Şekil 4.22. HTR-8/SVneo hipoksi grubunda TNT oluşumlarının uzunluk ölçümleri. (Bar: 100 µm, x200 büyütme).



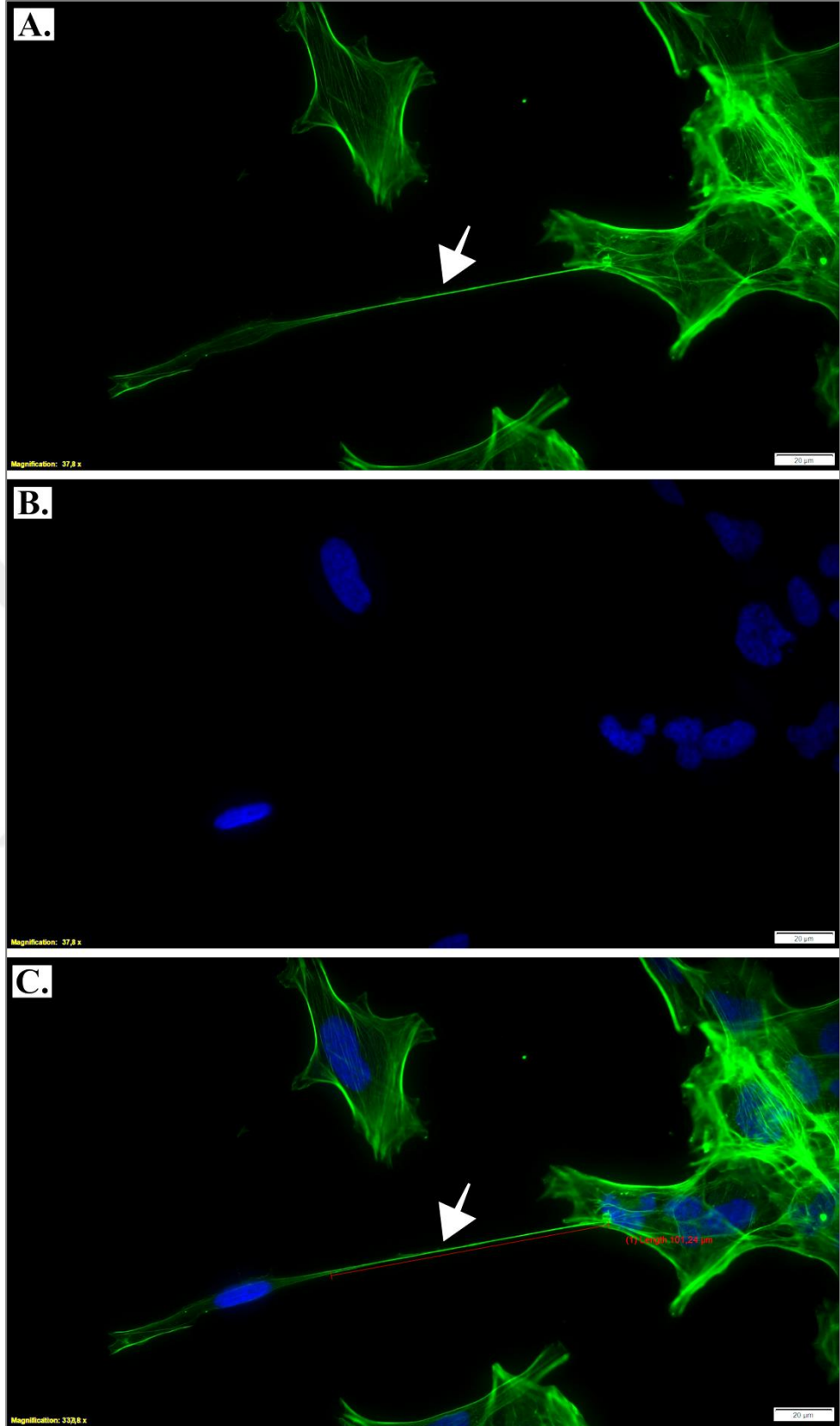
Şekil 4.23. HTR-8/SVneo normoksi grubuna ait hücrelerde TNT oluşumlarının görüntülenmesi ve uzunluk ölçümü. (Bar: 50 µm, x400 büyütme).



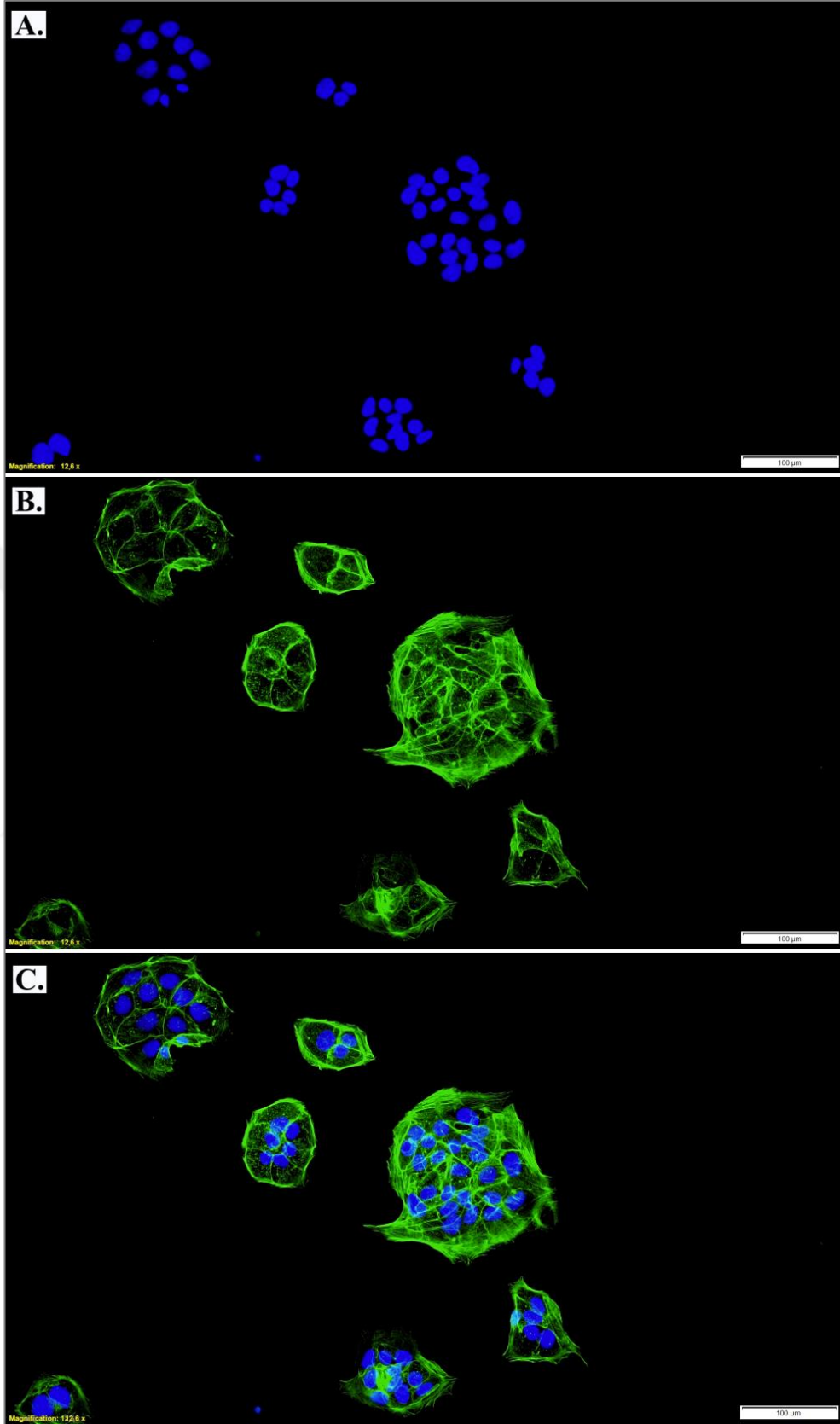
Şekil 4.24. HTR-8/SVneo hipoksi grubuna ait hücrelerde TNT oluşumlarının görüntülenmesi ve uzunluk ölçümü. **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.** (Bar: 50 µm, x400 büyütme).



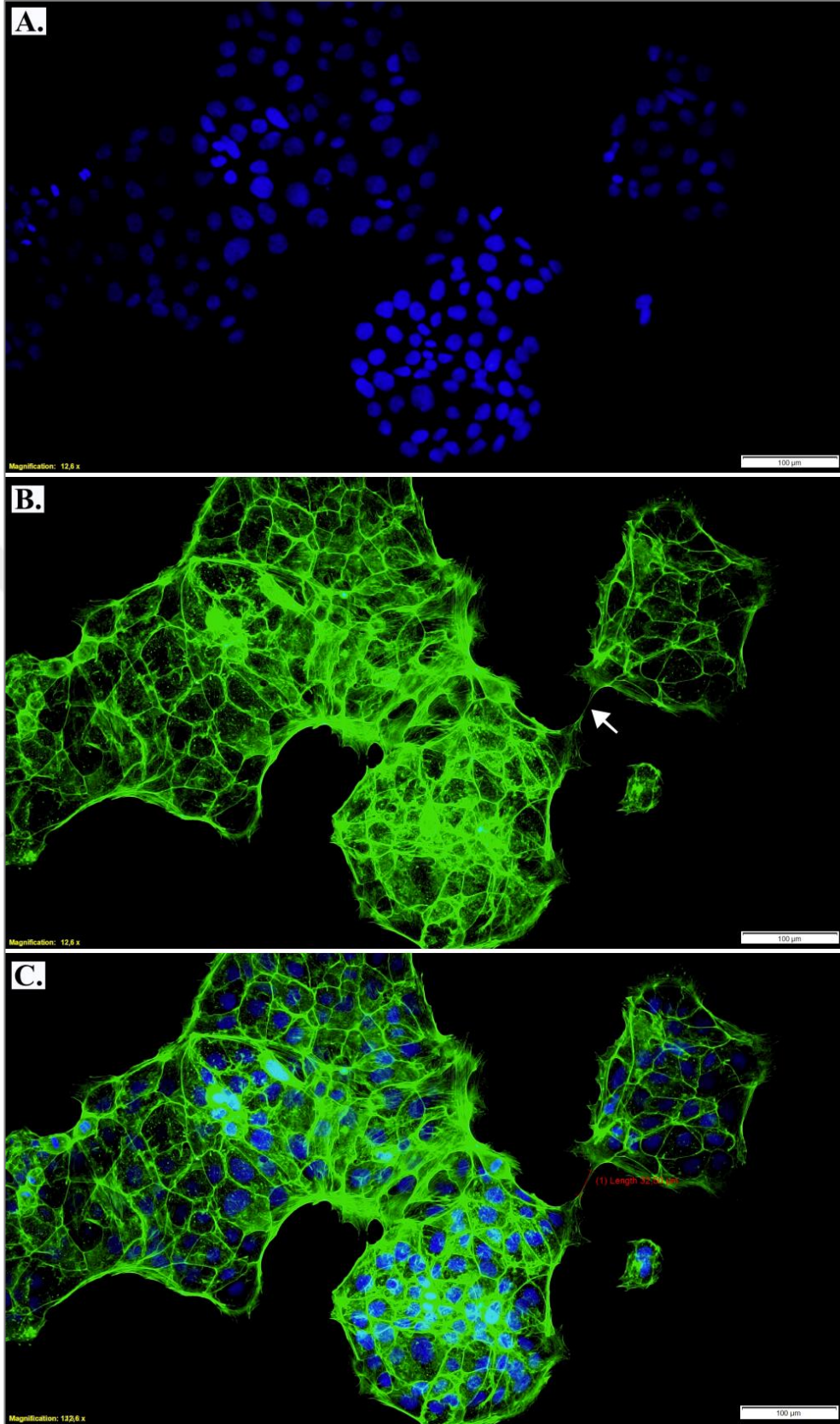
Şekil 4.25. HTR-8/SVneo hipoksi grubuna ait hücrelerde TNT oluşumlarının görüntülenmesi ve uzunluk ölçümü. (A) Phalloidin, (B) DAPI, (C) DAPI + Phalloidin (Bar: 50 µm, x400 büyütme).



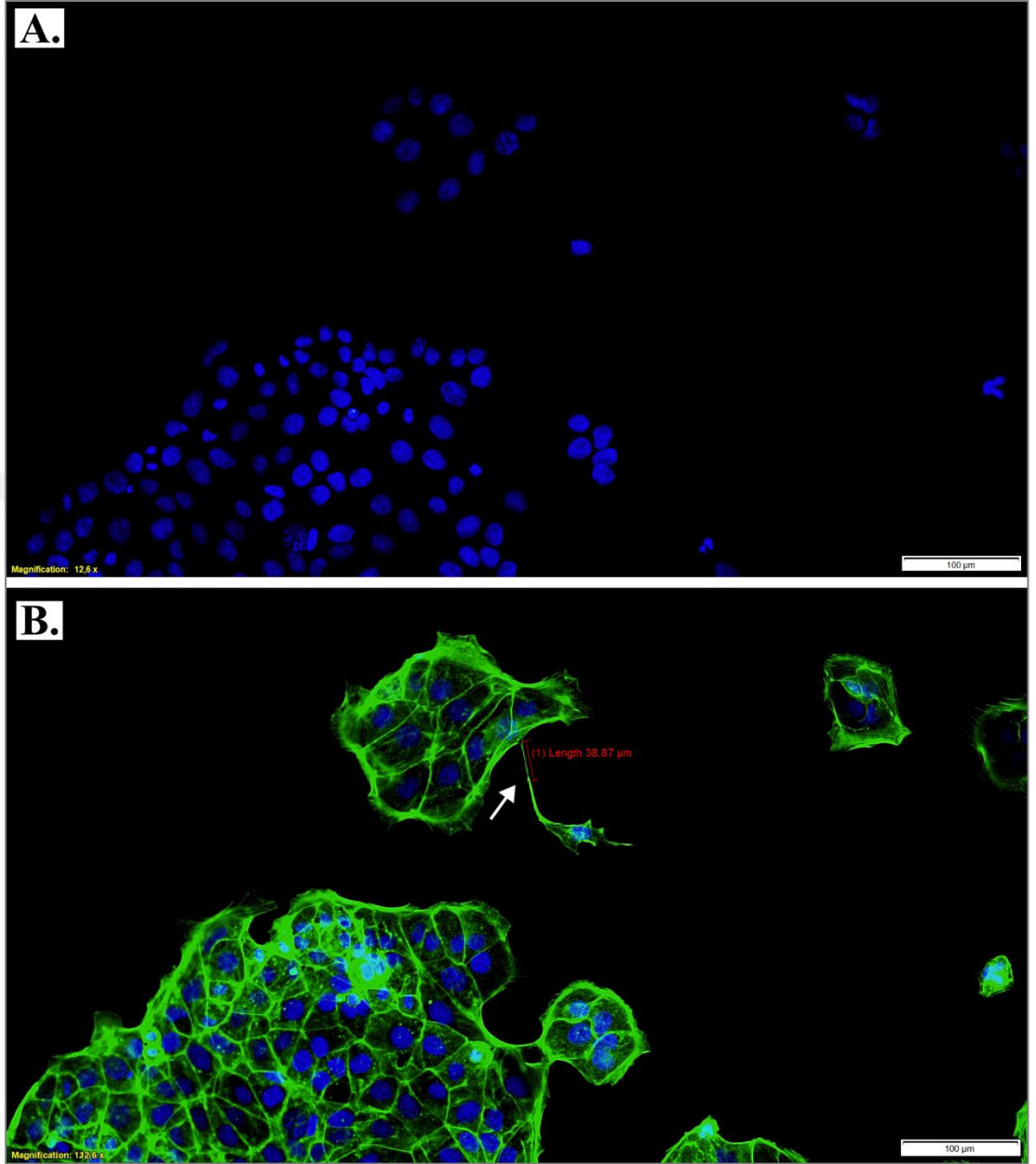
Şekil 4.26. HTR-8/SVneo hipoksi grubuna ait hücrelerde TNT oluşumlarının görüntülenmesi ve uzunluk ölçümü. (A) Phalloidin, (B) DAPI, (C) DAPI + Phalloidin (Bar: 50 µm, x400 büyütme).



Şekil 4.27. JEG-3 normoksi grubuna ait hücrelerde TNT oluşumu. (A) DAPI (B) Phalloidin (C) Phalloidin + DAPI (Bar: 100 µm, x200 büyütme).



Şekil 4.28. JEG-3 hipoksi grubuna ait hücrelerde TNT oluşumu. (A) DAPI (B) Phalloidin (C) Phalloidin + DAPI (Bar: 100 μ m, x200 büyütme).

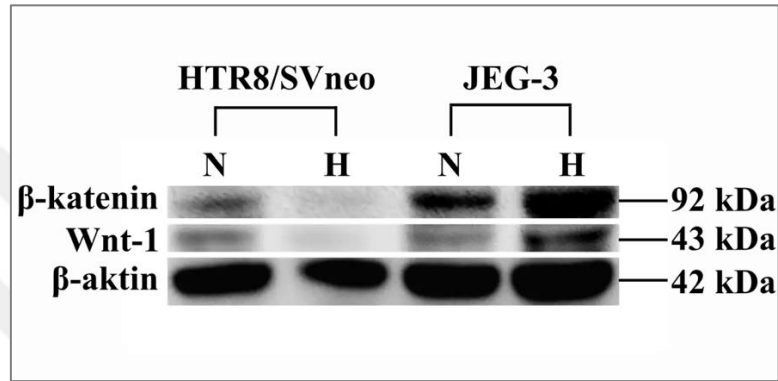


Şekil 4.29. JEG-3 hipoksi grubuna ait hücrelerde TNT oluşumu. (A) DAPI (B) Phalloidin + DAPI (Bar: 100 µm, x200 büyütme).

JEG-3 koryokarsinom hücrelerinde TNT oluşumlarının çok nadir olduğu gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.27-29). Bu nedenle sayım ve uzunluk ölçümlerinin istatistiksel analizi için yeterli bulgu elde edilemedi.

4.6. Wnt-1 ve β -katenin Protein Ekspresyonlarının Western Blot Analizi ile Değerlendirilmesi

HTR-8/SVneo ve JEG-3 hücrelerinde normoksi ve hipoksi gruplarındaki β -katenin ve Wnt-1 protein düzeylerini belirlemek amacıyla Western Blot analizi yapıldı (Bkz. Şekil 4.30). Bant görüntüleri Image J programı ile analiz edildikten sonra gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirildi (Bkz. Tablo 4.4.). Sonuçlar her bir örnek için protein/ β -aktin oranı, birim: piksel yoğunluğu olarak değerlendirildi.

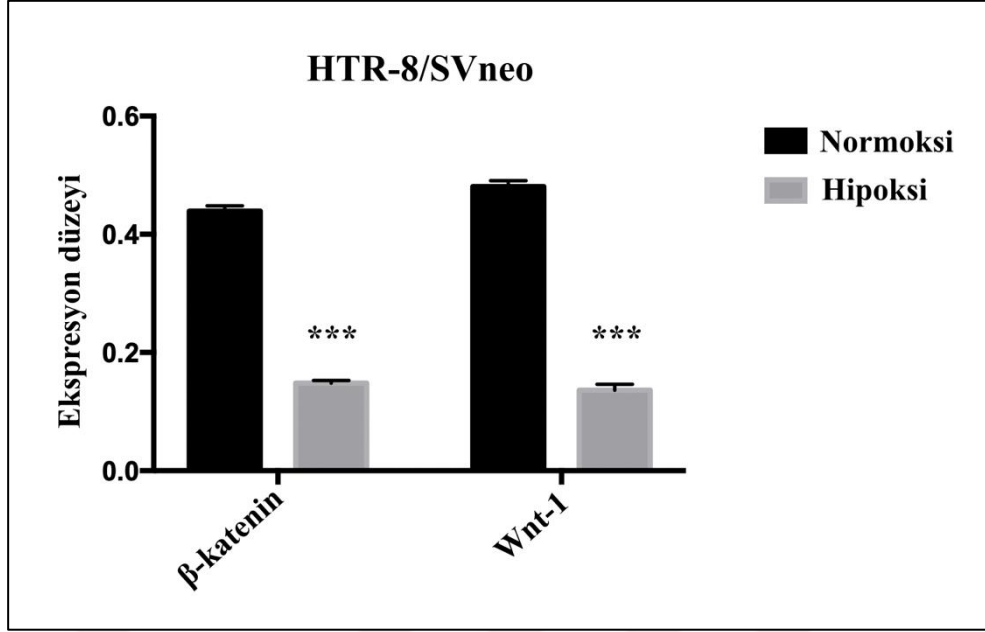


Şekil 4.30. HTR-8/SVneo ve JEG-3 hücrelerindeki β -katenin ve Wnt-1 protein düzeylerinin WB analizi bant görüntüleri.

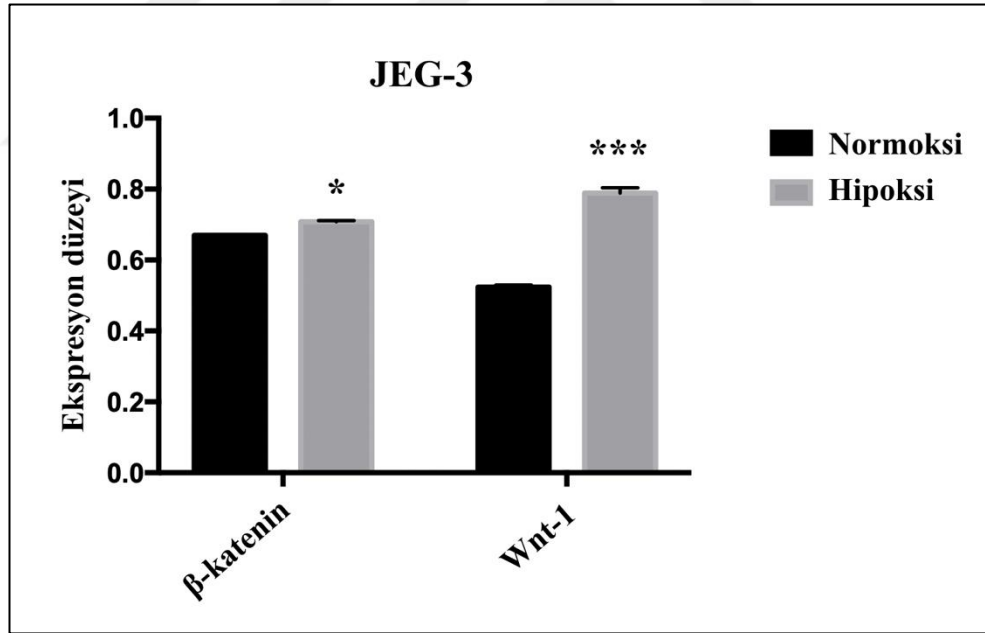
β -katenin ve Wnt-1 protein düzeyleri için yapılan Western Blot analiz sonuçlarına göre, HTR-8/SVneo hücrelerinde hipoksi grubunda hem β -katenin hem Wnt-1 düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Bkz. Şekil 4.31.) ($p=0.0001$, $p\leq 0.05$). JEG-3 hücrelerinde ise normoksi grubuyla kıyaslandığında hipoksi grubunda hem β -katenin ($p=0.05$, $p\leq 0.05$) için hem de Wnt-1 ($p=0.0001$, $p\leq 0.05$) için anlamlı bir artış olduğu görüldü (Bkz. Şekil 4.32.).

Tablo 4.4. Hücrelerde β -katenin ve Wnt-1 protein düzeyleri için yapılan WB analiz sonuçları. (Ortalama \pm SD) (Birim: piksel yoğunluğu, protein/ β -aktin oranı).

	HTR-8/Svneo		JEG-3	
	Normoksi	Hipoksi	Normoksi	Hipoksi
β -katenin	0.439267 \pm 0.0091	0.14815 \pm 0.00465	0.66966 \pm 0.00212	0.70806 \pm 0.00353
Wnt-1	0.4805437 \pm 0.010	0.13622 \pm 0.010	0.52335 \pm 0.00622	0.78892 \pm 0.01516



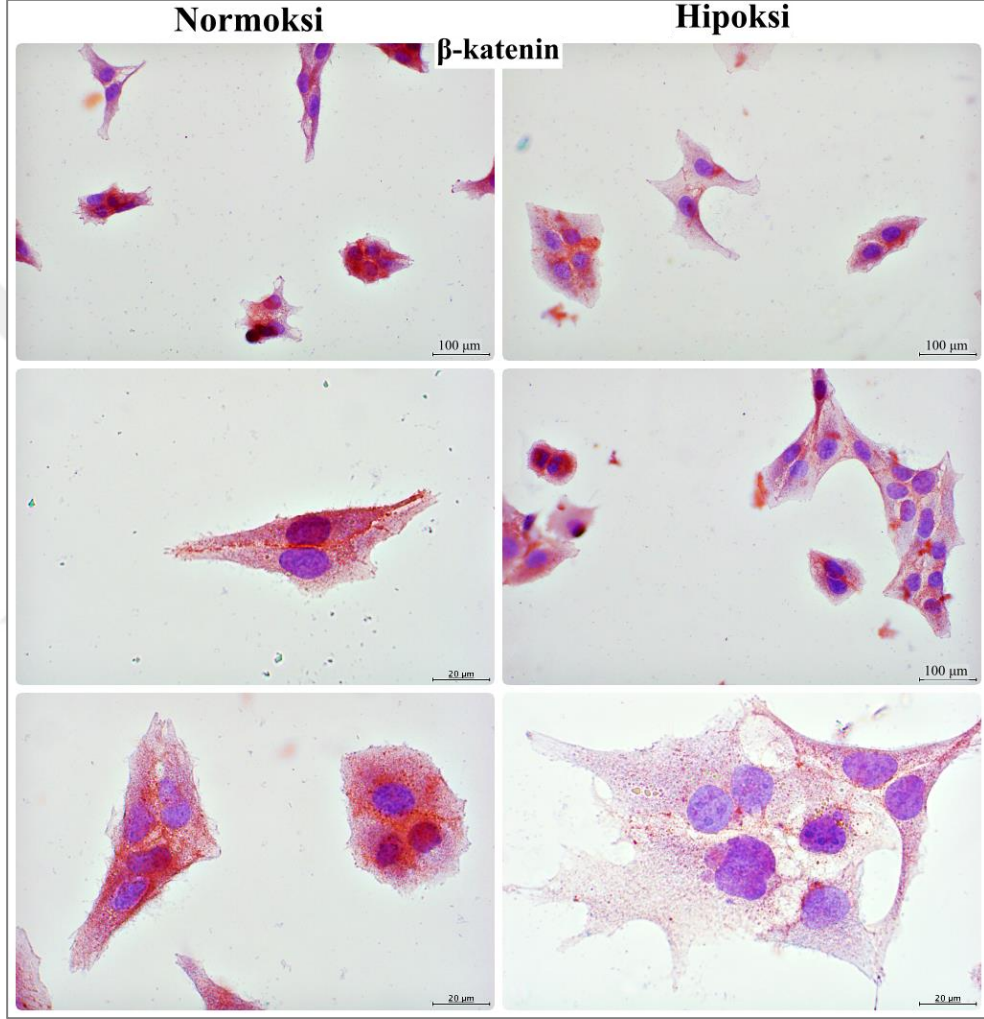
Şekil 4.31. HTR-8/SVneo hücrelerindeki β-katenin ve Wnt-1 protein düzeylerinin WB analizi sonrası gruplar arası karşılaştırılması. (***) $p=0.0001$, $p\leq 0.05$) (Birim: piksel yoğunluğu, protein/β-aktin oranı).



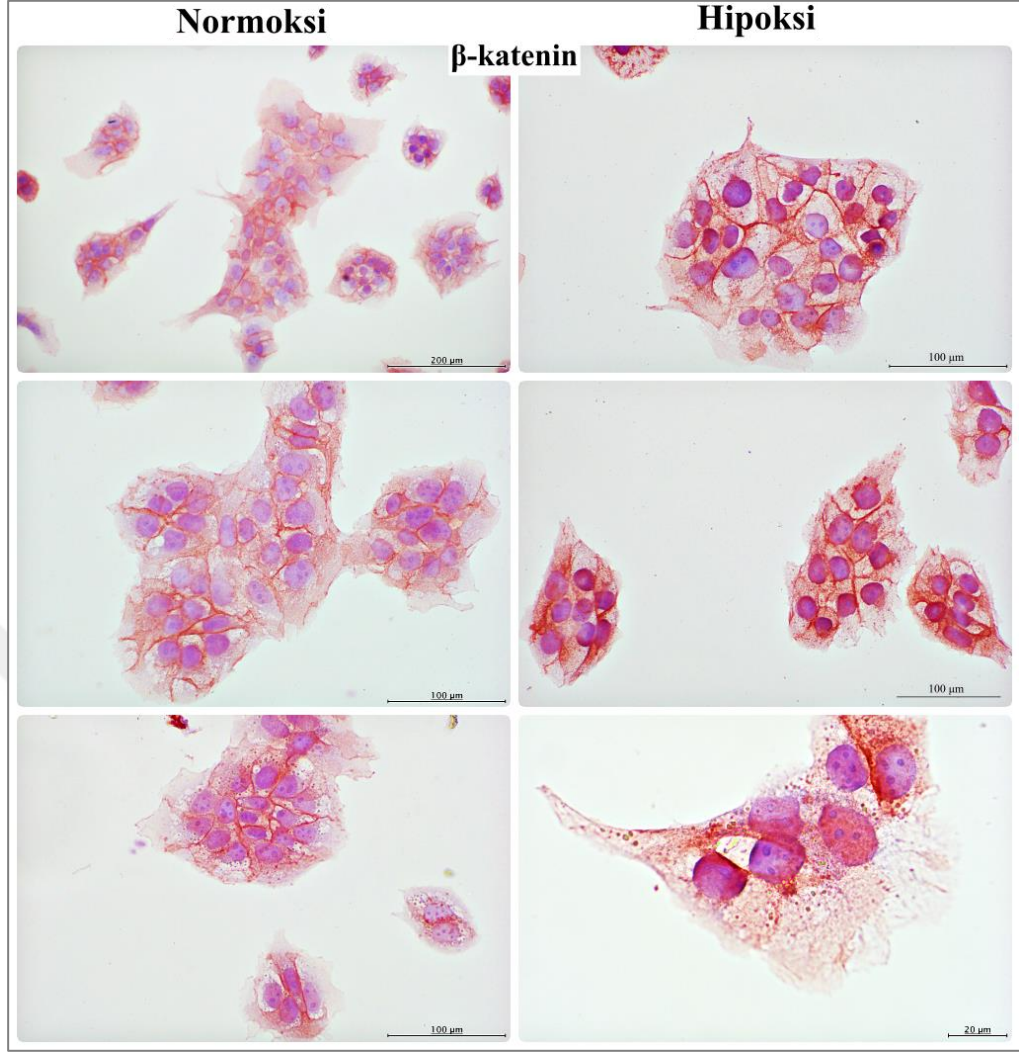
Şekil 4.32. JEG-3 hücrelerindeki β-katenin ve Wnt-1 protein düzeylerinin WB analizi sonrası gruplar arası karşılaştırılması. (* $p=0.05$, $p\leq 0.05$) (***) $p=0.0001$, $p\leq 0.05$) (Birim: piksel yoğunluğu, protein/β-aktin oranı).

4.7. Wnt-1 ve β -katenin Protein Ekspresyonlarının İmmün İşaretleme ile Değerlendirilmesi

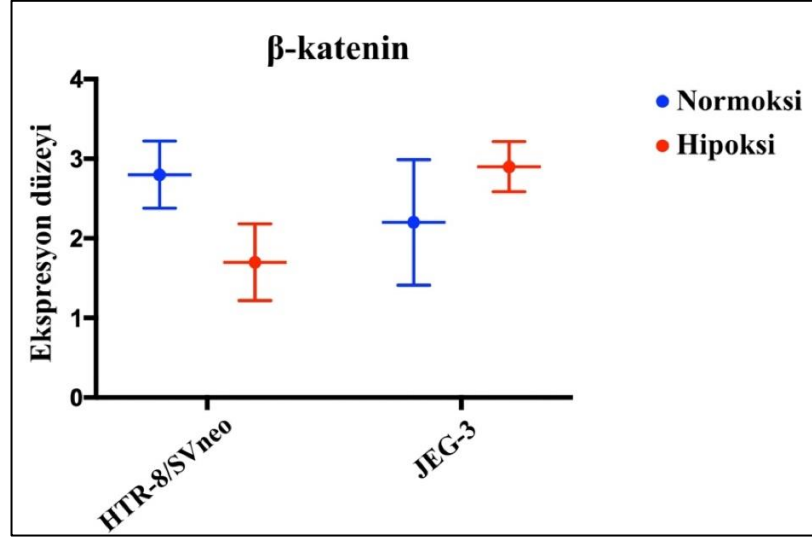
β -katenin ekspresyon düzeylerini belirlemek ve görüntülemek amacıyla HTR-8/SVneo ve JEG-3 hücrelerinde β -katenin antikoruna ile immün işaretleme yapıldı (Bkz. Şekil 4.33-34).



Şekil 4.33. HTR-8/SVneo hücrelerinde β -katenin ekspresyonunun normoksi ve hipoksi gruplarında görüntülenmesi (Bar: 100 μ m, x200 büyütme; Bar: 20 μ m, x1000 büyütme).



Şekil 4.34. JEG-3 hücrelerinde β -katenin ekspresyonunun normoksi ve hipoksi gruplarında görüntülenmesi. (Bar: 200 μ m, x100 büyütme; 100 μ m, x200 büyütme; 20 μ m, x1000 büyütme).

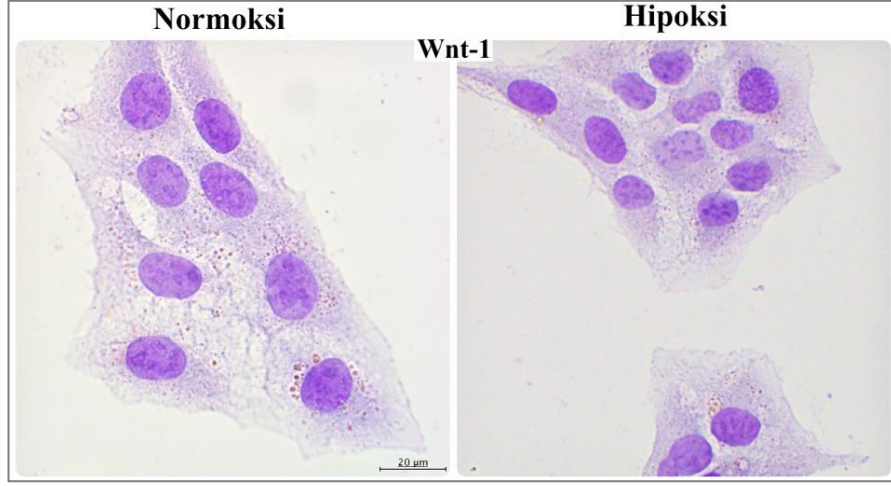


Şekil 4.35. Hücrelerde β -katenin ekspresyonunun normoksi ve hipoksi grupları arasında karşılaştırılması.

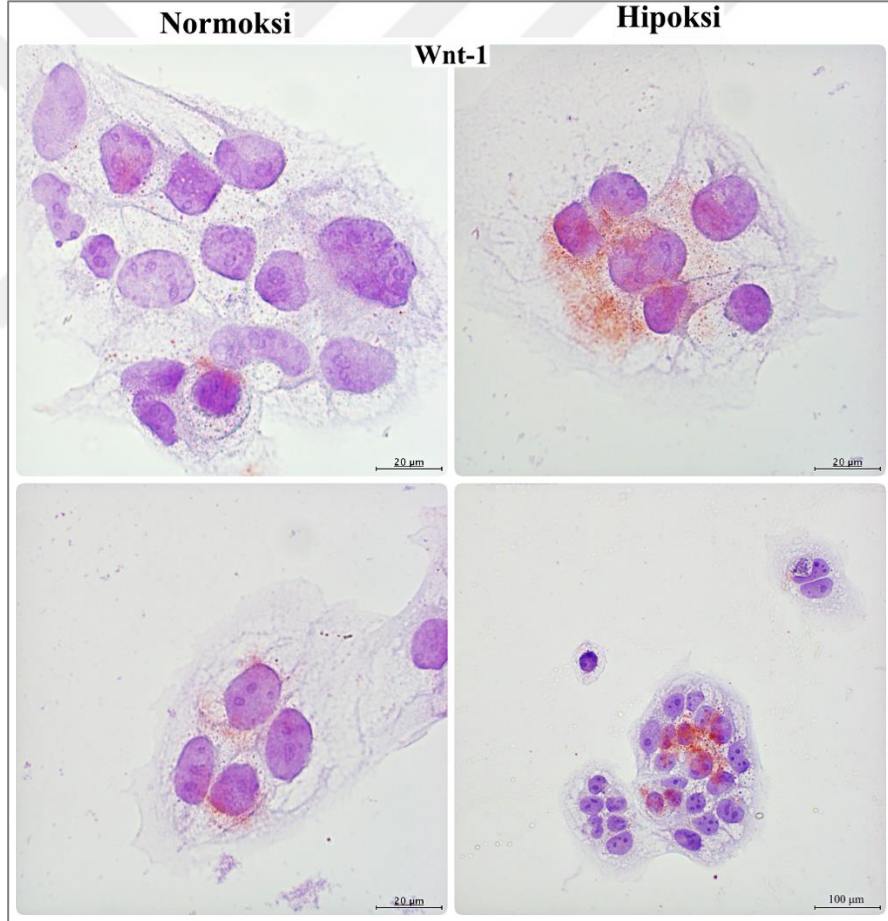
HTR-8/SVneo hücrelerinde hipoksi grubunda β -katenin ekspresyonunun normoksiye kıyasla azaldığı gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.33). Diğer yandan, JEG-3 hücrelerinde hipoksi grubunda normoksi grubuna kıyasla daha yoğun boyanma ve β -katenin ekspresyonunda artış gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.34.).

Bulgular Image J programı ile analiz edildikten sonra istatistiksel olarak değerlendirildi. β -katenin protein ekspresyonu için HTR-8/SVneo hücrelerindeki hipoksi grubunda normoksiye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu ($p=0.001$, $p \leq 0.05$), JEG-3 hücrelerinde ise hipoksi grubunda normoksiye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ($p=0.018$, $p \leq 0.05$) belirlendi (Bkz. Şekil 4.35.).

Wnt-1 protein ekspresyonu için de hücrelerde immün işaretleme yöntemi kullanılarak görüntüleme yapıldı. Her iki hücrede de sitoplazmik küçük granüller şeklinde boyanmalar gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.36-37.).



Şekil 4.36. HTR-8/SVneo hücrelerinde Wnt-1 ekspresyonunun normoksi ve hipoksi gruplarında görüntülenmesi (Bar: 20 µm, x1000 büyütme).

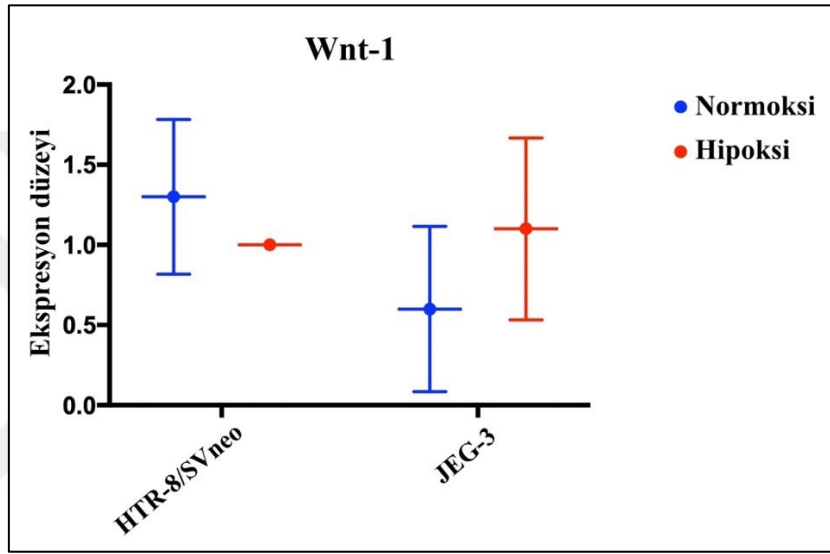


Şekil 4.37. JEG-3 hücrelerinde Wnt-1 ekspresyonunun normoksi ve hipoksi gruplarında görüntülenmesi (Bar: 100 µm, x200 büyütme; 20 µm, x1000 büyütme).

İmmün işaretleme bulguları Image J programı ile analiz edildikten sonra istatistiksel olarak değerlendirildi. HTR-8/SVneo hücrelerinde Wnt-1 protein

ekspresyonu için hipoksi grubunda normoksi grubuna kıyasla bir azalma olduğu mikroskopik olarak gözlemlense de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p=0.067$, $p>0.05$) belirlendi.

JEG-3 hücrelerinde de Wnt-1 protein ekspresyonu için hipoksi grubunda normoksi grubuna kıyasla bir artış olduğu mikroskopik olarak gözlemlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p=0.054$, $p>0.05$) tespit edildi (Bkz. Şekil 4.36.).



Şekil 4.38. Hücrelerde Wnt-1 ekspresyonunun normoksi ve hipoksi grupları arasında karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Gebelik sürecinde plasentanın normal gelişimi anne ve fetüs için çok önemlidir. Placenta gelişirken farklılaşan trofoblast hücrelerinin bir kısmı villusların dış kısmını oluşturan villöz sitotrofoblastlar, diğerleri ise uterus dokularına ve spiral arterlere invaze olan EVT'lerdir. EVT fonksiyonlarının düzenlenmesi plasentanın gelişimi ve uterustaki fetüsün büyümesi için gereklidir (24,97).

Preeklampsi gibi plasental hastalıklarda görülen bozuklukların daha iyi anlaşılabilmesi için trofoblast fonksiyonlarına etki eden faktörlerin detaylı araştırılması gerekmektedir. Anne ve bebek ölümlerine sebep olabilen bu önemli hastalıkların tedavisine yönelik çalışmalar artmakla birlikte hastalığa sebep olan ve/veya hastalık sonucu oluşabilecek birçok mekanizma araştırılmaktadır (98-100).

Preeklampsi, gebeliğin 20. haftasından sonra hipertansiyon ve proteinüri gibi belirtiler sonucu teşhis edilebilmektedir. Bu patoloji için etkili bir tedavi yolu bulunmamaktadır. Genellikle plasentayı alarak tedavi yoluna gidilebilmektedir ancak erken doğum riski sebebiyle yeni doğanın ve annenin sağlığı etkilenebilir. Preeklampsi gibi gebelik döneminde oluşabilecek hastalıkların tedavisinde plasentadaki fizyolojik değişimlerin aydınlatılması çok önemlidir (45).

Plasental hipoksi preeklampsi patofizyolojisinde önemli role sahiptir. Gelişimin ilk haftalarında hipoksi ortamı normal gelişimin bir parçası olsa da ilerleyen haftalarda placenta gelişimine katkı sağlayan spiral arterlerin yeniden modellenmesi sırasında trofoblastların yetersiz invazyonu gibi önemli fonksiyon bozuklukları uteroplacental perfüzyonun azalmasına yol açar. Bu da plasentada hipoksiye neden olmaktadır ve plasental hipoksi preeklampsinin en belirgin özelliği olarak dikkat çekmektedir (27,57,58,62,101).

Hipoksinin preeklampsideki öneminin yanı sıra hastalığın gelişimi açısından hem sebep hem de sonuç olarak rol aldığı ve trofoblastların fonksiyonlarını etkilediği düşünülmektedir. Bu nedenle trofoblast hücrelerinin hipoksik ortamdaki

fonksiyonlarını araştırmak bu hastalıkta rol oynayan mekanizmaları anlamada ve tedavi geliştirmede önemli katkıya sahip olacaktır.

Hastalık mekanizmalarının araştırılması için hasta dokularına ulaşmanın etik aıllardan zorluğu, hasta bazlı kişisel farklılıklar vb. nedeniyle *in vitro* modeller ile yapılan araştırmalar dikkat çekmektedir (7,8,102). Yapılan çalışmalarla preeklampsi için de *in vitro* modeller oluşturularak çalışılabileceği gösterilmiştir. Farklı trofoblast hücre hatlarında hipoksi oluşturularak yapılan bir çalışmada, insan plasenta dokularına benzer Şekilde sonuçlar aldıklarını ve hipoksi modelinin preeklampsinin patojenik mekanizmasını taklit ederek potansiyel bir araştırma modeli olduğunu rapor etmişlerdir (103,104). Bu nedenle, preeklampsi hakkında yaptığımız araştırmamız *in vitro* model üzerine planlanmıştır.

Çalışmamızda *in vitro* preeklampsi modeli oluşturmak amacıyla HTR-8/SVneo ekstravillöz trofoblast hücreleri ve JEG-3 koryokarsinom hücreleri hipoksiye maruz bırakıldılar. Hipoksi oluşturma yöntemlerinden biri olan hipoksik chamber (odacık) yönteminde hücrelerin oksijenle teması kesilerek doğala daha yakın bir hipoksi ortamı sağlansa da ortamdaki oksijenin kontrolü ve stabilitesinin ayarlanması daha zordur. Ayrıca hücreler üzerinde yapılacak uygulama ve analizler için hipoksik odacığın her seferinde açılması ve oksijenle temas gerçekleŐeceęinden deneyin çok hızlı sonlandırılması gerekmektedir. Bir diğer hipoksi oluşturma yöntemi ise kimyasal hipoksi ajanlarıdır. Yapılan çalışmalarda, kimyasal bir hipoksi indükleyicisi olan $CoCl_2$ 'n hipoksi oluşturmak için pratik ve kullanışlı bir yöntem olduğu gösterilmiştir (105).

Literatür bilgileri ışığında, çalışmamızda hipoksi oluşturmak amacıyla $CoCl_2$ kullanılmıştır. Hipoksik süreçlerin çoğunda bir transkripsiyon faktörü olan HIF-1 görev almakta ve hipoksik ortamlarda ekspresyonu artmaktadır (59). HTR-8/SVneo ekstravillöz trofoblast hücreleri ve JEG-3 koryokarsinom hücreleri farklı konsantrasyon ve srelerde $CoCl_2$ ile inkübe edildikten sonra hipoksiyi doğrulamak amacıyla yapılan Western blot analizlerinde HIF-1 ekspresyonunda artış olduğu belirlenmiştir. HIF-1 ekspresyonunda anlamlı artış gösteren ve hipoksi oluşturan $CoCl_2$ konsantrasyonları iki hücre hattında farklılık göstermekle birlikte, HTR-8/SVneo için 4 saat 250 μM , JEG-3 için 24 saat 150 μM 'dir. Ayrıca immün işaretleme

bulgularına göre, hem HTR-8/SVneo hem de JEG-3 hücrelerinde hipoksi grubunda HIF-1 α ekspresyonunda artış olduğu görülmüştür. Böylece, hücrelerde hipoksinin varlığı ve *in vitro* preeklampsi modelinin oluştuğu gösterilmiştir.

Hücreler arası iletişimin hem normal fizyolojik süreçlerde hem de hastalıklarda rolü olduğu bilinmektedir. Hücrelerin çeşitli mekanizmalar yoluyla birbirleriyle iletişime geçmesinin, hem pek çok hastalığın oluşumu ve metastazında hem de tedavi amaçlı çalışılan ilaç taşıma stratejilerinde rol aldığı gösterilmiştir (79,81).

Hücreler arası iletişim mekanizmalarından son yıllarda dikkat çeken Tünel oluşturan nanotüpler (TNT) hakkında yapılan çalışmalar artmakla birlikte hastalıklardaki olası rollerini araştırmak da önem kazanmıştır. Yapılan bir araştırmada, nöronlar arasında oluşan TNT'lerin hücreler arası α -sinüklein transferini sağladığı ve böylece Parkinson hastalığının ilerlemesinde önemli bir katkısı olduğu gösterilmiştir (105). Başka bir çalışmada ise antikanser ilacı içeren modifiye edilmiş makrofaj hücrelerinin TNT'ler aracılığıyla ovaryum karsinom hücrelerini ve metastazı baskıladığını rapor etmişlerdir (107). TNT'lerin hücreler arasındaki iletişimde üstlendiği bu etkili roller sebebiyle pek çok hastalığındaki rolünü araştırmak literatüre katkı sağlayacaktır. Ayrıca TNT'lerin normal fizyolojik olaylarda mı yoksa daha ziyade patolojik durumlarda mı ortaya çıktıkları da önemli bir sorudur.

Preeklampside TNT'lerin olası rollerini araştırmak amacıyla yaptığımız çalışmada, hipoksi ile *in vitro* preeklampsi modeli oluşturulan HTR-8/SVneo ekstravillöz trofoblast hücrelerinde immünfloresan boyama ile TNT'lerin esas bileşeni olan F-aktin molekülü işaretlenerek görüntülemeler yapılmıştır. Hücreler arası oluşan TNT'lerin sayıları ve uzunlukları hipoksi ile normoksi grupları arasında karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Hipoksi grubunda hem TNT sayılarının hem de TNT uzunluklarının normoksiye kıyasla arttığı gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, hipoksi ve oksidatif stres gibi hücrel stres durumlarında trofoblast hücreleri arasında TNT oluşumlarının arttığını dolayısıyla hücreler arası iletişimin ve haberleşme ağının arttığını göstermektedir. Ayrıca trofoblast hücrelerinin bu yeni ve farklı iletişim mekanizması olan TNT'leri etkin olarak kullandığı, hipoksi gibi oksijen değişikliklerine yanıt olarak TNT uzunluklarını artırarak daha uzak mesafedeki hücrelerle de iletişim kurduğu gösterilmiştir.

Yakın zamanda Desir ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, SKOV3 ovaryum kanser hücrelerinde kanser mikroçevresini taklit etmek amacıyla hipoksik ortam oluşturulmuş ve TNT sayısı ile uzunluğunda artış olduğu rapor edilmiştir (108).

Çalışmamızdaki bulgular da hipoksinin TNT oluşumlarını artırdığını desteklemekle birlikte HTR-8/SVneo ekstrasvillöz trofoblast hücrelerindeki TNT oluşumları ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir. Ayrıca preeklampside TNT'lerin etkili bir role sahip olabileceği de ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Diğer yandan, literatürde JEG-3 koryokarsinom hücrelerinde TNT oluşumlarına ilişkin bir veriye rastlanılmamıştır. Çalışmamızda JEG-3 hücreleri için TNT oluşumları ilk defa araştırılmış olup normoksi grubunda neredeyse hiç TNT oluşumu gözlenememiş ancak hipoksi grubunda nadir de olsa TNT oluşumlarına rastlanılmış ve görüntülemesi yapılmıştır. Tümörjenik kanser hücreleri olup koloni oluşturarak çoğalan bu hücrelerde hücreler arası iletişim mekanizması olarak TNT'lerin çok tercih edilmediği düşünülmektedir.

Elde edilen bu bulgular, TNT'lerin farklı hücrelerde, farklı patolojilerde ve farklı süreçlerde ortaya çıktığını göstermesi açısından çok ilginçtir. Ayrıca, kanser hücrelerinin daha ziyade yakın kontakt yoluyla iletişime geçtiğini, EVT'lerin ise iletişim için TNT'leri etkin kullandığını göstermektedir. Bu açıdan, iki farklı hücre grubunun hipoksi gibi bir hücrel stres koşulu altındayken aynı tepkiyi göstermediği belirlenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan olanakların yanı sıra, TNT'ler için daha yüksek çözünürlüklü görüntüleme ve değerlendirme yapılması için elektron mikroskopi veya gerçek zamanlı görüntüleme teknolojilerinin kullanılması sonraki çalışmalar için daha değerli veriler sağlayabilir.

Hücrelerin proliferasyon, migrasyon ve invazyon gibi çeşitli fonksiyonlarının düzenlenmesinde hücreler arası iletişimin ve TNT oluşumlarının yanı sıra Wnt/ β -katenin sinyal mekanizmasının da önemli roller aldığı bilinmektedir. Hem normal embriyonik gelişimde hem de yetişkinlerde çeşitli hücre ve doku homeostazı süreçlerinde etkili olan Wnt/ β -katenin sinyal yolağı karmaşık bir sinyal yolağı

mekanizmasıdır. Başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklardaki rolleri üzerine çok sayıda çalışma mevcuttur (75). Wnt/ β -katenin sinyal yolağının trofoblast fonksiyonlarındaki ve preeklampsideki aktivitesi ve olası rollerine ilişkin çalışmalar da son yıllarda dikkat çekmektedir.

Zhang ve arkadaşları, preeklamptik ve sağlıklı plasentalarda β -katenin ve onun antagonisti olarak çalışan Dickkopf-1'in düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında, bu proteinlerin özellikle sinsityotrofoblast ve EVT'lerde ekspresyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca preeklamptik plasentalarda β -katenin'in mRNA ve protein düzeylerinin daha az, Dickkopf-1'in ise daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Dolayısıyla, azalmış/baskılanmış β -katenin ekspresyonu ile yüksek düzeyde eksprese olan Dickkopf-1'in preeklampsi patogeneziyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (109).

Zhuang ve arkadaşları ile Wu ve arkadaşlarının yaptıkları benzer çalışmalarda, kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyonunda tümör düzenleyici olarak görev alan SATB1 proteini ve Wnt sinyal yolağının en önemli elemanlarından olan β -katenin proteininin trofoblast invazyonu ve preeklampsi patogeneziindeki rolü araştırılmıştır. Preeklampsili hastaların placentada dokularında sağlıklı plasentalara kıyasla β -katenin ve SATB1'in ekspresyon düzeylerinde azalma olduğu görülmüştür. Ayrıca preeklampside meydana gelen hipoksi ve oksidatif stresi taklit etmek amacıyla HTR-8/SVneo ekstravillöz trofoblast hücrelerinde hipoksi/reoksijenizasyon uygulaması yaptıkları çalışmada, β -katenin ve SATB1 protein düzeylerinde kontrole kıyasla azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Elde ettikleri bu veriler, insan plasentadaki SATB1 ekspresyonunun oksidatif stresten etkilendiğini ve β -katenin sinyali yoluyla trofoblastların migrasyon ve invazyonunu düzenleyebileceğini göstermiştir (110-113).

Chen ve arkadaşları, Wnt5a'nın trofoblast invazyonundaki olası rolünü araştırmış ve preeklampsili hastaların plasentalarında Wnt5a'nın protein düzeyinin daha fazla olduğunu, ayrıca rekombinant Wnt5a ile indüklenmiş HTR-8/SVneo ekstravillöz trofoblast hücrelerinde migrasyon ve invazyonun baskılandığını göstermişlerdir. Wnt5a'nın ayrıca β -katenin protein düzeyini de baskıladığını rapor etmişlerdir. Bu veriler, düşük düzeydeki Wnt5a'nın erken plasantasyonu kolaylaştırdığını ancak yüksek Wnt5a aktivasyonunun yetersiz trofoblast invazyonu ile ilişkili PE'nin patogeneziye katkıda bulunduğunu göstermiştir (114).

Zhuang ve arkadaşlarının başka bir çalışmasında, tümör invazyonunda görevli ve tümör baskılayıcı bir protein olan C/EBP β 'in trofoblast invazyonu ve preeklampsisi ile ilişkisi araştırılmıştır. Preeklampitik plasenta dokularında C/EBP β düzeyinin sağlıklıya kıyasla daha fazla olduğu, β -katenin düzeyinin ise daha az olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada hipoksi/reoksijenizasyon uygulaması yaptıkları HTR-8/SVneo ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinde C/EBP β düzeyinin kontrole kıyasla daha fazla olduğu, C/EBP β knockdown (susturulması) çalışması sonrası ise β -katenin düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Dolayısıyla bu sonuçlar ile C/EBP β 'nin oksidatif strese bağlı yüksek düzeydeki ekspresyonunun, Wnt/ β -katenin sinyal yolunu düzenlediği ve trofoblast hücrelerinin invazyonunu etkileyerek preeklampsinin patogeneze katkısı olduğu ortaya konulmuştur (115).

Preeklampsili hastalardan alınan plasenta dokuları ile yapılan diğer çalışmalarda; Wnt-1, Wnt-2 ve β -katenin ekspresyonunun sağlıklı plasentaya kıyasla preeklampitik plasenta dokusunda azaldığı rapor edilmiştir (6, 116). Yapılan çalışmalar, trofoblastların invazyon ve migrasyon gibi fonksiyonlarında Wnt/ β -katenin sinyal yolağının düzenleyici rolü olabileceğini belirtmiştir (117).

Literatüre bakıldığında, genellikle preeklampitik plasenta dokularında çalışılmış olduğu, trofoblast hücrelerinin dahil edildiği *in vitro* çalışmaların oldukça az sayıda olduğu, bu *in vitro* çalışmalarda da hipoksi/reoksijenizasyon uygulaması yapılarak yetersiz oksijen ortamının taklit edilmeye çalışıldığı görülmüştür. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda reoksijenizasyon uygulaması yapılmadan, direkt hipoksiye karşı spesifik yanıtları araştırmak amacıyla trofoblast hücrelerinde kimyasal hipoksi oluşturulmuştur. Ayrıca çalışmamızda HTR-8/SVneo ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinin yanı sıra karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla tümörjenik kanser tipi hücreler olan JEG-3 koryokarsinom trofoblast hücreleri de araştırılmıştır. Dolayısıyla çalışmamız, farklı tipte trofoblast hücreleri dahil edilerek *in vitro* preeklampsisi modeli oluşturulan ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağının preeklampsideki olası rolünü araştıran çok az sayıda çalışmadan biri olmasıyla dikkat çekmektedir.

Çalışmamızda Wnt/ β -katenin sinyal yolağının preeklampsideki olası rollerini araştırmak amacıyla hipoksi ile *in vitro* preeklampsisi modeli oluşturulan HTR-8/SVneo ekstrasvillöz trofoblast ve JEG-3 koryokarsinom hücrelerinde Wnt-1 ve β -katenin

ekspresyonları Western blot ve immün işaretleme yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, hem Wnt-1 hem de β -katenin protein ekspresyon düzeyleri HTR-8/SVneo hücrelerinde hipoksi grubunda normoksi grubuna kıyasla azalmıştır. JEG-3 hücrelerinde ise tam aksine hipoksi grubunda Wnt-1 ve β -katenin protein ekspresyonu artmıştır.

In vitro preeklampsi modeli oluşturularak Wnt-1 ve β -katenin proteinlerinin birlikte araştırıldığı çalışmamız ile elde edilen sonuçlar, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivitesinin preeklampside baskılandığını göstermektedir. Wnt-1 ve β -katenin protein düzeylerinin baskılanması ve azalması, plasentasyon sırasındaki trofoblast invazyonu ve migrasyonunun yetersiz kalmasına preeklampsinin ortaya çıkmasına katkı sağlamaktadır. Wnt-1 ve β -katenin protein düzeylerinin çok yüksek olması ise anormal invazyon ve tümörigenezi indükleyerek kanser oluşumuna ve koryokarsinom gibi ciddi gestasyonel hastalıklara yol açabilmektedir. Çalışmamızda *in vitro* preeklampsi modeli ile elde edilen bu sonuçlar, insan plasenta dokuları ile yapılan çalışmalardaki sonuçları desteklemektedir. Ayrıca JEG-3 koryokarsinom hücrelerinde hipoksik ortam oluşturularak elde edilen sonuçlar, tümör invazyonu ve kanser ile ilgili mekanizmalar için de bu yolağın önemini kanıtlamaktadır. Çalışmamız neticesinde, Wnt/ β -katenin sinyal mekanizmasının preeklampsi için terapötik bir hedef olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Ayrıca hem TNT oluşumlarının hem de Wnt/ β -katenin sinyal mekanizmasının, hücrelerin proliferasyon, invazyon ve migrasyon süreçlerindeki etkili rolleri sebebiyle birbiriyle bağlantılı mekanizmalar olduğu da düşünülmektedir. Bu alanda daha detaylı araştırmalar yapılmalıdır. Yaptığımız bu çalışma ile elde edilen sonuçlar literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

Çalışmamızın sonraki aşamalarında; invazyon ve migrasyon analizleri eklenerek Wnt/ β -katenin sinyal yolağı için fonksiyonel araştırmaların yapılması, özellikle trofoblast hücreleri arasında oluşan TNT oluşumlarının moleküler bileşenleri, kargo içerikleri ve özellikle hangi moleküllerin taşınmasına aracılık ettiklerinin detaylı olarak araştırılması, diğer hücreler arasında oluşan TNT oluşumlarının özellikleriyle karşılaştırılarak değerlendirilmesi planlanmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1) Farklı konsantrasyonlarda CoCl_2 uygulanan hücrelerde HIF-1 α protein ekspresyonları karşılaştırıldı. HTR-8/SVneo hücreleri için 4 saat 250 μM konsantrasyonunda, JEG-3 hücreleri için 24 saat 150 μM konsantrasyonunda normoksi ile kıyaslandığında anlamlı artış olduğu gösterildi.

2) HTR-8/SVneo ve JEG-3 hücrelerinde hipoksi indüklemesi ile *in vitro* preeklampsi modeli oluşturuldu.

3) HTR-8/SVneo ve JEG-3 hücrelerinde hipoksi olduğu gösterilen CoCl_2 konsantrasyonlarının ve inkübasyon sürelerinin (HTR-8/SVneo hücreleri için 4 saat 250 μM , JEG-3 hücreleri için 24 saat 150 μM) hücre canlılığını olumsuz yönde etkilemediği gösterildi.

4) HTR-8/SVneo ekstravillöz trofoblast hücrelerinde TNT oluşumları ilk defa araştırılmış olup TNT sayısı ve uzunlukları hipoksi grubunda anlamlı olarak arttı.

5) JEG-3 hücreleri için TNT oluşumları ilk defa araştırılmış olup normoksi grubunda neredeyse hiç TNT oluşumu gözlenemedi ancak hipoksi grubunda nadir de olsa TNT oluşumlarına rastlanıldı ve görüntülemesi yapıldı.

6) Wnt/ β -katenin sinyal yolağının rolünü araştırmak için hücrelerdeki Wnt-1 protein ekspresyon düzeyi araştırıldı ve HTR-8/SVneo hücrelerinde hipoksi grubunda normoksi grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı gösterildi. JEG-3 hücrelerindeki Wnt-1 protein ekspresyonu ise normoksi grubuna kıyasla hipoksi grubunda anlamlı olarak arttı.

7) Wnt/ β -katenin sinyal yolağının rolünü araştırmak için hücrelerdeki β -katenin protein ekspresyon düzeyi incelendi ve HTR-8/SVneo hücrelerinde hipoksi grubunda normoksi grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı belirlendi. JEG-3

hücrelerindeki β -katenin protein ekspresyonunun ise normoksi grubuna kıyasla hipoksi grubunda anlamlı olarak arttığı gösterildi.

8) Hücrelerdeki β -katenin'in çekirdek ve sitoplazmadaki ekspresyonları immün işaretleme ile gösterildi. β -katenin'in HTR-8/SVneo hücrelerinde hipoksi grubunda normoksiye kıyasla anlamlı olarak azaldığı, JEG-3 hücrelerinde ise hipoksi grubunda anlamlı olarak arttığı belirlendi.

9) Bu çalışma ile, trofoblast hücrelerindeki TNT oluşumları ilk defa gösterildi ve preeklampside TNT'nin olası rolleri ilk kez araştırıldı.

10) Wnt/ β -katenin sinyal yolağının preeklampsideki rolü gösterildi ve bu konuda çok az sayıda araştırma olması sebebiyle literatüre önemli bir kaynak sağlandı.

11) *In vitro* preeklampsi modeli oluşturularak Wnt-1 ve β -katenin proteinlerinin birlikte araştırıldığı çalışmamız ile elde edilen sonuçlar, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivitesinin preeklampside baskılandığını gösterdi.

12) Hem TNT oluşumları hem de Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivitesi, normal trofoblast hücrelerinin yanı sıra koryokarsinom kanser hücrelerinde de araştırılarak karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

13) Bu çalışma, preeklampsi başta olmak üzere gebelik sırasında değişen oksijen ortamlarına (plasental hipoksi vb.) yanıtların; hücresel, moleküler ve fonksiyonel değişiklikler açısından aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.

14) Çalışmamız hem preeklampsi hastalığı hem de benzer patolojilerin mekanizmasının aydınlatılması için yeni terapötik yaklaşımlara yol göstererek literatüre kaynak oluşturacaktır.

Çalışma sonrası öneriler aşağıda sıralanmıştır:

1) Çalışmamızda trofoblast hücre hatları olan HTR-8/SVneo ve JEG-3 kullanılmıştır. Farklı trofoblast hücreleri kullanılarak çalışma genişletilebilir.

2) Hipoksi oluşturmak için farklı kimyasal hipoksi ajanları ya da farklı yöntemler kullanılabilir.

3) TNT'leri incelemek ve değerlendirmek amacıyla daha yüksek teknoloji görüntüleme yöntemleri kullanılabilir ve farklı belirteçler ile işaretleme yapılarak görüntülenebilir.

4) Wnt/ β -katenin sinyal yolağının preeklampsideki rolü; invazyon ve migrasyon deneyleri eklenerek, yolakta yer alan daha fazla protein hedeflenerek ve qPCR gibi farklı kantitatif yöntemler kullanılarak daha detaylı araştırılabilir.



7.KAYNAKLAR

1. Hung TH, Burton GJ. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia, *Taiwan J Obstet Gynecol.*, 2006, 45(3):189–200.
2. Sun J, Song B, Ban Y, Ma C, Sun J, Ai D, et al. Whole transcriptome analysis of trophoblasts under hypoxia, *Placenta*, 2022, 117:13–20.
3. Abalos E, Cuesta C, Grosso AL, Chou D, Say L. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 2013, 170(1):1–7.
4. Nawaz M, Fatima F. Extracellular vesicles, tunneling nanotubes, and cellular interplay: Synergies and missing links, *Front Mol Biosci.*, 2017, 18(4):50.
5. Ota C, Baarsma HA, Wagner DE, Hilgendorff A, Königshoff M. Linking bronchopulmonary dysplasia to adult chronic lung diseases: role of WNT signaling, *Mol Cell Pediatr.*, 2016, 3(1): 1-13.
6. Zhang Z, Wang X, Zhang L, Shi Y, Wang J, Yan H. Wnt/ β -catenin signaling pathway in trophoblasts and abnormal activation in preeclampsia, *Mol Med Rep.*, 2017, 16(2):1007–13.
7. Zeilinger K, Freyer N, Damm G, Seehofer D, Knöspel F. Cell sources for in vitro human liver cell culture models, *Exp Biol Med.*, 2016, 241(15):1684–98.
8. Johnson CI, Argyle DJ, Clements DN. In vitro models for the study of osteoarthritis, *Vet J.*, 2016, 209:40–49.
9. Knöfler M, Haider S, Saleh L, Pollheimer J, Gamage TKJB, James J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems, *Cell Mol Life Sci.*, 2019, 76(18):3479–96.
10. Mundy DC VG. The Diagnosis and Management of the Acute Abdomen in Pregnancy, *Springer*, 2018, 25–39.

11. Şimşek Z. Preeklampsili Hastaların Plasenta, Plasenta Yatağı ve Kordon Dokusunda Gen Ekspresyon Analizi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi, 2022.
12. Griffiths SK, Campbell JP. Placental structure, function and drug transfer, *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, 2015, 15(2):84–9.
13. Solli GS, Sandbakk Ø. Training characteristics during pregnancy and postpartum in the world's most successful cross country skier, *Front Physiol.*, 2018, 23(9):595.
14. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta, *Thromb Res.*, 2004, 114(5–6):397–407.
15. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta, *J Clin Pathol.*, 2008, 61(12):1296–302.
16. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 2015, 370(1663): 20140066.
17. Mete G. Dişi Üreme Sistemi. İçinde: Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas, Baykal B, (Çeviri editörü). Histology: A Text and Atlas, Ross M and Pawlina W. 6. Baskı. Ankara, Palme yayınları, 2014:854.
18. Pijnenborg R. The Placental Bed, *Hypertension in Pregnancy*, 1996, 15(1):7–23.
19. Turner RJ, Bloemenkamp KWM, Penning ME, Bruijn JA, Baelde HJ. From Glomerular Endothelium to Podocyte Pathobiology in Preeclampsia: a Paradigm Shift, *Curr Hypertens Rep.*, 2015, 17(7): 1-8.
20. Mete G. Dişi Üreme Sistemi. İçinde: Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas, Baykal B, (Çeviri editörü). Histology: A Text and Atlas, Ross M and Pawlina W. 6. Baskı. Ankara, Palme yayınları, 2014: 859.
21. Reyes L, Wolfe B, Golos T. Hofbauer Cells: Placental Macrophages of Fetal Origin, *Results Probl Cell Differ.*, 2017, 62:45–60.
22. Zhang X, Wei H. Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications, *Front Immunol.*, 2021, 12: 728291.

23. Lee JK, Oh SJ, Park H, Shin OS. Recent Updates on Research Models and Tools to Study Virus-Host Interactions at the Placenta, *Viruses*, 2019, 12(1): 5
24. Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. *Development*, 2019, 146(22): 163428.
25. Baergen RN. Manual of Pathology of the Human Placenta, 2nd Edition, *Springer*, 2011, 3-118.
26. Guttmacher AE, Maddox YT, Spong CY. The Human Placenta Project: placental structure, development, and function in real time, *Placenta*, 2014, 35(5):303–304.
27. James JL, Stone PR, Chamley LW. The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy, *Hum Reprod Update*, 2006, 12(2):137–144.
28. Kojima J, Ono M, Kuji N, Nishi H. Human Chorionic Villous Differentiation and Placental Development, *Int J Mol Sci.*, 2022, 23(14):8003.
29. Cross JC, Nakano H, Natale DRC, Simmons DG, Watson ED. Branching morphogenesis during development of placental villi, *Differentiation*, 2006, 74(7):393–401.
30. Demir R, Kosanke G, Kohnen G, Kertschanska S, Kaufmann P. Classification of human placental stem villi: review of structural and functional aspects, *Microsc Res Tech.*, 1997, 38(1–2):29–41.
31. Wong F, Cox BJ. Cellular analysis of trophoblast and placenta, *Placenta*, 2017, 59:2–7.
32. Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies, *Am J Obstet Gynecol.*, 2002, 187(5):1416–23.
33. Fisher SJ. Why is placentation abnormal in preeclampsia?, *Am J Obstet Gynecol.*, 2015, 213:115–22.
34. Hustin J, Jauniaux E, Schaaps JP. Histological study of the materno-embryonic interface in spontaneous abortion, *Placenta*, 1990, 11(6):477–86.

35. Khong TY, Liddell HS, Robertson WB. Defective haemochorial placentation as a cause of miscarriage: a preliminary study, *Br J Obstet Gynaecol.*, 1987, 94(7):649–55.
36. Sato Y. Endovascular trophoblast and spiral artery remodeling, *Mol Cell Endocrinol.*, 2020, 503.
37. Sun C, Groom KM, Oyston C, Chamley LW, Clark AR, James JL. The placenta in fetal growth restriction: What is going wrong?, *Placenta*, 2020, 96:10–8.
38. Knöfler M, Pollheimer J. Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling, *Front Genet.*, 2013, 4:190.
39. Kanasaki K, Kalluri R. The biology of preeclampsia, *Kidney Int.*, 2009, 76(8):831–7.
40. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia, *Lancet*, 2005, 365(9461):785–99.
41. Akalın A, Şahin S. Preeklampsi: Tanı ve Hemşirelik Yönetiminde Güncel Yaklaşımlar, *Journal of Human Rhythm*, 2018, 4(2):88-97.
42. Saghian R, Bogle G, James JL, Clark AR. Establishment of maternal blood supply to the placenta: insights into plugging, unplugging and trophoblast behaviour from an agent-based model, *Interface Focus*, 2019, 9(5):20190019.
43. Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme, *Placenta*, 2009, 30:32–37.
44. Svensson-Arvelund J. Immune regulation at the fetal-maternal interface with focus on decidual macrophages, Doctoral dissertation, Linköping University Electronic Press, 2015, 1448.
45. Rana S, Lemoine E, Granger J, Karumanchi SA. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives, *Circ Res.*, 2019., 124(7):1094–112.
46. Wang GL, Semenza GL. Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor-1, *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(3):1230–1237.

47. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1, *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(38):23757–23763.
48. Berra E, Roux D, Richard DE, Pouyssegur J. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) escapes O₂-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm, *EMBO Rep.*, 2001, 2(7):615.
49. Guo Y, Xiao Z, Yang L, Gao Y, Zhu Q, Hu L, et al. Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma, *Oncol Rep.*, 2020, 43(1):3–15.
50. Wicks EE, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. *J Clin Invest.*, 2022, 132(11): 159839.
51. Lu X, Kang Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: Master regulators of metastasis, *Clinical Cancer Research*, 2010, 10:5928–35.
52. Hubbi ME, Semenza GL. Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2015, 309(12):775–82.
53. Thirlwell C, Schulz L, Dibra H, Beck S. Suffocating cancer: hypoxia-associated epimutations as targets for cancer therapy, *Clin Epigenetics*, 2011, 3(1):1-9.
54. Deng F, Wang S, Zhang L. Endothelial microparticles act as novel diagnostic and therapeutic biomarkers of circulatory hypoxia-related diseases: a literature review, *J Cell Mol Med.*, 2017, 21(9):1698–710.
55. Shu S, Wang Y, Zheng M, Liu Z, Cai J, Tang C, et al. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Kidney Injury and Repair, *Cells*, 2019, 8(3):207.
56. Yu B, Wang X, Song Y, Xie G, Jiao S, Shi L, et al. The role of hypoxia-inducible factors in cardiovascular diseases, *Pharmacol Ther.*, 2022, 238:108186.
57. Matsubara K. Hypoxia in the pathogenesis of preeclampsia. *Hypertension Research in Pregnancy*, 2017, 5(2):46–51.
58. Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M. Oxygen and placental development during the first trimester: Implications for the pathophysiology of pre-eclampsia, *Placenta*, 2000, 21:25-30.

59. Tal R. The role of hypoxia and hypoxia-inducible factor-1alpha in preeclampsia pathogenesis, *Biol Reprod.*, 2012, 87(6):134-141.
60. Thompson LP, Pence L, Pinkas G, Song H, Telugu BP. Placental Hypoxia During Early Pregnancy Causes Maternal Hypertension and Placental Insufficiency in the Hypoxic Guinea Pig Model, *Biol Reprod.*, 2016, 95(6):1–10.
61. Fryer BH, Simon MC. Hypoxia, HIF and the placenta, *Cell Cycle*, 2006, 5(5):495–8.
62. Fajersztajn L, Veras MM. Hypoxia: From Placental Development to Fetal Programming, *Birth Defects Res.*, 2017, 109(17):1377–85.
63. Soares MJ, Iqbal K, Kozai K. Hypoxia and Placental Development, *Birth Defects Res.*, 2017, 109(17):1309.
64. Ilyas M. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development, *J Pathol.*, 2005, 205(2):130–44.
65. Rim EY, Clevers H, Nusse R. The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators, *Annu Rev Biochem.*, 2022, 91:571–98.
66. Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development, *J Cancer Res Clin Oncol.*, 2003, 129(4):199–221.
67. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer, *Nature*, 2005, 434(7035):843–50.
68. Schunk SJ, Floege J, Fliser D, Speer T. WNT- β -catenin signalling-a versatile player in kidney injury and repair, *Nat Rev Nephrol.*, 2021, 17(3):172–84.
69. Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer, *Journal of Hematology & Oncology*, 2020, 13(1):1–16.
70. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer, *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.*, 2003, 1653(1):1–24.
71. Helmbrecht K, Kispert A, von Wasielewski R, Brabant G. Identification of a Wnt/ β -Catenin signaling pathway in human thyroid cells, *Endocrinology*, 2001, 142(12):5261–6.

72. Kikuchi A. Modulation of Wnt signaling by Axin and Axil, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 1999, 10(3–4):255–65.
73. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin, *EMBO J.*, 2012, 31(12):2714–36.
74. Novak A, Dedhar S. Signaling through β -catenin and Lef/Tcf, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1999, 56(5–6):523–37.
75. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development, *Cell Res.*, 2005, 15(1):28–32.
76. Herr P, Hausmann G, Basler K. WNT secretion and signalling in human disease, *Trends Mol Med.*, 2012, 18(8):483–93.
77. Sonderegger S, Husslein H, Leisser C, Knöfler M. Complex expression pattern of Wnt ligands and frizzled receptors in human placenta and its trophoblast subtypes, *Placenta*, 2007, 28:97-102.
78. Sonderegger S, Pollheimer J, Knöfler M. Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation—review, *Placenta*, 2010, 31(10):839–47.
79. Yang BA, Westerhof TM, Sabin K, Merajver SD, Aguilar CA. Engineered Tools to Study Intercellular Communication, *Adv Sci.*, 2020, 8(3): 2002825.
80. Huang J, Meng P, Wang C, Zhang Y, Zhou L. The relevance of organelle interactions in cellular senescence, *Theranostics*, 2022, 12(5):2445–64.
81. Fafián-Labora JA, O’Loughlen A. Classical and Nonclassical Intercellular Communication in Senescence and Ageing, *Trends Cell Biol.*, 2020, 30(8):628–639.
82. Totland MZ, Rasmussen NL, Knudsen LM, Leithe E. Regulation of gap junction intercellular communication by connexin ubiquitination: physiological and pathophysiological implications, *Cell Mol Life Sci.*, 2020, 77(4):573–591.
83. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport, *Science*, 2004, 303(5660):1007–1010.

84. Roehlecke C, Schmidt MHH. Tunneling Nanotubes and Tumor Microtubes in Cancer, *Cancers*, 2020, 12(4):857.
85. Gerdes HH, Rustom A, Wang X. Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development, *Mech Dev.*, 2013, 130(6–8):381–387.
86. Ljubojevic N, Henderson JM, Zurzolo C. The Ways of Actin: Why Tunneling Nanotubes Are Unique Cell Protrusions, *Trends Cell Biol.*, 2021, 31(2):130–142.
87. Dagar S, Pathak D, Oza H v., Mylavarapu SVS. Tunneling nanotubes and related structures: molecular mechanisms of formation and function, *Biochem J.*, 2021, 478(22):3977–3998.
88. Han X, Wang X. Opportunities and Challenges in Tunneling Nanotubes Research: How Far from Clinical Application? *Int J Mol Sci.*, 2021, 22(5):1–15.
89. Zurzolo C. Tunneling nanotubes: Reshaping connectivity, *Curr Opin Cell Biol.*, 2021, 71:139–147.
90. Austefjord MW, Gerdes HH, Wang X. Tunneling nanotubes: Diversity in morphology and structure, *Commun Integr Biol.*, 2014, 7(2):27934.
91. Khattar KE, Safi J, Rodriguez AM, Vignais ML. Intercellular Communication in the Brain through Tunneling Nanotubes, *Cancers*, 2022, 14(5):1207.
92. Wang XT, Sun H, Chen NH, Yuan YH. Tunneling nanotubes: A novel pharmacological target for neurodegenerative diseases? *Pharmacol Res.*, 2021, 170: 105541.
93. Mittal R, Karhu E, Wang JS, Delgado S, Zukerman R, Mittal J, et al. Cell communication by tunneling nanotubes: Implications in disease and therapeutic applications, *J Cell Physiol.*, 2019, 234(2):1130–1146.
94. Rustom A. The missing link: Does tunnelling nanotube-based supercellularity provide a new understanding of chronic and lifestyle diseases? *Open Biol.*, 2016, 6(6): 160057.
95. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview, *Curr Protoc Immunol.*, 2018, 120:5.1.1.

96. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications, *Crit Rev Biotechnol.*, 2017, 37(2):163–176.
97. Pollheimer J, Vondra S, Baltayeva J, Beristain AG, Knöfler M. Regulation of Placental Extravillous Trophoblasts by the Maternal Uterine Environment, *Front Immunol.*, 2018, 9: 2597.
98. Zhou J, Xiao D, Hu Y, Wang Z, Paradis A, Mata-Greenwood E, et al. Gestational hypoxia induces preeclampsia-like symptoms via heightened endothelin-1 signaling in pregnant rats, *Hypertension*, 2013, 62(3):599–607.
99. Turbeville HR, Sasser JM. Preeclampsia beyond pregnancy: long-term consequences for mother and child, *Am J Physiol Renal Physiol.*, 2020, 318(6):1315–1326.
100. Aouache R, Biquard L, Vaiman D, Miralles F. Oxidative stress in preeclampsia and placental diseases, *International journal of molecular sciences*, 2018, 19(5):1496.
101. Perlman BE, Merriam AA, Lemenze A, Zhao Q, Begum S, Nair M, et al. Implications for preeclampsia: Hypoxia-induced Notch promotes trophoblast migration, *Reproduction*, 2021, 161(6):681–96.
102. Jorba I, Mostert D, Hermans LHL, van der Pol A, Kurniawan NA, Bouten CVC. In Vitro Methods to Model Cardiac Mechanobiology in Health and Disease, *Tissue Eng Part C Methods*, 2021, 27(3):139–51.
103. Zhao J, Chow RP, McLeese RH, Hookham MB, Lyons TJ, Yu JY. Modelling preeclampsia: a comparative analysis of the common human trophoblast cell lines, *FASEB Bioadv*, 2021, 3(1):23–35.
104. Martinez-Fierro ML, Hernández-Delgadillo GP, Flores-Morales V, Cardenas-Vargas E, Mercado-Reyes M, Rodriguez-Sanchez IP, et al. Current model systems for the study of preeclampsia, *Exp Biol Med.*, 2018, 243(6):576.
105. Muñoz-Sánchez J, Chánez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model, *J Appl Toxicol.*, 2019, 39(4):556–70.
106. Abounit S, Bousset L, Loria F, Zhu S, Chaumont F, Pieri L, et al. Tunneling nanotubes spread fibrillar α -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes, *EMBO J.*, 2016, 35(19):2120–38.

107. Guo L, Zhang Y, Yang Z, Peng H, Wei R, Wang C, et al. Tunneling Nanotubular Expressways for Ultrafast and Accurate M1 Macrophage Delivery of Anticancer Drugs to Metastatic Ovarian Carcinoma, *ACS Nano.*, 2019, 13(2):1078–1096.
108. Desir S, Dickson EL, Vogel RI, Thayanithy V, Wong P, Teoh D, et al. Tunneling nanotube formation is stimulated by hypoxia in ovarian cancer cells, *Oncotarget*, 2016, 7(28):43150–43161.
109. Zhang Z, Li H, Zhang L, Jia L, Wang P. Differential expression of beta-catenin and dickkopf-1 in the third trimester placentas from normal and preeclamptic pregnancies: a comparative study, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2013, 11(1): 1-9.
110. Zhuang B, Luo X, Rao H, Li Q, Liu X, Qi H. Expression and significance of SATB1 and wnt/ β -catenin signaling molecule in the placenta of preeclampsia, *Zhonghua fu chan ke za zhi*, 2015, 50(4): 283-290.
111. Rao H, Bai Y, Li Q, Zhuang B, Yuan Y, Liu Y, Qi H. SATB1 downregulation induced by oxidative stress participates in trophoblast invasion by regulating β -catenin. *Biology of Reproduction*, 2018, 98(6): 810-820.
112. Rao H, Bai Y, Zhang F, Li Q, Zhuang B, Luo X, et al. The role of SATB1 in HTR8/SVneo cells and pathological mechanism of preeclampsia, *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 2019, 32(12):2069–2078.
113. Wu Q, Wu G, Li J X. Effect of hypoxia on expression of placental trophoblast cells SATB1 and β -catenin and its correlation with the pathogenesis of preeclampsia, *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 2016, 9(6): 567-571
114. Chen Y, Zhang Y, Deng Q, Shan N, Peng W, Luo X, Qi H. Wnt5a inhibited human trophoblast cell line HTR8/SVneo invasion: implications for early placentation and preeclampsia, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2016, 29(21): 3532-3538.
115. Zhuang B, Luo X, Rao H, Li Q, Shan N, Liu X, Qi H. Oxidative stress-induced C/EBP β inhibits β -catenin signaling molecule involving in the pathology of preeclampsia, *Placenta*, 2015, 36(8): 839-46.

116. Wang X, Zhang Z, Zeng X, Wang J, Zhang L, Song W, Shi Y. Wnt/ β -catenin signaling pathway in severe preeclampsia, *Journal of molecular histology*, 2018, 49(3): 317-27.
117. Gupta SK, Malhotra SS, Malik A, Verma S, Chaudhary P. Cell Signaling Pathways Involved During Invasion and Syncytialization of Trophoblast Cells, *American Journal of Reproductive Immunology*, 2016, 75(3):361–71.

