

## Preeklampsiye Bağlı Plasental Değişikliklerin İmmunohistokimyasal İncelenmesi

### Investigation of Preeclampsia Binded Plasental Changes Immunohistochemically

Esra ASLAN<sup>1</sup> , Güneş ÖZDOĞAN<sup>2</sup> , Mahmut ONCUL<sup>3</sup> , Abdullah TÜTEN<sup>3</sup> , Mehmet Bilgehan PEKTAŞ<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye

<sup>2</sup>Marmara Üniversitesi, Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ÜYTE Merkezi, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Fatih, İstanbul, Türkiye

<sup>4</sup>Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye



#### Öz

**AMAÇ:** Preeklampsi, gebeliğin 20. haftasından sonra ortaya çıkan patogenezi hala tam anlaşılamamış hipertansiyon, proteinüri ile karakterize multisistemik bir sendromdur. Bu çalışmada, preeklampsi patogenezinde önemli rollere sahip olduğu düşünülen oksidatif stres mekanizmasının aydınlatılmasına yardımcı olabilmek için angiyojenezde majör rolü olan, endotel fonksiyon bozukluğu ve endotel fonksiyonunu koruyucu olduğu düşünülen VEGF-A (Vasküler endotelial büyüme faktörü-A) ve oksidatif stresin birçok aşamasında farklı işlevleri olan HSP90 (ısı şoku proteini90) ile preeklampsi plasentalardaki değişiklikleri immünohistokimyasal olarak incelemeyi amaçladık.

**GEREÇ ve YÖNTEMLER:** Doku örnekleri vaka grubunda 10 preeklampsi gebeden ve kontrol grubunda ise 10 sağlıklı gebeden alındı. Gebelerin yaş, gravida ve parite gibi bilgileri veri olarak alındı. Kontrol grubu ve preeklampsi gebelerden alınan örnekler histokimyasal, immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik yöntemlerle değerlendirildi.

**BULGULAR:** Değerlendirmeler sonucu, preeklampsi gebelerin plasenta dokularında serbest villus sayısında azalma, villuslardaki fetal kapiller sayısında azalma, fetomaternal bariyerlerin morfolojik yetersizliği, villus stromasında kolajen artması, sinsisyotrofoblast bazal membranında kalınlaşma gibi histolojik farklılıklar gözlenmiştir. Bununla birlikte preeklampsi gebelerde plasental VEGF-A immünreaktivitesinin kontrole göre azaldığı, HSP90'ın ise arttığı saptanmıştır.

**SONUÇ:** Bu sonuçlar, her iki endojen molekülün de preeklampsi patogenezinde oldukça önemli rollere sahip olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Preeklampsi, plasenta, immünohistokimya, VEGF-A, HSP90

#### Abstract

**OBJECTIVE:** Preeclampsia is a multisystemic syndrome characterized by hypertension, proteinuria, which appears after the 20th week of pregnancy. Its pathogenesis is still poorly understood. VEGF-A (Vascular endothelial growth factor-A) is thought to play a major role in angiogenesis and is protective of endothelial dysfunction and endothelial function and HSP90 (Heat shock protein90) has different functions at many stages of oxidative stress. In this study, we aimed to investigate changes in preeclamptic placenta immunohistochemically with VEGF-A and HSP90 to help elucidate the oxidative stress mechanism, which is thought to have important roles in the pathogenesis of preeclampsia.

**MATERIALS AND METHODS:** Tissue samples were taken from 10 pregnant women with preeclampsia in the case group and 10 healthy pregnant women in the control group. Information such as age, gravida and parity of pregnant women were taken as data. Samples from control group and preeclampsia group were evaluated by histochemical, immunohistochemical and electron microscopic methods.

**RESULTS:** As a result of the evaluations, histological differences such as decrease in the number of free villi in placental tissues, decrease in the number of fetal capillaries in villus, decrease in the number of fetal capillaries in the villi, and thickening in the syncytiotrophoblast basement membrane were observed. However, plasental VEGF-A immunoreactivity decreased and HSP90 increased in preeclamptic group compared to control group.

**CONCLUSION:** These results show that both endogenous molecules have very important roles in the pathogenesis of preeclampsia.

**Keywords:** Preeclampsia, placenta, immunohistochemistry, VEGF-A, HSP90

#### GİRİŞ

Tüm gebeliklerin %6-8'inde görülen hipertansiyon bozukluklar fetal-maternal morbidite ve mortalitenin önemli sebeplerindendir ve gebeliğe bağlı anne ölümlerinin yaklaşık %15'ini

oluşturmaktadır (1). Preeklampsi, 20 haftalık gebeliğin ardından yeni başlayan hipertansiyon ve proteinüri ile kendini gösteren sistemik bir sendromdur (2). Gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere her yıl dünya çapında altmışbinin

üstünde anne ölümü preeklampsiden kaynaklanmaktadır (3). Gebeliğe özgü bir hastalık olan preeklampsi doğum sonrası ortadan kalkmaktadır (4). Takip ve tedaviden yararlanabilecek vakaları belirlemek için hangi hastaların preeklampsi gelişimi açısından riskli olduğunu belirleyebilmek önemlidir, fakat preeklampsi patogenezi hala tam olarak anlaşılammıştır. Literatüre göre preeklampsinin plasental mikro dolaşımdaki değişikliklerden kaynaklandığı ifade edilmektedir (5). Maternal endometriyal spiral arterlerin yetersiz trofoblastik invazyonu sonucu düşük dirençli uteroplental dolaşım gelişimindeki başarısızlık, yetersiz plasentasyona neden olmaktadır (6).

VEGF-A, vasküler endotelial büyüme faktörleri ailesinden glikozillenmiş bir glikoprotein ve endotelial hücreler için seçici bir mitojendir. İnsan plasentasında bulunan VEGF-A, anjiyogenez ve mikrovasküler permeabilite kontrolünde önemli role sahiptir. Maternal VEGF serum seviyeleri gebeliğin ilk yarısında endovasküler trofoblast invazyonu ve buna desiduanın/myometriyumun cevabı ile eşzamanlı yükselir. Preeklampsili hastalarda uteroplental damar direncine paralel olarak VEGF düzeylerinin de yükseldiği tespit edilmiştir. Buna karşın uteroplental kan akımını normale çevirmeye çalışan bir dengeleyici mekanizma olduğu düşünülmektedir (7).

Serbest radikaller bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron içeren, reaktif ve kısa ömürlü moleküllerdir. Bu moleküller, hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de ilaçlar ve zararlı kimyasalların etkisiyle oluşabilmektedir (8).

HSP ailesi strese yanıt olarak düzenlenen şaperonlardandır. Protein katlanması, protein yıkımı ve tümör büyümesi gibi olaylarda etkili olduğu düşünülen HSP90 ise birçok çalışmada araştırılmıştır (9,10). Preeklampside HSP90'ın rolünü araştırılan yeterli düzeyde çalışma bulunmamakla birlikte, bir çalışmada

preeklampsili hastalarda HSP90 seviyesinin arttığı saptanmıştır (10). Bazı klinik çalışmalarda preeklampsili hastaların plasental VEGF-A ekspresyonunun arttığı (11,12), bazılarında ise azaldığı (13,14) gösterilmiştir. HSP seviyelerinin de preeklampside koruyucu olarak arttığı düşünülmekle beraber yapılan araştırmalar sınırlı sayıdadır (15).

Bu çalışmada, preeklampsinin patogenezinde önemli yere sahip olan endotel fonksiyon bozukluğu ve buna bağlı oluşan oksidatif stres mekanizmasının aydınlatılmasına yardımcı olabilmeyi amaçladık. Bu amaçla anjiyogenezde majör rolü olan VEGF-A ve oksidatif stresin birçok aşamasında farklı işlevleri olan HSP90'ın etkinliğini belirleyebilmek amacıyla preeklampstik plasentalardaki değişiklikleri histokimyasal, immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik yöntemlerle inceledik.

## GEREÇ ve YÖNTEMLER

Kütahya Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (B.30.2. İST.0.30.90.00/27753) onay almıştır. Araştırma için kullanılan plasenta örnekleri İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan aydınlatılmış onam formunu okuyup imzalayarak katılmak istemiş olan gebelerden temin edilmiştir. Sağlıklı gebelerden normal doğum veya sezaryen esnasında alınmış olan plasentalar kontrol grubu olarak (n=10), preeklampstik gebelerden alınanlar ise vaka grubu (n=10) olarak çalışmaya dahil edildi (Tablo 1).

Preeklampsi tanısı için ACOG preeklampsi kriterleri kullanıldı. Preeklampsi tanısı, gebeliğin 20. haftasından sonra kan basıncının 140/90 mmHg ve üstüne çıkması ile 0.3 g/24 saat ve üstü proteinüri senkronizasyonu ile konuldu. Çalışmada çoğul gebelikler, gebelik öncesi ya da gestasyonel diabetes mellitus, sigara, kronik hipertansiyon, polihidroamnios, önceki böbrek hastalıkları ve akut ya da kronik inflamasyonu olan vakalar dışlanmıştır.

**Tablo 1.** Hastaların demografik özellikleri ve klinik verileri

	Kontrol (Ort ±SD)	Preeklampsi (Ort ±SD)
Yaş	28,10±4,280	31,90±5,666
Gestasyonel hafta (gün)	269,60±10,080	224,30±25,377
Gravida	2,30±1,252	2,00±0,943
Parite	1,10±1,287	0,50±0,527
Abortus	0,20±,422	0,30±0,483
Doğum kilosu (gr)	3315,00±576,623	1329,00±505,359
SKB	110,00±11,547	155,70±9,569
DKB	74,50±7,619	102±12,293
Proteinüri (mg/gün)	-	2541,67±1489,131

Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmektedir. SKB – Sistolik kan basıncı; DKB – Diastolik kan basıncı

### Histokimyasal Teknikler

Preeklampitik ve sağlıklı gebelerden alınan plasenta dokuları serum fizyolojikle yıkandıktan sonra %10'luk nötral formalinde tespit edildi. Daha sonra rutin histolojik doku takibi yapılarak parafin bloklar elde edildi. Parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler klasik ve pozitif şarjlı lamlara alındı. Doku kesitlerine Hematoksilin-Eozin, Masson-Trikrom ve immunohistokimyasal boyama yöntemleri uygulandı.

### İmmünohistokimyasal Boyama

Kesitler, deparafinize edildikten sonra inen etil alkol serilerinden (%100-%70) geçirilip distile suya alındı. Kesitler Unmasking solüsyonu ile mikrodalgada 3x5 dk. antijen retrieval işlemine

tabi tutuldu. Örneklere endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metanol ile muamele edildi. Ardından primer antikorlar (VEGF-A, sc-152 Santa Cruz Biotechnology, 1/100, HSP 90 sc-13119 Santa Cruz Biotechnology 1/100) damlatılarak bir gece buzdolabında +4°C'de nemli ortamda inkübe edildi. Ertesi gün Histostain-Plus Bulk Kit (Histostain®-Plus Bulk Kit, İnvitrogen®2<sup>nd</sup> Generation, LAB-SA Detection System) sekonder antikor kiti kullanılarak boyama tamamlandı. AEC kullanılarak renklendirildi ve Mayer's hematoksilinle zıt boyama yapılarak su bazlı kapaticıyla kapatıldı.

### Görüntü Analizi

Rastgele seçilen beş alanda boyanma derecesi skorlaması yapılarak en yüksek skorlu alan tespit edildi. Her iki grup içinde, x40 büyütme alanında en az 100 hücre işaretlendi. Kesitlerde boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma derecesinin kriter olarak alındığı semikantitatif bir yöntemle skorlama yapıldı. Boyanma derecesi: 0 (boyanma yok), +1 (zayıf boyanma), +2 (orta boyanma), +3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirildi. Her kesit için immünohistokimyasal boyanma skorlaması, HScore adı verilen ve (I+1) x (PC), (I: boyanmanın derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi) formülüyle hesaplanan bir skorlama kullanılarak yapıldı (16).

### Ultrastrüktürel Yöntemler

Preeklampitik gebelerden doğum esnasında elde edilen dokuların transmisyon elektron mikroskopu incelemeleri için, pH'ı 7.3 olan Millonig fosfat tampon içerisindeki %3'lük glutaraldehit tespit sıvısında, +4°C de buzdolabında 2-4 saat tespit edildi. Sertleşen dokular 1 mm<sup>3</sup>'lük parçalara küçültülerek tekrar Millonig fosfat tamponda 15 dk. bekletildi. Yıkandıktan sonra %1'lik osmiyum tetroksitle (O<sub>5</sub>O<sub>4</sub>) 1 saat ikinci tespit yapıldı. 1 saat sonunda dokular 15 dakika aynı tampon içerisinde yıkandı ve dehidratasyon için %10, %30, %50, %70, %80, %96'lık etil alkollerde 10'ar dakika, %100 etil alkolde 2 kez 20'şer dakika muamele edildi.

Ardından 2 kez 15'er dakika propilenoksitte bekletilen dokular, 1/1 propilen + aralditte 1 saat, 1/3 propilen oksit + araldit karışımından 1 saat geçirilerek, gömme materyali olan saf araldite alındı ve bir gece 45°C'lik etüvde bekletildi. Örnekler ertesi gün içlerine saf araldit konulan plastik kaplara gömüldü. 60°C'lik etüvde 48 saat bırakılarak polarize olmaları sağlandı. Elde edilen elektron mikroskobu bloklarından ultramikrotomda (C. Reichert Austria) cam bıçaklarla önce 0,5 µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Bu yarı ince kesitler toluidin blue ile boyanarak istenilen bölge tespit edildikten sonra, 60-70 nm kalınlığında ince kesitler bakır gridler üzerine alındı. Bu ince kesitler önce %70'lik etanolle hazırlanmış doymuş uronil asetat ve sonra Reynold'un kurşun sıratı ile boyandı. Elde edilen kesitler elektron mikroskobu (Jeol Jem1011) ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

### İstatistiksel Yöntemler

Kontrol vakalarının ve preeklampitik gebelerin VEGF ve HSP90 immünreaktivitelerinin istatistiksel analizinde ve tüm işlemlerde SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanıldı. Parametrelerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile değerlendirildi. İstatistiksel analiz için Mann-Whitney U testi ve tanımlayıcı analizler yapıldı. \* Kontrolde göre anlamlılığı ifade etmektedir.  $p < 0,05$  anlamlı olarak kabul edildi.

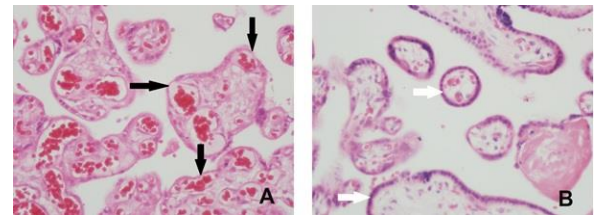
## BULGULAR

### Işık Mikroskopi Bulguları

Hematoksilen-Eozinle boyanan kesitlerde plasenta koryon villusları morfolojik olarak incelendi. Kalitatif olarak yapılan değerlendirmede, kontrol grubu gebelerin plasentalarında serbest villus sayısının maternal taraftan fetal tarafa doğru gittikçe artış gösterdiği ve sayıca iyi olduğu tespit edildi. Villusların etrafını çeviren sinsityotrofoblast tabakası düzenli ve ince bir tabaka olarak gözlemlendi.

Sinsityal düğüm ve sinsityal nükleer zincir yapıları oldukça az olarak izlendi. Villuslardaki fetal kapillerler villus stromasına dağılmış halde ve sayıca fazla olarak görüldü. Kapillerlerin periferde yakın yerleşmiş olanların fetomaternal bariyeri oluşturduğu ve fetomaternal bariyerlerin düzgün ve ince bir şekilde oluştuğu, bununla beraber bariyer sayısının çokluğu izlendi. Masson boyalı kesitlerde villus stroması değerlendirilerek kolajenin terminal villuslarda embriyonal bağ doku özellikli dağınık ve gevşek bir şekilde yerleştiği gözlemlendi. Sinsityotrofoblast-fetal endotel arasında çok dar bağ doku tespit edildi (Resim 1A, Resim 2A).

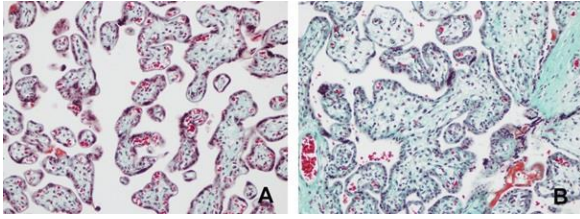
Preeklampitik gebelerin plasentalarına bakıldığında ise villusların görüntü olarak çaplarının küçük, lümenlerinin daha dar ve sayıca az olduğu görüldü. İntervillöz aralıkların bazı vakalarda oldukça daralmış durumda olduğu gözlemlendi. Sinsityotrofoblast tabakasında belirgin bir sinsityal nod ve villusların etrafında nükleer zincir sayısında artış görüldü. Fetal kapiller sayısının azaldığı, fetomaternal bariyer sayısının azlığı ve kalınlaştığı saptandı. İntervillöz aralık ve kapiller arasında oluşacak olan fetomaternal bariyer arasına sinsityotrofoblast tabakasının yaptığı nükleer zincirlerin girdiği çok sayıda alan izlendi. Kapillerler sayıca az olmakla birlikte bazı vakalarda lümenleri daralmış ve büzülmüş durumdaydı. Venlerin bir kısmında dilatasyon mevcut idi. Bazı vakalarda normal sayıda kapiller görülmesine rağmen bunların dar çaplı, fonksiyonel olmayan ve fetomaternal bariyer oluşturma kapasitesinin az olduğu saptandı. Terminal villöz stromanın kolajenden zengin olduğu görüldü (Resim 1B, Resim 2B).



**Resim 1.A:** Kontrol grubu plasenta görüntüsü. Çok sayıda villus, geniş intervillöz aralık ve başarılı fetomaternal bariyer (siyah ok), görülmektedir; **B:** Preeklampsi grubundan fotoğraflanmış plasental villus kesiti. Nükleer zincirler



(beyaz ok) tarafından oluş.

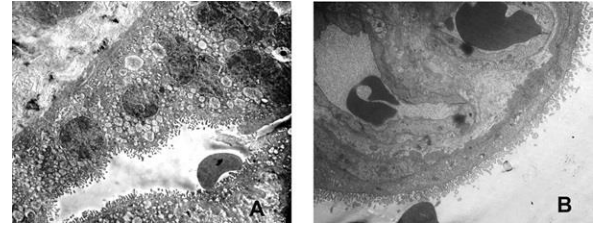


**Resim 2.A:** Kontrol grubundan plasental villus kesit görüntüsü. Dağınık ve gevşek villöz stroma, plasental bariyerler ve çok sayıda fetal damar izlenmektedir; **B:** Preeklampsi grubundan plasental villus kesit görüntüsü. Artmış villöz stroma görülmektedir (x200, Masson-Trikrom).

### Elektron Mikroskopi Bulguları

Kontrol grubu gebelerin sinsityotrofoblast sitoplazmalarında, küçük ve normal görünümü granüllü endoplazmik retikulum (GER), normal görünümü mitokondriyonlar ve irili ufaklı veziküller gözlemlendi. Yine kontrol grubu bazal membranları ince ve düzgün olarak izlendi. Villöz stromadaki kolajen miktarı villusların serbest yüzlerine yakın kısımlarda az iken, demirleme villuslarında biraz daha yoğun olarak görüldü. Villuslardaki mikrovillinin düzgün şekilli ve sayıca iyi olduğu tespit edildi (Resim 3A).

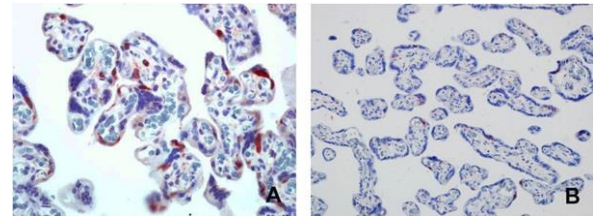
Preeklampsi gebelere bakıldığında ise genişlemiş ve şişmiş şekilde görünen GER sisternaları izlendi. Pinositotik vezikül sayısında azalma ve villöz stromada kolajen miktarında belirgin bir artış olduğu görüldü. Kontrol grubuna kıyasla bazal laminalarda belirgin bir kalınlık artışı görüldü. Sinsityal nükleer zincir ve sinsityal nod sayısında ayrıca sitotrofoblast hücre sayısında artış saptandı. Kan damarlarının sayıca az olduğu ve mevcut damarların çoğunun eritrosit rulo ile tıkalı olduğu görüldü. Ayrıca sinsityotrofoblast tabakasının yüzeyinde fibrin birikimlerine rastlandı. Bu bölgelerde belirgin mikrovillus kayıpları gözlemlendi. Villuslardaki mikrovilli yer yer küntleşmiş ve şişkinleşmiş olarak görüldü (Resim 3B).



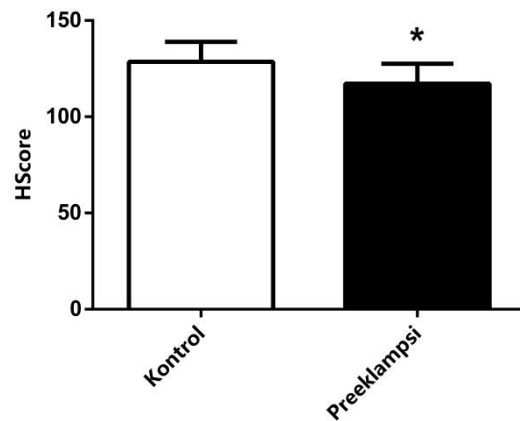
**Resim 3.A:** Kontrol grubu koryon villuslarından bir bölge. Sinsityotrofoblast apikalinde sık mikrovillüsler (siyah ok) ve pek çok endositoitik vezikül (yıldız) izlenmektedir (x4000); **B:** Preeklampsi grubundan bir villus kesiti. Kısalmış ve şişkinleşmiş microvilli (beyaz ok), kalınlaşmış ve kıvrılmış bazal membran, az sayıdaki pinositotik veziküller görülmektedir (x6000).

### İmmunohistokimya Bulguları

Sitoplazmik VEGF-A ekspresyonu trofoblastlarda, az sayıda villus mezankimal bağ doku hücrelerinde ve kapiller endotelinde saptandı. Her iki grupta da plasental villus stromasında ve kapiller endotelinde boyanma oldukça az veya hiç yoktu. Diğer yandan villus etrafındaki trofoblast hücrelerinde her iki grupta da şiddetli, orta ve hafif şiddette ekspresyon gözlemlendi. VEGF-A ekspresyonunun preeklampsi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi (Resim 4, Figür 1).

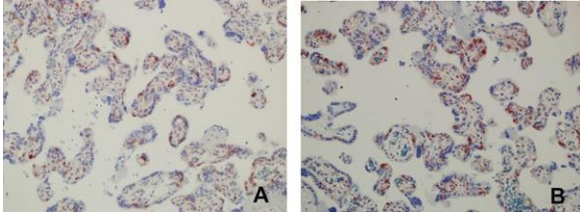


**Resim 4.A:** Kontrol grubu plasentalarda VEGF-A immünreaktivitesi (x400). **B:** Preeklampsi grubundaki plasentalarda VEGF-A immünreaktivitesi (x200).

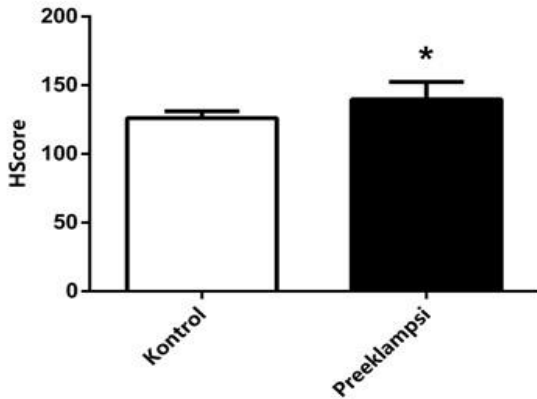


**Figür 1.** VEGF-A HScore sonuçları, n=10, \* kontrole göre anlamlılığı (p<0,05) ifade etmektedir.

HSP90 immunreaktivitesi sitoplazmik olarak trofoblastlarda, villus mezenkimal bağ doku hücrelerinde ve kapiller endotelinde saptandı. Villus stromal hücrelerinde ve kapiller endotelinde her iki grupta hafif boyanma veya hiç boyanma olmadığı görüldü. Villus etrafındaki trofoblast hücrelerinde her iki grupta da şiddetli, orta, hafif şiddette boyanma tespit edildi. Boyanma kontrol grubuna göre preeklampatik grupta anlamlı olarak yüksek bulundu (Resim 5, Figür 2).



**Resim 5.A:** Kontrol grubu plasentalarda HSP90 immunreaktivitesi (x200). **B:** Preeklampsi grubundaki gebelerin plasentalarında HSP90 immunreaktivitesi (x200).



**Figür 2.** HSP90 HScore sonuçları, n=10, \* kontrole göre anlamlılığı ( $p<0,05$ ) ifade etmektedir.

## TARTIŞMA

Preeklampsinin sebeplerinden olan endotel fonksiyon bozukluğu ve buna bağlı oluşan oksidatif stres mekanizmasının aydınlatılmasına yardımcı olabilmek için anjiyogenezde majör rolü olan VEGF-A ve birçok farklı işleve sahip olan HSP90'ın ifade düzeylerini ve plasentalardaki morfolojik değişiklikleri inceleyerek preeklampsi patogenezine katkıda bulunmayı amaçladık.

Bir çalışmada, terminal villuslarda büyüme ve farklılaşma yetersizliği, fetal kapiller dallanmada

azalma izlenmiş, VEGF düzeylerinin bu morfolojik değişikliklerle ilişkili olduğu ifade edilmiştir (17). Bu çalışmada da görülen fetal kapiller sayısında azalma, intervillöz aralıklarda daralma önceki çalışmayı destekler niteliktedir. Bu bulgular bize bunun sebebinin gelişim bozukluğuna bağlı olabileceğini, intervillöz aralık daralmasına bağlı olarak buradan geçen kan miktarının azaldığını ve azalan villus sayısının fetusun oksijenlenmesinde yetersizliğe neden olabileceğini düşündürmüştür. Koryon villuslarını çevreleyen sinsityotrofoblast hücrelerinin küme yaparak oluşturduğu sinsityal düğüm sayısının preeklampatik grupta kontrol grubuna göre fazla olduğu izlenmiş ve elektron mikroskopunda sinsityotrofoblast bazal laminasının kalınlaştığı tespit edilmiştir. Bulgularımız, preeklampatik vakalarda sinsityal düğüm sayısının arttığı ve bazal membranda belirgin bir kalınlaşma görülen bir çalışmayı (18) desteklemektedir. Yine elektron mikroskopunda preeklampatik plasentalarda sinsityotrofoblast GER sisternalarında gözlemediğimiz genişlemeler ve şişmeler ayrıca sinsityotrofoblast içinde görülen iri vakuoller ve azalmış olan pinositotik vesiküller, hem ışık hem de elektron mikroskopik olarak preeklampsi plasentaların villöz stromasında rastlanılan yoğun kollajen lifler, Brunori ve arkadaşlarının daha önce bildirdiği bu yöndeki bulgularını destekler niteliktedir (19). GER'deki bu farklılıkların bazal membran kalınlığında artışa sebep olarak plasental bariyerin fonksiyonunu tam olarak yerine getiremediğini düşündürmektedir. Sinsityotrofoblast içinde görülen iri vakuoller ve azalmış olan pinositotik vesiküller, sinsityotrofoblastın transport özelliğinde bir azalma ve kolajen artışının da anne ve bebek arasında yetersiz bir alışveriş ile ilişkili olabileceğinin göstergesi olabilir. Bununla birlikte, preeklampatik hastalarda görülen sinsityotrofoblast tabakası üzerindeki fibrin artışı ile sinsityotrofoblast tabakasının oluşturduğu nükleer zincir sayısındaki yükselmenin de plasental bariyerin görevini yerine getirememesiyle ilişkili olduğunu göstermektedir.

Plasenta gebelik boyunca anjiyogenik büyüme faktörlerinden VEGF ailesini eksprese edebilir. Bazı yayınlar villöz ve ekstrasvillöz trofoblastlar, Hofbauer hücreleri ve anne desidual hücrelerinin VEGF-A mRNA ekspresyonuna neden olduğunu bildirmiştir (20, 21,22). Benzer çalışmalarda ise trofoblastlar haricinde villus mezenkimi, desidual makrofajlar ve desidual glandlar tarafından eksprese edildiği gösterilmiştir (23, 24). Bu çalışmada ise VEGF-A'nın protein ekspresyonunu trofoblastlarda ve çok az miktarda da villus mezenkimi ve kapiller endotelinde lokalize olduğu saptanmıştır.

Anjiyogenik faktörler preeklampsi gibi durumlar ile komplike gebeliklerin sürecinde invazyonu etkileyebilirler. Böyle durumlarda invazyon bozulur ve VEGF, PIGF, VEGF-R1 ve Ang-2 düzeyleri azalır (13, 25-27). Tersine, hipoksi preeklampsiyle ilişkili olarak VEGF ve anjiyopoetinler gibi anjiyogenik faktörlerin lokal aşırı ekspresyonu sonucu lokal psödoaskülojenize sebep olabilir (28). Bozulmuş trofoblast invazyonu ve yetersiz maternal spiral arter şekillenmesi dahil olmak üzere erken plasenta kusurları, preeklampside gösterilmiştir (29). Normal plasental vaskülojeniz ve anjiyogeniz sırasında, sitotrofoblastlardaki integrin  $\alpha 6\beta 4$ , integrin  $\alpha 5\beta 6$  ve epitelyal kadherin (E-Kadherin) azalırken, integrin  $\alpha 1\beta 1$ , integrin  $\alpha 5\beta 3$ , vasküler endotelial kadherin, vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve platelet endotelial hücre adezyon molekülü (PECAM-1/CD31) artmaktadır. Bununla birlikte preeklampitik plasentanın adezyon moleküllerinden integrin  $\alpha 6\beta 4$ , integrin  $\alpha 5\beta 6$  ve E-Kadherin'i koruduğu ve en invaziv ve en çok farklılaşmış trofoblastlar tarafından normalde eksprese edilen integrin  $\alpha 1\beta 1$ , integrin  $\alpha 5\beta 3$ , vasküler endotelial kadherin, VCAM-1 ve PECAM-1'in artışında başarısızlık olduğu daha önce yapılmış olan çalışmalarda da belirtilmiştir (30, 31). Sonuç olarak sitotrofoblastların vasküler bir fenotipe geçişindeki yetersizlik invazyona izin veren moleküller ile sınırlayan moleküllerin dengesini bozarak, sıg endovasküler invazyona

sebebiyet verir (31). Maternal-fetal arayüzündeki VEGF aile üyelerinin normal repertuarının yokluğunun preeklampside gözlenen sitotrofoblast farklılaşmasındaki kusurlara neden olabileceği ifade edilmektedir (32). Normotansif gebelikler ile karşılaştırıldığında, preeklampside immunohistokimyasal olarak plasental VEGF-A proteininin ekspresyonunun azaldığı (13, 14, 33); bazı çalışmalarda ise arttığı bildirilmiştir (11, 12, 34). Bununla birlikte, preeklampitik plasentalarda VEGF-A mRNA düzeylerinin arttığı (35), azaldığı (17) ve değişmediğini (36) gösteren çalışmalar da vardır. Bozulmuş invazyon ve spiral arter şekillenmesinin defektif utero-plasental dolaşıma ve daha sonra plasental iskemiye yol açtığı gösterilmiştir (37). Burton ve arkadaşları tarafından şekillenmenin başarısızlığı sonucu koryon villuslarında oluşan hasar modellenmiş ve sonuçları tarif edilmiştir (38). Oksidatif stres ve inflamasyon gibi çeşitli stres ajanlarının preeklampsinin klinik özelliklerine yol açan maternal dolaşıma girerek, endotel disfonksiyonunu artıran çözünebilir faktörlerin salınımına katkıda bulunduğu ifade edilmektedir (32). Maynard ve arkadaşları maternal plazmada dolaşan sFLT-1'in artmış plasental ekspresyonunun VEGF-A ve PIGF'yi antagonize ederek, endotel disfonksiyonuna neden olduğunu göstermiştir (39). sFLT-1, VEGF-A'ya büyük bir afiniteyle bağlanır ve bunun sonucu düşük serbest VEGF-A serum seviyeleri ortaya çıkar (32). Reuvekamp ve arkadaşları, preeklampside serum VEGF-A seviyelerinin azaldığını tespit etmişlerdir (26). Polliotti ve arkadaşları da ağır, erken başlangıçlı preeklampsinin tahmini için umut verici bir gösterge olarak VEGF-A'yı önermiştir (40). Yakın dönemde preeklampsi tedavisinde VEGF ailesinin potansiyel kullanımı incelenmeye başlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, sFlt-1'in aşırı adenoviral ekspresyonuyla (Adv-sFLT-1) indüklenen gebe sıçanlarda bir preeklampsi modeli oluşturulmuş ve Adv-sFLT-1 ile enfekte edilen sıçanlarda hipertansiyon ve proteüri gözlenmiştir. Bu sıçanlarda gebe kadınlarda preeklampsi ile ilişkili

böbrek lezyonlarını anımsatan glomerüler endotelyozis gösterilmiştir. Rekombinant VEGF-A121 uygulanması sonucu sistolik kan basıncı ve proteinürde azalma ve glomerüler endotelyoziste bir iyileşme gözlenmiştir (41). Yapılan birçok çalışmada, serum serbest VEGF düzeyleri preeklampside belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir (26, 42). Bu nedenle her ne kadar total VEGF seviyelerinin preeklampside artmış olabileceği söylene de fizyolojik olarak aktif konsantrasyonlarının azalabileceği belirtilmiştir (34,43,44). Bu çalışmada, preeklampsili plasental VEGF-A ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. VEGF-A immunreaktivitesinin az olması, sığ trofoblastik endovasküler invazyonu ve onun sebep olduğu anjiyogenez azalışını ve aynı zamanda hedef molekülün VEGF-A olduğunu düşündürmüştür.

HSP ailesi, strese cevaben veya stres sonrası eksprese edilen bir grup tetiklenebilen proteinlerdir (45). HSPlerin çeşitli sitotoksik ajanlardan hücreleri koruduğu son yıllarda anlaşılmıştır. Yapısal olarak eksprese edilen proteinler, diğer hücrel proteinler için şaperon görevi görür. Bununla birlikte oluşan polipeptidin erken katlanmasını önler ve proteinlerin organellere taşınmasını sağlar (46). Stres proteinlerinin seviyesindeki artışın tetiklenmesi, hücrelerin stres ajanlarına maruz kalmasıyla ilişkilidir. Tetiklenmiş stres proteinleri protein denatürasyonunu ve/veya hasarın onarılmasını sağlayarak, stres ile ortaya çıkan hasardan hücreleri koruyabilir (15). İntervillöz oksijen konsantrasyonlarındaki büyük değişimler ROS üretimini arttırırken, iskemik reperfüzyona yol açar (47). Oksidatif stres koşullarında reaktif oksijen türlerinden süperoksit anyone, uygun NO(nitrik oksit) ile reaksiyona girerek dokularda peroksinitrit üretimini arttırır (48). Bazı çalışmalarda, preeklampitik kadınlarda antioksidan kapasitesindeki düşüş, SOD aktivitesinin azalmasına ve yüksek peroksinitrit seviyelerine bağlanmıştır (49). HSPlerin fazla ekspresyonu fizyolojik stres sırasında hücrelerin korunmasında önemlidir. Gebeliğin devam

etmesinde hayati öneme sahip metabolik olarak aktif olan dokulardan plasenta dokusu, preeklampside fazla strese maruz kaldığı ve HSP70 üretimindeki artışın da sebebi olarak belirtilmiştir (15). NO maternal kan damarlarında güçlü bir etkiye sahiptir ve üretimi kısmen HSP90 ile kontrol edilir (50). HSP90'ın endotel hücrelerinde endotel nitrik oksit sentaza (eNOS) bağlanmasının enzim aktivitesini arttırdığı ve bunun NO'nun biyolojik varlığının ve vasküler homeostazın korunmasında hücre seviyesinde bir öneme sahip olduğu kaydedilmiştir (50). HSPlerin hücre kaderini belirleme kabiliyetleri preeklampsisi gibi patolojik durumlarda önem arz etmektedir. HSP90'ın endotel fonksiyonda da koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir (51). Bu çalışmada, preeklampsisi patogenezinde HSP90'ın rolü olup olmadığını araştırmak için HSP90 immunreaktivitesinin değerlendirilmiştir; preeklampsili plasental HSP90 ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.

Preeklampsisi oluşum mekanizmasında anjiyogenik faktörlerin yetersiz salınması rol oynamaktadır. Dokulara gelen kan akımı azaldığından reaktif olarak anjiyogenik faktörlerin artışı da görülebilir. Bu sebeple yapılan çalışmalarda preeklampsideki VEGF-A'nın artış artmadığına yönelik kesin bir sonuç bulunmamaktadır. Bu reaktif anjiyogenezin artışına rağmen hipoksi sonucunda hücreyi stresten korumaya yönelik HSP90 gibi dengeleyici mekanizmaların yetersiz kalması sonucu hipoksi, endotelial hasar ve buna bağlı oksijen radikallerinin artması kaçınılmazdır. Preeklampside anjiyogenezin azalması veya yetersiz plasentasyona bağlı hipoksi ve buna bağlı strese cevap olarak HSP90'nin düzeylerinin artması, preeklampsinin bilinen ama tam açıklığa kavuşturulamamış mevcut patogenezinin uyumlu bulunup katkı sağlamıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda geniş olarak preeklampitik plasentaların ışık ve elektron mikroskopik düzeyde ayrıntılı morfolojik analizinin yapılmasıyla birlikte preeklampsisi



patogenezinin moleküler mekanizması henüz açıklığa kavuşturulamamış; anjiyogenezde majör rolü olan VEGF-A'nın immunreaktivitesinin azaldığı ve stress sonucu artan bir molekül olan HSP90'ın hücreyi korumak amacıyla immunreaktivitesinin arttığı, dolayısıyla da her iki molekülün preeklampsi patogenezinde oldukça önemli rollere sahip olduğu belirlenmiştir.

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan yazılı onam alınmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

#### Kısaltmalar:

VEGF-A, Vasküler endotelial büyüme faktörü-A; HSP90, Isi şoku proteini90; ACOG: The American College of Obstetricians and Gynecologists; GER, Granüllü endoplazmik retikulum; PlGF, Plasental büyüme faktörü; VEGF-R1, Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 1; Ang2, Anjiyopoetin-2; PECAM-1, Platelet endotelial hücre adezyon molekülü; VCAM-1, Vasküler hücre adezyon molekülü-1; E-Kadherin, Epitelial kadherin; NO, Nitrik oksit; sFLT-1, Solubl fms benzeri tirozin kinaz-1; eNOS, Endotelial nitrik oksit sentaz.

#### KAYNAKLAR

1. American College of Obstetricians and Gynecologists. Hypertension in pregnancy. ACOG Technical Bulletin No.: 219. Washington, DC: The College; 1996. p. 1-8
2. Am. Coll. Obstet. Gynecol. Comm. Obstet. Pract. 2002. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Obstet. Gynecol. 99: 159-67
3. Hogberg U. The World Health Report 2005: "make every mother and child count" - including Africans. Scand J Public Health, 2005. 33(6): p. 409-11.
4. Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. Pathogenesis of Preeclampsia. Annu Rev Pathol. 2010; 5: 173-92.
5. Kong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by preeclampsia and by small for-gestational age infants. Br J Obstet Gynaecol 1986; 93: 1049-59.
6. Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. Placenta 1980; 1: 3-19
7. Cunningham FG, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hauth JC, Wenstrom KD., Williams Obstetrics 21th edition. 2001: McGRAW-HILL.
8. Cross CE, et al. Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med, 1987. 107(4): p. 526-45.
9. Csermely P, et al. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. Pharmacol Ther, 1998. 79(2): p. 129-68.
10. Padmini E, Venkatraman U and Srinivasan L. Mechanism of JNK signal regulation by placental HSP70 and HSP90 in endothelial cell during preeclampsia. Toxicol Mech Methods, 2012. 22(5): p. 367-74.
11. Simmons LA, et al. Uteroplacental blood flow and placental vascular endothelial growth factor in normotensive and pre-eclamptic pregnancy. BJOG, 2000. 107(5): p. 678-85.
12. Akercan F, et al. The immunohistochemical evaluation of VEGF in placenta biopsies of pregnancies complicated by preeclampsia. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2008. 277(2): p. 109-14.
13. Zhou Y, et al. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. Am J Pathol, 2002. 160(4): p. 1405-23.
14. Cirpan T, et al. Evaluation of VEGF in placental bed biopsies from preeclamptic women by immunohistochemistry. Clin Exp Obstet Gynecol, 2007. 34(4): p. 228-31.
15. Padmini E. Placental Heat Shock Protein 70 Overexpression Confers Resistance Against Oxidative Stress in Preeclampsia. Turk J Med Sci, 2008. 38 (1): p. 27-34.
16. Sahin Z, et al. Distribution of Notch Family Proteins in Intrauterine Growth Restriction and Hypertension Complicated Human Term Placentas. Acta Histochem. 2011; 113(3): 270-6.
17. Cooper JC, et al. VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia. Br J Obstet Gynaecol, 1996. 103(12): p. 1191-6.
18. Saeed I. Histomorphological Changes in Placentae of Pre-Eclamptic Mothers with Reference to Vasculosyncytial Membrane Thickness and Syncytial Knot Formation. Journal of Rawalpindi Medical College (JRM), 2012. 16(1): p. 51-54.
19. de Luca Brunori I, et al. Placental barrier breakage in preeclampsia: ultrastructural evidence. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2005. 118(2): p. 182-9.
20. Clark DE, et al. Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. Human Reproduction, 1996. 11(5): p. 1090-8.
21. Jackson MR, et al. Localization of two angiogenic growth factors (PDEC GF and VEGF) in human placentae

- throughout gestation. *Placenta*, 1994. 15(4): p. 341–53.
22. Schiessl B, et al. Localization of angiogenic growth factors and their receptors in the human placental bed throughout normal human pregnancy. *Placenta*, 2009. 30(1): p. 79–87.
  23. Vuorela P, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biology of Reproduction*, 1997. 56(2): p. 489–94.
  24. Clark DE, et al. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J Endocrinol*, 1998. 159(3): p. 459–67.
  25. Torry DS, et al. Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am J Obstet Gynecol*, 1998. 179(6 Pt 1): p. 1539–44.
  26. Reuvekamp A, et al. Selective deficit of angiogenic growth factors characterises pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, 1999. 106(10): p. 1019–22.
  27. Zhang, EG, et al. The regulation and localization of angiopoietin-1, -2, and their receptor Tie2 in normal and pathologic human placentae. *Molecular Medicine*, 2001. 7(9): p. 624–35.
  28. Wulff C, et al. Angiogenesis during primate placentation in health and disease. *Reproduction*, 2003. 126(5): p. 569–77.
  29. Khong TY, et al. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol*, 1986. 93(10): p. 1049–59.
  30. Zhou Y, Damsky CH and Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest*, 1997. 99(9): p. 2152–64.
  31. Zhou Y, et al. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest*, 1993. 91(3): p. 950–60.
  32. Andraweera PH, Dekker GA and Roberts CT. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Hum Reprod Update*, 2012. 18(4): p. 436–57.
  33. Lyall F, et al. Placental expression of vascular endothelial growth factor in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction does not support placental hypoxia at delivery. *Placenta*, 1997. 18(4): p. 269–76.
  34. Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, Noel A, Schaaps JP, Cabrol D, Frankenne F, Foidart JM (2003) Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *Clin Endocrinol Metab* 88(11): 5555–63
  35. Chung JY, et al. Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(5): p. 2484–90.
  36. Ranheim T, Staff AC, and Henriksen T. VEGF mRNA is unaltered in decidual and placental tissues in preeclampsia at delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2001. 80(2): p.93–8.
  37. Brosens IA, Robertson WB and Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu*, 1972. 1: p. 177–91.
  38. Burton GJ et al., Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*, 2009. 30(6): p. 473–82.
  39. Maynard E, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*, 2003. 111(5): p. 649–58.
  40. Polliotti BM et al. Second-trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, early-onset preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology*, 2003. 101(6): p. 1266–74.
  41. Li Z et al. Recombinant vascular endothelial growth factor 121 attenuates hypertension and improves kidney damage in a rat model of preeclampsia. *Hypertension*, 2007. 50(4): p. 686–92.
  42. Livingston JC et al. Reductions of vascular endothelial growth factor and placental growth factor concentrations in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2000. 183(6): p. 1554–7.
  43. Levine RJ et al., Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*, 2004. 350(7): p. 672–83.
  44. Koga K, Osuga Y, Yoshino O et al. Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003. 88, 2348–2351
  45. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 1988.22:631–677
  46. Hartl FU, Martin J, Neupert W. Protein Folding in the Cell: The Role of Molecular Chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1992; 21: 293–322.
  47. Chappell LC et al. Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet*, 1999. 354(9181): p. 810–6.
  48. Cooke CL and Davidge ST. Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*,

2002. 282(2): p. C395–402.
49. Roggensack AM, Zhang Y and Davidge ST. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension*, 1999. 33(1): p. 83–9.
  50. Garcia-Cardena G, et al. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, 1998. 392(6678): p. 821–4.
  51. Gu Y, et al. Increased superoxide generation and decreased stress protein Hsp90 expression in human umbilical cord vein endothelial cells (HUVECs) from pregnancies complicated by preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*, 2006. 25(3): p. 169–82.