T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MATERNAL HİPOTİROİDİ HASTALARININ PLASENTA DOKUSUNDA FOXP3+ HÜCRELER VE EKSOZOMLARIN İNCELENMESİ

ŞEYDA DEMİR YÜKSEL
ORCID: 0000-0002-7726-996X

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Histoloji ve Embriyoloji Doktora programı

DOKTORA TEZİ

İZMİR
OCAK 2025

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2018970140

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MATERNAL HİPOTİROİDİ HASTALARININ PLASENTA DOKUSUNDA FOXP3+ HÜCRELERVE EKSOZOMLARIN İNCELENMESİ

ŞEYDA DEMİR YÜKSEL
ORCID: 0000-0002-7726-996X

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Histoloji ve Embriyoloji Doktora programı
DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: H. Alper BAĞRIYANIK
ORCID: 0000-0003-4064-7637

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından 223S190 proje numarası ile desteklenmiştir.
İZMİR
OCAK 2025

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2018970140

TEZ KABUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı/Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı öğrencisi Şeyda DEMİR YÜKSEL tarafından hazırlanan "**Maternal Hipotroidi Hastalarının Plasenta Dokusunda FoxP3+ Hücreler ve Eksozomların İncelenmesi** " başlıklı tez çalışması 15/01/25 günü 13:30 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile DOKTORA TEZİ olarak kabul/ret edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof.Dr. Ülker CANKURT
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fak.
Histoloji ve Embriyoloji A.D.
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID: 0000-0001-7801-8946
İMZA

Üye : Prof.Dr. Ş.Esra ERDAL BAĞRIYANIK
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fak.
Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID: 0000-0001-7264-0574
İMZA

Üye :Prof.Dr. Serap CİLAKER MICILI
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fak.
Histoloji ve Embriyoloji A.D.
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID: 0000-0002-9830-0989
İMZA

Üye :Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM
Ege Üniversitesi, Tıp Fak.
Histoloji ve Embriyoloji A.D.
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID: 0000-0003-1914-2503
İMZA

Üye :Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL
Ege Üniversitesi, Tıp Fak.
Histoloji ve Embriyoloji A.D.
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID: 0000-0002-4016-0522
İMZA

Danışman : Prof.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fak.
Histoloji ve Embriyoloji A.D.
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID: 0000-0003-4064-7637
İMZA

Tez hakkında alınan jüri kararı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum "**Maternal Hipotroidi Hastalarının Plasenta Dokusunda FoxP3+ Hücreler ve Eksozomların İncelenmesi** " başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza
Şeyda DEMİR YÜKSEL
…/…/…

TEŞEKKÜR

Çok uzun ve zahmetli bir süreç olan Lisansüstü eğitimimi doktora tezimi tamamlayarak bitirmiş olmanın mutluluğu içindeyim.

Bu zorlu süreçte danışmanlığımı üstlenen, konu seçiminden araştırmanın yönetilmesine kadar beni sınırlamayıp özgür bırakan ama her zaman her durumda yanımda olan, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen Hocam Prof. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK' a çok teşekkür ederim.

Tezimin şekillenmesine gelişmesine yardımda bulunan ve her zaman desteğiyle yanımda olan Prof.Dr.Esra ERDAL hocama ve yine bu süreçte eğitimime katkı sağlayan tüm Hocalarıma, tezimin gelişmesine katkıda bulunan tez jürime teşekkür ederim.

Bu süreçte ortak kaderi, odayı ve hayallerimizi paylaştığımız arkadaşım Dr. Gökçen BİLİCİ GÜLER' e ve arkadaşlarım Dr. Pınar AKOKAY, Dr. Filiz YILMAZ, Burcu BARAN ve Dr. Melek Yeşim AK' a teşekkür ederim.

Ve herzaman her koşulda yanımda olan canım Aileme, Annem Yasemin DEMİR, Babam Akif DEMİR, kardeşim Erkan DEMİR' e ve eşim Erdinç YÜKSEL' e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER **6**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **I**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **II**

GRAFİKLER DİZİNİ ..... **III**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **IV**

ÖZET ..... **V**

ABSTRACT VII

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

1.1. PROBLEMIN TANIMI VE ÖNEMI 1

1.2. ARAŞTIRMANIN AMACI 2

1.3. ARAŞTIRMANIN HIPOTEZLERI 2

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. PLASENTA 3

Plasenta Gelişimi *4*

Feto-maternal Dolaşım *6*

Patolojik Koşullarda Plasenta Histolojisindeki Değişiklikler *8*

2.2. MATERNAL HIPOTIROIDI 9

2.3. FOXP3 (FORKHEAD BOX P3) TRANSKRIPSIYON FAKTÖRÜ 11

Regülatör T Hücreleri *13*

Gebelikte Foxp3 Treg Hücreler ve Feto-maternal İmmüntolerans *14*

Gebelik Patolojilerinde FoxP3+ Treg Hücreleri *16*

2.4. EKSOZOMLAR 18

Plasenta Kaynaklı Eksozomlar *19*

3. GEREÇ VE YÖNTEM 21

3.1. ARAŞTIRMANI TIPI 21

3.2. ARAŞTIRMANIN YERI VE ZAMANI 21

3.3. ARAŞTIRMANIN EVRENI VE ÖRNEKLEMI/ÇALIŞMA GRUPLARI 21

3.4. ÇALIŞMA MATERYALI 22

3.5. ARAŞTIRMANI DEĞIŞKENLERI 22

3.6. VERI TOPLAMA ARAÇLARI 22

İnsan Plasenta Dokusunun Toplanması 22

Plasenta Dokusunun Hazırlanması 22

H&E Boyaması ve Dokuların Histomorfolojik İncelenmesi 23

İmmunohistokimyasal (IHC) Değerlendirmeler 23

İmmünofloresan (IF) Değerlendirmeler 24

ELISA 25

İstatistiksel Analiz 26

3.7. VERILERIN DEĞERLENDIRILMESI 26

3.8. ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI 26

3.9. ETIK KURUL ONAYI 26

4. BULGULAR 27

4.1. MORFOLOJIK DEĞERLENDIRME 27

4.2. HISTOMORFOLOJIK BULGULAR 29

4.3. İMMÜNOHISTOKIMYASAL (IHC) BULGULAR 32

4.4. SERI KESIT YÖNTEMI ILE FOXP3 VE CK7 İMMÜNOHISTOKIMYASAL DEĞERLENDIRMESI 37

4.5. İMMÜNOFLORESAN (IF) DEĞERLENDIRMELERI 40

4.6. PLASENTA DOKUSUNDA FOXP3 VE CD63 PROTEIN MIKTARLARININ ELISA YÖNTEMI ILE DEĞERLENDIRILMESI. 45

5. TARTIŞMA 47

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 53

7. KAYNAKLAR.....54

8. EKLER.....66

Ek 1. Etik Kurul Onayı.....66

Ek 2: Onam Formu.....68

Ek 3: Özgeçmiş.....74

Ek 4: Tez ile ilişkili Yayınlar.....77

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Araştırma planı. 21
Tablo 2: Morfolojik veriler 27
Tablo 3: Histomorfolojik skorlama. 29
Tablo 4. FoxP3 ve CD63 ELISA verileri. 46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Plasenta 3
Şekil 2: İnsan plasenta gelişiminin erken evreleri. 5
Şekil 3: Feto-Maternal Plasental dolaşım 8
Şekil 4: Eksozomların Biyogenezi 19
Şekil 5: Plasenta Dokularının İntravillöz hemoraji, Sinsityal nod ve Kalsifikasyon Kriterleri Bakımından Histomorfolojik İncelenmesi. 30
Şekil 6: Kontrol ve Hipotiroidi plasentalarında FoxP3 immünohistokimyasal işaretlemesi. 35
Şekil 7: Kontrol ve Hipotiroidi plasentalarında koryon villuslarında CD63 immünohistokimyasal işaretlemesi. 36
Şekil 9: Hipotiroidi grubu seri kesitlerde CK7 ve FoxP3 immünohistokimyasal boyanması.. 38
Şekil 10: Hipotiroidi grubu seri kesitlerde CK7 ve FoxP3 immünohistokimyasal boyanması.. 38
Şekil 11: Kontrol grubu seri kesitlerde CK7 ve FoxP3 immünohistokimyasal boyanması. 39
Şekil 12: Kontrol grubu seri kesitlerde CK7 ve FoxP3 immünohistokimyasal boyanması. 40
Şekil 13: Kontrol grubu seri kesitlerde koryon villuslarında CK7 ve FoxP3 immünohistokimyasal boyama.....40
Şekil 14: Kontrol grubu Feto-maternal bölgeyi gösteren kesitlerde CK7 ve FoxP3 immünofloresan görüntüleri (20X)……...41
Şekil 15: Kontrol grubu Feto-maternal bölgeyi gösteren kesitlerde CK7 ve FoxP3 immünofloresan görüntüleri (40X). 42
Şekil 16: Hipotiroidi grubunda desiduada CK7 ve FoxP3 immünofloresan görüntüleri (40X). 443
Şekil 17. Desiduada CK7 ve FoxP3 immünofloresan görüntüleri. (40X). 44

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: Morfolojik veriler. 28
Grafik 2: Histomorfolojik skorlama. 31
Grafik 3: CD63'ün plasenta dokusundaki immünoreaktivite skor grafiği 37
Grafik 4: FoxP3 ve CD63 ELISA sonuç grafiği. 45

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACOG: Amerikan Kadın Doğum Uzmanları ve Jinekologlar Koleji

CK7: Sitokeratin 7

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EMT: Epitel-mezenkimal geçiş

EVT: Ekstravillöz trofoblast

FGR: Fetal büyüme kısıtlaması

FOXP3: Forkhead ailesi transkripsiyon faktörü forkhead box p3

GDM: Gestasyonel diyabette

GLUT: Glukoz taşıyıcı protein

HLA: İnsan lökosit antijeni

ICM: İç hücre kitlesi

IDO: Indolamin 2,3-dioksijenaz

IHC: Immunohistokimya

IF: Immünofloresan

ILV: Intraluminal veziküller

IUGR: Intrauterin gelişim gerilikleri

LE: Luminal epitel

MHC: Majör doku uyumluluğu kompleksini

MVB: Multiveziküler cisim

NK: Doğal öldürücüler

PD-L1: Programlanmış ölüm ligandı

pEXO: Plasenta kaynaklı eksozomlar

TE: Trofoektoderm

TNFα: Tümör nekrosiz faktör

Treg: Regülatör T Hücreler

MATERNAL HİPOTİROİDİ HASTALARININ PLASENTA DOKUSUNDA FOXP3+ HÜCRELER VE EKSOZOMLARIN İNCELENMESİ
Doktora Tezi

Şeyda DEMİR YÜKSEL

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Maternal hipotiroidi, gebelikte tiroid hormon yetersizliği olarak tanımlanır ve popülasyonun %4'ünü etkiler. Tiroid hormonları, fetüsün sağlıklı gelişimi ve nörogelişimi için kritik öneme sahiptir. Eksiklikleri plasentadaki hücrelerin proliferasyonu ile anti-inflamatuar ortamın bozulmasına yol açar. Bu durum, maternal-fetal immün toleransın kaybına, erken doğum, düşük ve preeklampsi gibi gebelik patolojilerine neden olur. Feto-maternal immün tolerans, yarı allojenik fetüsün kabulü için gereklidir ve bu toleransı sağlamakta FoxP3+ Regülatör T hücreleri (Treg) merkezi bir rol oynar.

FoxP3+ Treg hücreleri, aşırı immün yanıtın baskılanması ve otoimmünite kontrolünde görevli bir T hücre alt grubudur. Bu hücreler, FoxP3 transkripsiyon faktörünü karakteristik olarak ifade eder ve FoxP3 ifadesi, Treg gelişimi ve fonksiyonu için gereklidir. Birçok gebelik patolojisinde FoxP3+ hücre popülasyonunun azaldığı gösterilmiştir. Eksozomlarında feto-maternal toleransta yer aldığı bilinmekle birlikte maternal hipotiroidide plasentada, FoxP3+ hücreler ve eksozomlar daha önce hiç araştırılmamıştır.

Bu çalışmada, hipotiroidili ve sağlıklı plasentalarda FoxP3+ hücrelerin ve eksozomların dağılımını ve miktarını araştırmayı amaçladık. Bu amaçla; dokuda FoxP3+ hücreler ve eksozomların belirlenmesi için sırasıyla FoxP3 ve CD63 ile immunohistokimya (IHC) yapıldı. Aynı zamanda protein seviyesinde kantitatif değerlendirme için ELISA ile yapıldı. IHC sonrası trofoblastlarda görülen FoxP3 ifadesinin değerlendirilmesi için trofoblastlar CK7 ile işaretlenerek seri kesit yöntemi gerçekleştirildi ve bunu doğrulamak için immünofloresan (IF) ile double boyama yapıldı. Ayrıca H&E boyaması ile iki grup arasında plasentadaki histomorfolojik değişiklikler değerlendirildi.

IHC ve ELISA sonuçlarına göre, hipotiroidili plasentalarda FoxP3+ hücreler anlamlı azalmıştı. Ancak CD63 ifadelerinde fark gözlenmedi. Seri kesit sonuçları ve IF analizi, FoxP3'ün hem desidua hem de villuslardaki trofoblastlarda da ifade edildiğini doğruladı.

Sonuç olarak; bu bulgular ile ilk defa FoxP3+ hücreler ve eksozomları maternal hipotiroidi ile ilişkilendirerek FoxP3+ hücrelerin maternal hipotiroidide plasentada azaldığı ve feto-maternal immün toleransın bozulmasına katkı sağlayabileceği sonucuna ulaşıldı. Aynı zamanda desiduda ve villuslarda bulunan trofoblastların FoxP3 ifade ettiğini saptanarak FoxP3' ün feto-maternal toleranstaki rolünü açıklığa kavuşturmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Maternal hipotiroidi, Treg, eksozom, FoxP3, CD63
Tezin sayfa adedi: 101
Danışman: Prof.Dr. H. Alper BAĞRIYANIK

INVESTIGATION OF FOXP3+ CELLS AND EXOSOMES IN PLACENTAL TISSUE OF PATIENTS WITH MATERNAL HYPOTHYROIDISM

PhD Thesis

Şeyda DEMİR YÜKSEL

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE
Department of Histology and Embryology

ABSTRACT

Maternal hypothyroidism is defined as thyroid hormone deficiency during pregnancy and affects approximately 4% of the population. Thyroid hormones play a critical role in the healthy development and neurodevelopment of the fetus. Deficiencies in these hormones impair cell proliferation in the placenta and disrupt the anti-inflammatory environment. This disruption may lead to the loss of maternal-fetal immune tolerance, resulting in pregnancy-related pathologies such as preterm birth, miscarriage, and preeclampsia. Maternal-fetal immune tolerance is essential for the acceptance of the semi-allogeneic fetus, and FoxP3+ regulatory T cells (Tregs) play a central role in maintaining this tolerance.

FoxP3+ Tregs are a subset of T cells responsible for suppressing excessive immune responses and controlling autoimmunity. These cells are characterized by the expression of the FoxP3 transcription factor, which is essential for their development and function. Previous studies have shown that the population of FoxP3+ cells decreases in several pregnancy-related pathologies. While exosomes are known to be involved in feto-maternal tolerance, no prior studies have investigated FoxP3+ cells and exosomes in the placenta of mothers with hypothyroidism.

In this study, we aimed to investigate the distribution and quantity of FoxP3+ cells and exosomes in placentas from hypothyroid and healthy pregnancies. To achieve this, FoxP3+ cells and exosomes were identified in tissue using immunohistochemistry (IHC) with FoxP3 and CD63 antibodies, respectively. Quantitative assessment of protein levels was also performed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). To evaluate FoxP3 expression in trophoblasts observed following IHC, a serial section method was employed, wherein trophoblasts were labeled with cytokeratin 7 (CK7). This was further confirmed by dual immunofluorescence (IF) staining. Additionally, histomorphological changes in the placenta between the two groups were assessed using hematoxylin and eosin (H&E) staining.

According to the IHC and ELISA results, FoxP3+ cell numbers were significantly reduced in hypothyroid placentas compared to controls. However, no difference was observed in CD63 expression levels. The results of the serial section method and IF analysis confirmed that FoxP3 is expressed not only in decidual cells but also in trophoblasts within the villi.

In conclusion, this study is the first to associate FoxP3+ cells and exosomes with maternal hypothyroidism, demonstrating that FoxP3+ cell numbers are reduced in the

placenta of hypothyroid pregnancies. This reduction may contribute to the disruption of feto-maternal immune tolerance. Additionally, the identification of FoxP3 expression in trophoblasts located in both the decidua and villi suggests a novel aspect of FoxP3's role in feto-maternal tolerance. Further research is warranted to elucidate the precise role of FoxP3 in maintaining immune tolerance during pregnancy.

Keywords: Maternal hypothyroidism, Treg, exosomes, FoxP3, CD63

Page number: 101

Advisor: Prof.Dr. H. Alper BAĞRIYANIK

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Maternal hipotiroidi, tiroid hormonlarının yetersizliğidir. Fetüsün normal gelişimi ve özellikle nöral gelişimi üzerinde etkilidir. Bununla birlikte gebeliğin sağlıklı bir şekilde devam etmesi için gereklidir. Maternal hipotiroidinin erken doğum, preeklampsi, düşükler gibi birçok gebelik patolojisine neden olduğu gösterilmiştir. Bunun altında yatan temel nedenin maternal hipotiroidinin, plasentanın feto-maternal ara yüzündeki anti-inflamatuvar ortamı bozması olarak düşünülmektedir. Maternal hipotiroidi durumunda feto-maternal ara yüzde, TNFα ve IL-6 gibi artmış pro-inflamatuvar sitokinler olduğu görülmüştür.

Başarılı bir gebelikte semi-allogenik fetüsün anne immün sistemi tarafından reddedilmemesi için maternal immün tolerans elzemdir. Bu tolerans öncelikle fetüs ile annenin birbirine en yakın temasta olduğu bölge olan feto-maternal ara yüzde kurulmaktadır. Burada birçok immün hücre yer almaktadır fakat bunlardan immün toleransta rol alan FoxP3+ Treg hücrelerinin aracılık ettiği aktif bir anne bağışıklık toleransı durumu esastır. FoxP3 (Forkhead ailesi transkripsiyon faktörü forkhead box p3) özellikle Treg hücrelere karakterize ve immün yanıtın baskılanmasında rol oynayan bir proteindir. FoxP3 fonksiyonunun bozulması immün toleransın bozulmasına, otoimmün hastalıklara ve gebelikte fetüs reddine kadar giden gebelik patolojilerine neden olmaktadır. Preeklampsi, tekrarlayan düşükler, gestasyonel diyabet gibi patolojilerde genellikle ifadesinin kontrole göre azaldığı görülmüştür.

Eksozomlar ise her hücre tipinden salınan nano veziküllerdir. Hücre-hücre iletişiminde rol alan bu veziküllerin feto-maternal immün toleransta yer aldıkları gösterilmiş olmakla birlikte fetüsten salınan eksozomların bu toleransın sağlanmasında etkili olabileceği gösterilmiştir. Patolojik koşullarda ise salınım miktarlarının genellikle değiştiği gösterilmiştir.

Maternal hipotiroidide, plasentada daha önce FoxP3 ifadesi ve eksozomlar hiç araştırılmamıştır. Feto- maternal arayüzdeki varlıkları ve miktarları ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu patolojide etkileri olup olmadığı bilinmemektedir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada hipotiroidili ve sağlıklı bireylerden elde edilen plasentalarda FoxP3+ hücreler ve eksozomların, plasenta dokusundaki dağılımını ve miktarını araştırarak maternal hipotiroidi patogenezine ve feto-maternal immün toleransa etkisini araştırmayı amaçladık.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

1- Maternal hipotiroidide FoxP3 ifadesi kontrole göre azalarak feto-maternal immün toleransı negatif yönde etkiler.

2- Maternal hipotiroidide fetal plasenta kaynaklı eksozomların salınım miktarı kontrole göre değişir ve feto-maternal immün toleransın bozulmasına katkıda bulunarak bu patolojide yer alır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Plasenta

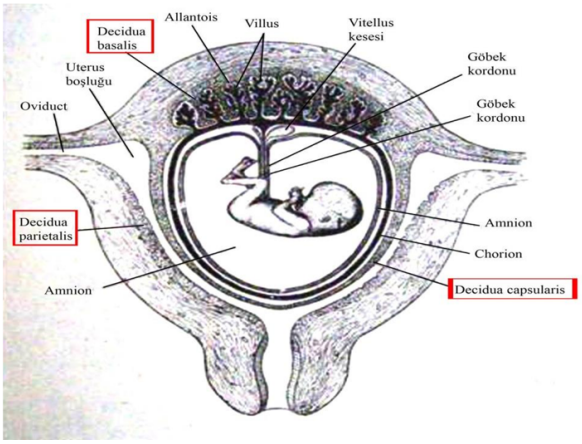
Plasenta gebelik boyunca varlığını sürdüren sonrasında ortadan kalkan geçici bir organdır. Plasenta embriyogenezin en erken evresinde organogenezi başlatır, fetal büyümeyi yönetir ve doğumdan hemen sonra kendi kaderini sonlandırır. Plasental perfüzyon iki ayrı kardiyovasküler sistem tarafından yani hem maternal dolaşım hem de fetal dolaşım ile sağlanır. (1). Yani plasenta, anne ve fetüs dolaşımı arasında arayüz görevi görerek, anne karnındaki bebeğin normal gelişimi için gerekli olan besin ve oksijenin anne kanından fetüse etkili bir şekilde taşınmasını sağlar(2). Bu nedenle, plasentanın patofizyolojisi hem maternal durum hem de fetal gelişimle yakından ilişkilidir. Plasentanın düzensiz gelişimi, preeklampsi, fetal büyüme gerilikleri, tekrarlayan düşükler ve ölü doğum gibi gebeliğin başlıca hastalıklarının birincil kusurudur (3).

Plasenta 2 kısımdan oluşmaktadır. Fetal ve maternal kısım. Fetal kısmı Koryon villusları oluştururken, maternal kısım Desiduadan gelişir. Desidua gebelikteki fonksiyonel endometriyumudur ve 3 tabakadan oluşur (Şekil 1).

Desidua basalis, embriyonun implante olduğu endometriyum bölgesidir.

Desidua kapsülaris, implante olan embriyoyu saran endometriyum bölgesidir.

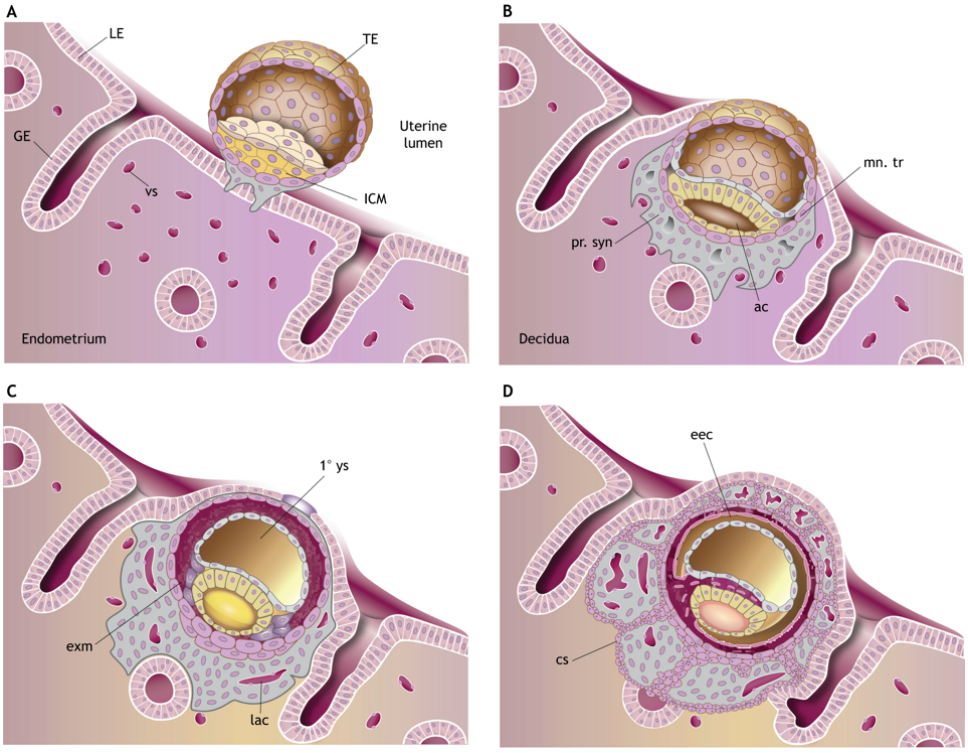
Desidua pariyetalis, implantasyon bölgesi dışında kalan endometriyum bölgesidir.



Şekil 1: Plasenta

Plasenta Gelişimi

İnsan plasentası, fertilizasyondan yaklaşık 5 gün sonra oluşan preimplantasyon evresindeki embriyonun dış tabakası olan trofektodermden (TE) gelişir. Bu aşamada, preimplantasyon embriyosu blastosist olarak adlandırılır ve iki farklı hücre soyuna ayrılır. Bunlar iç hücre kitlesi (ICM) ve dış hücre kitlesi olan TE. Polar TE, ki bu TE' nin iç hücre kitlesi ile birleşik olan kısmıdır ve endometriyuma tutunur (Şekil 1A). Her ne kadar implantasyonun en erken evreleri insanlarda görüntülenmemiş olsa da erken gebelik histerektomi örneklerinin ve daha yüksek primatlardan elde edilen morfolojik gözlemlerden elde edilmiştir. Şöyle gerçekleşmektedir; TE' in endometriyuma bağlandıktan sonra yani yaklaşık fertilizasyondan sonraki yaklaşık 6-7. günlerde endometriyum ile stabil bir bağlantı kurar ve TE hücreleri komşu hücreler ile birleşerek primer sinsityumu oluşturur. Buna da prelaküner evre denir. Bu hücrelere de sinsityotrofoblast hücreleri denir (4) .



Şekil 2: İnsan plasenta gelişiminin erken evreleri. Blastosist implantasyonunu takiben plasenta oluşumunun ilk aşamaları (4). (A,B) Prelaküner evre. (C) Laküner evre. (D) primer villöz evre. 1° ys, primer yolk kesesi; ac, amniyon boşluğu; cs, sitotrofoblastik kabuk; eec, ekstra embriyonik sölom; exm, ekstra embriyonik mezoderm; GE, glandüler epitel; ICM, iç hücre kütlesi; lac, lakunalar; LE, lüminal epitel; mn. tr, mononükleer trofoblast; pr. syn, primer sinsityum; TE, trofektoderm; vs, kan damarları.

İmplantasyonu takiben, primer sinsityum hızlı bir şekilde yüzey epitelinin altındaki endometriuma doğru ilerler ve endometriumun desidua adı verilen özel bir dokuya dönüşmesine yol açar. Fertilizasyondan sonraki yaklaşık 14. günde blastosist tamamen endometriyuma gömülür ve yüzey epiteli ile örtülür (Şekil 2C). Daha sonra primer sinsityum içinde lakünalar belirginleşmeye ve genişlemeye başlar. Bunlar içi sıvı dolu boşluklardır. Lakünalar genişleyip birbiri ile birleşerek bu sinsityumu bir trabekül sistemine böler. Bu evreye laküner evre denir (Şekil 2C). Yine bu evrede sinsityum desidual bezlere doğru açılarak bu bezlerin salgıları ile yıkanır. Sinsityumun altındaki trofoblast hücrelerine ise sitotrofoblast hücreleri denir ve bu hücreler başlangıçta maternal doku olan endometriyum ile direk temasta değildir ve bu evrede hızla çoğalarak primer sinsityumun içine doğru ilerleyerek çıkıntılar oluşturur böylece **primer villusları** oluşur. Yani primer villusun merkezi kısmını sitotrofoblastlar oluştururken bu merkezi saran dış tabakayı sinsityotrofoblastlar oluşturur. Bu evreye primer villöz evre denir (Şekil 2D). Villöz ağaçlar ise daha fazla çoğalma ve dallanma ile meydana gelir. Lakünalar ise daha sonra intervillöz boşluklara dönüşür. Daha sonra sitotrofoblastik hücreler primer sinsityumun üstüne çıkarak birbirleri ile birleşir ve burada bir sitotroblastik kabuk oluşturur. Yani bu kabuk desidua ile villuslar arasında konumlanan yeni bir tabaka oluşturmaktadır. Post fertilizasyonun 17- 18. günlerinde ekstraembriyonik mezenkimal hücreler primer villusların merkezine girerek **sekonder villusları** oluşturdular. Post fertilizasyon 18. Gününde ise fetal kapillerlerin villus içinde görülmesiyle birlikte bu villuslar artık **tersiyer villuslar** olarak isimlendirilir (4,5). Bu villuslar koryon tabakasında hızla dallanarak villöz bir ağaç oluştururlar. Böylece tüm embriyonun çevresini sararak embriyonun gelişmesini sağlarlar.

Anne-fetüs ara yüzünde, bireysel sitotrofoblast hücreleri sitotrofoblastik kabuğu terk ederek bölünmeyen insan lökosit antijeni G (HLA-G) pozitif ekstravillöz trofoblast (EVT) hücrelerine dönüşürler. EVT' nin proliferatif fraksiyonu fenotipik olarak prolifere olan villöz sitotrofoblastlardan farklıdır (6). EVT hücreleri epitel-mezenkimal geçiş (EMT) geçirir (7). EMT, BAP1/ASXL kompleksinin yukarı düzenlenmesi TGFB1 ifadesi ve hücre istilasında rol oynadığı bilinen metalloproteinazları kodlayan PAPPA ve PAPPA2 ifadesiyle ilişkilidir. Metalloproteinazlar, hücre invazyonu, immünomodülasyon, hücre adezyonu gibi biyolojik olaylarla ilişkilidir. Ayrıca EVT'ler immün hücresi interaksiyonunda (8) ve patojenlere karşı savunma da önemli bir rol oynarlar (Zeldovich vd., 2011).

EVT'lerin bir alt kümesi, post-mitotik poliploidizasyona, büyüme durmasına ve hücresel yaşlanmanın indüklenmesine uğrar (10)ve bu da maternal desidua ve miyometriyumda trofoblast dev hücrelerinin birikmesine yol açar ve bu hücreler, plasenta yatağında doğuma kadar kalır (11). EVT hücrelerinin önemli rollerinden biri, vasküler yeniden modellenmeye aracılık etmektir bu sayede EVT'ler, etkileşimde bulundukları maternal immün hücreleriyle birlikte maternal desiduayı spiral arterlere doğru istila etmeye başlarlar. Burada düz kas ortamını yok edip arterleri yüksek iletkenliğe sahip damarlara dönüştürürler. (12)Spiral arterlerin yeniden modellenmesini kolaylaştırarak EVT invazyonu gebelik başarısı için kritik öneme sahiptir. EVT invazyonunun dengeli bir şekilde düzenlenememesi spiral arter yeniden modellenmesinin yetersiz olmasına ve uteroplasental vaskülarizasyonun yetersiz kalmasına yol açar. Bu durum preeklampsi, fetal büyüme kısıtlaması (FGR), plasenta dekolmanı ve erken doğum gibi normotansif durumlarla da ilişkilidir (Brosens vd., 2019).

Feto-maternal Dolaşım

İnsan plasentasyonu oldukça invazivdir ve post fertilizasyon 11. güne kadar konseptus tamamen uterus içine gömülür. Bu invazivlik ile ilgili olarak, daha önce anne kan dolaşımına erken erişimle ilişkilendiriliyordu ve insanların büyük beyinlerinin gelişiminde evrimsel bir avantaj sağladığı düşünülüyordu. Hustin ve ark. (14) bu görüşe karşı çıkarak ve anatomik ve ultrason bulgularına dayanarak hemotrofik beslenmeyi

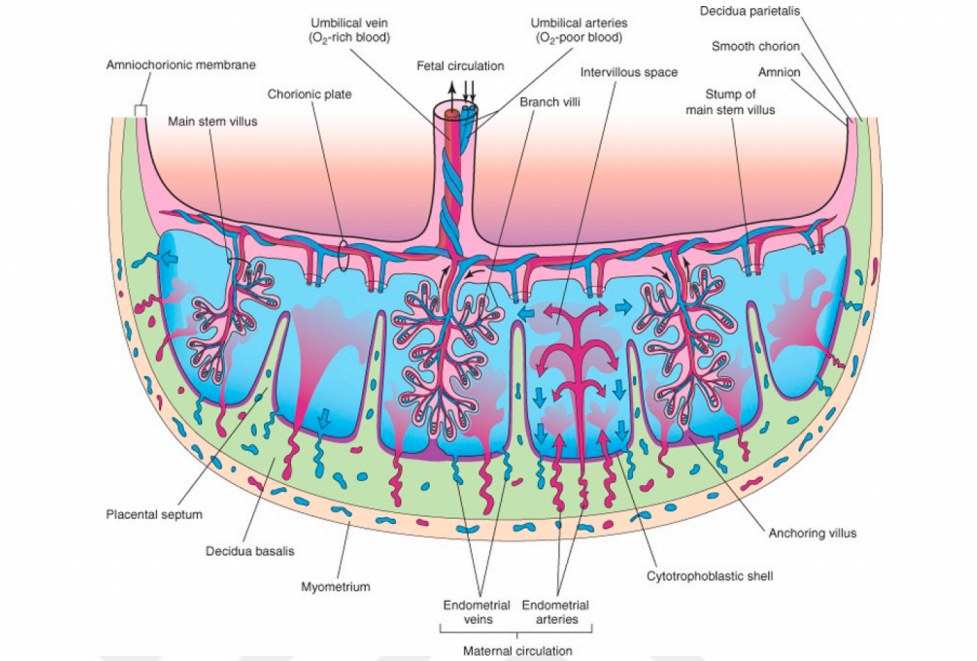
kolaylaştıracak önemli anne kan akışının gebeliğin 10-12. haftasına kadar gerçekleşmediğini iddia ederek o zamana kadar beslenmenin histotrofik beslenme yoluyla endometrial bezler tarafından sağlandığını savundular. Bu kavram daha sonra intervillöz boşluktaki oksijen konsantrasyonlarının ölçülmesiyle doğrulandı (15). 12. Haftaya kadar endometrial salgılar konseptüsün hayatta kalması ve büyümesi için gereklidir. Daha sonra plasentanın tam gelişmesi ile hemotrofik beslenme başlamaktadır.

İnsan gebeliğinin ilk trimester sonlarında, plasentaya maternal kan akımının sağlanmasıyla, fetüsün hemotrofik desteği gerçekleşebilir. Bu dönemde koryonik villuslar, intervillöz boşluklara ayrıntılı bir mikrovillöz sınırla ek ve daha karmaşık dallar uzatır. Terminal, olgun villusların oluşumu 20. haftadan sonra gerçekleşir ve daha sonra eksponansiyel olarak genişler(5) .

Anne ve fetüs arasındaki dolaşım plasenta zarı tarafından ayrılır. Madde alışverişi bu zardan gerçekleşir. Maternal kanın koryon villuslarını yıkaması ile feto-maternal dolaşım gerçekleşir.

Fetustan oksijence fakir olan kan umblikal arterler ile plasentaya ulaşır. Bu arterler göbek kordonundan geçer ve koryon villuslarına girmeden önce koryon plağında dallanırlar. Fetustaki ince duvarlı venler ise birleşerek umblikal veni oluşturur. Umblikal vende göbek kordonundan geçip dallanarak fetüse oksijenden zengin kanı ulaştırır. Koryon plağında dallanan umblikal arter ve venler villuslar içinde arterio-venöz kapiller sistemi oluştururlar. Bu sayede anne ve fetüs kanı birbirine çok yaklaşarak madde alışverişi gerçekleşir.

Anne kanı ise spiral endometrial arterlerin desidua bazalisten uzanıp sitotrofoblastik kabuğu delerek intervillöz alana açılması ile fetüse ulaşır. Anneden intervillöz alana ulaşan kan yüksek basınçlı kan koryon plağına çarpar ve basıncın dağılmasıyla kan basıncı azalır. Böylece koryon villuslarını yıkayan anne kanı ile fetüs kanı arasında madde ve gaz değişimi gerçekleşir. Bu değişimden sonra oksijence fakir kan endometrial venler ile maternal dolaşıma geri döner (Şekil 3). Bu şekilde anne ile fetüs arasındaki dolaşım sağlanır (16).



Şekil 3: Feto-Maternal Plasental dolaşım (16)

Gebelik ilerledikçe insan plasentasında morfolojik değişikliklerin yanı sıra fonksiyonel ve metabolik değişiklikler de meydana gelir ve bunlar fetal gelişimin en iyi şekilde desteklenmesini sağlar. Plasental glikozun anneden fetüse transferi, yaklaşık 7 farklı glikoz taşıyıcı protein (GLUT) kullanılarak kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla gerçekleşir(17). Plasental amino asit transportu, kolaylaştırıcı veya değiştirici taşıyıcılar olarak işlev gören yaklaşık 20 amino asit taşıyıcısını içeren aktif bir süreçtir (18). Yağ asidinin plasenta boyunca transferi lipazların, taşıyıcıların, translokazların ve bağlayıcı proteinlerin koordineli katılımını gerektirir (19).

Patolojik Koşullarda Plasenta Histolojisindeki Değişiklikler

Gebelik komplikasyonlarında plasenta histolojisindeki değişiklikler sıklıkla bildirilmektedir ve yapılan histomorfolojik puanlamaya dayanmaktadır. Plasenta

dokusunda intavillöz kanama, kalsifikasyon ve sinsityal nod miktarları gibi değişiklikler değerlendirilmektedir (20).

Plasentadan türetilen sinsityal düğümler, sinsityotrofoblastlardan dışarı atılan çok çekirdekli sinsityal çekirdek kümeleridir (çapı 20 μm~200 μm, düğüm başına ortalama 60 çekirdek). Plasenta kaynaklı sinsityal düğümlerin oluşumu genellikle dejeneratif bir süreç, yaşlanmaya bağlı bir değişiklik ve iskemi veya hipoksiye maruz kaldığında trofoblastik durumun bir göstergesi olarak kabul edilir (21). Sinsityal düğüm düzeyleri gebelik ilerledikçe artar ve preeklampsi gibi gebelik komplikasyonlarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (22). Ancak sinsityal düğümlerin kökeni ve oluşumu henüz netlik kazanmamıştır. Sinsityal düğümler, doğum öncesi tanı için alternatif bir fetal DNA kaynağı olarak kullanılabilir (23)

Kalsifikasyon, plasenta üzerinde küçük, yuvarlak kalsiyum birikintileri birikerek plasentanın yavaş yavaş bozulmasına neden olduğunda kalsifiye bir plasenta oluşur. Gebeliğin sonuna doğru süreç doğal olarak gerçekleşir. Ancak plasental kireçlenme 36. haftadan önce meydana gelirse ya da kalsifikasyon alan sayısı çok fazla artarsa, plasenta kanlanmasını bozarak anne ve bebek için komplikasyonlara neden olabilir. Bununla birlikte kalsifikasyonun çok fazla olması plasenta abnormalitesi ile ilişkilidir (24)

İntravillöz kanama ise, herhangi bir villusta villöz stroma içinde kanamadır. İntravillöz kanama, plasentanın akut hipoksik olayının bir belirtisidir ve plasental parankim enfarktüsünün erken bir evresi olarak ortaya çıkar. Plasentada hipoksiye neden olur (25).

2.2. Maternal Hipotiroidi

Maternal hipotiroidi, gebelik sırasında tiroid hormon yetersizliği olarak tanımlanır ve popülasyonun % 4' ünü etkiler (26). Tiroid hormonları, metabolizma düzenlemesinde önemli bir rol oynar ve normal fetal gelişim için gereklidir. Gebelik döneminde ortaya çıkan hipotiroidinin, gebelik ve fetüs sağlığı üzerinde ciddi negatif etkileri vardır. Yetersiz tiroid hormonları, fetal büyüme geriliğine, düşük doğum ağırlığına, erken doğuma ve nörolojik gelişim problemlerine yol açmaktadır (27).

Tiroid hormonu nöronal göçte, miyelinizasyonda, sinaptogenezde rol aldığı için sinir sitemi gelişiminde oldukça önemlidir. Bu nedenle maternal tiroid hipofonksiyonu çocuk nörogelişimini olumsuz etkiler (28). Özellikle erken gebelikte maternal tiroid hormonu yetersizliğinin fetal nörogelişimi bozabileceği görülmüştür. Fetal tiroid bezi gebeliğin 12-14. haftasına kadar işlevsel değildir, bu nedenle uygun fetal gelişim için yeterli seviyelerde maternal tiroid hormonlarına ihtiyaç vardır (28,29).

Maternal hipotiroidi 2 şekilde tanımlanmaktadır, Overt hipotiroidizm, düşük seviyede serbest tiroksin [FT4] ile yüksek seviye serum tiroid uyarıcı hormon [TSH] ve daha hafif formu olan subklinik hipotiroidizm, normal FT4 seviyeleri ile yüksek serum TSH seviyeleri ile karakterizedir(30). TSH primer tiroid disfonksiyonu için en duyarlı belirteç olduğundan, gebelikte tiroid disfonksiyonu için ilk tarama testi olarak serum TSH seviyesi kullanılmaktadır. Buna ek olarak overt ve subklinik tiroid fonksiyon bozukluğunu ayırt etmek için serum serbest T4 seviyeleri kullanılabilmektedir (26).

Bununla birlikte yapılan çalışmalar göstermiştir ki; farklı popülasyonlarda TSH üst sınır referans değerinde önemli farklılıklar olabilmektedir (31). Bu farklılıklar kısmen popülasyonlar arasındaki iyot durumuna, TSH testlerinin farklılığına ayrıca vücut kitle indeksi, coğrafya ve etnik köken gibi faktörlere bağlı olabilir. Burada her uygulayıcı ya da laboratuvarların kendi popülasyonuna uygun referans değerlerini belirlemesi ve her trimester için spesifik referans değerlerini belirlenmesi gerekmektedir. Bu da çok kolay elde edilebilir bir veri değildir. Eğer lokal veriler bulunmuyorsa 4.0 mU/L üst sınır olarak kabul edilebilmektedir (32). Yapılan farklı çalışmalar ise, yüksek maternal TSH seviyesinin gebelik kayıpları ile ilişkisi olduğunu gösterdi. TSH konsantrasyonu 2.5-5.0mIU/L arası olan gebelerle, 2.5 mIU/L altı olan gebeler karşılaştırıldığında TSH konsantrasyonu 2.5- 5.0mIU/L arasında olan gebelerde gebelik kaybının daha yüksek olduğu görüldü (%6.1’ e karşı %3.6) (33). Günümüzde anne serum TSH konsantrasyonunun <2.5mIU/L olması makul olarak kabul edilmektedir. Bu değerden yüksek olması durumunda ise tedavi olarak levotroksin uygulaması yapılmaktadır. Levotroksin dozunun gebelik boyunca TSH hormonun değişimine göre ayarlanması gerekmektedir. Levotroksin uygulanmasının düşükleri azalttığı bilgisinin yanında levotiroksin tedavisinin, çocuklarının bilişsel işlevi üzerinde herhangi bir fayda

göstermediği de rapor edilen bilgiler arasındadır. Mevcut verilerle ilgili bazı endişelerin yanında, yapılan çalışmalar kanıtların, evrensel tarama ve gebelikte hipotiroidizm tedavisinin fayda sağlamadığını rapor etmiştir. Bunları baz alarak ACOG (Amerikan Kadın Doğum Uzmanları ve Jinekologlar Koleji) yüksek riskli hastaları öykü, muayene ve semptomlar aracılığıyla belirleme ve taramada dikkatli olmaya devam edilmelidir açıklaması yapmıştır (34).

ABD' de yapılan 223.512 hamile kadını içeren ulusal bir kohort çalışmasında; maternal hipotiroidinin, preeklampsi, gestasyonel diabetes mellitus, erken doğum, sezaryen ve bebek yoğun bakım ünitesine yatış risklerini artırdığı gösterilmiştir (35). Başka bir araştırma, hipotiroidi olan hamile kadınlardan doğan çocukların, hipotiroidi olmayan hamile kadınlardan doğan çocuklara kıyasla daha düşük zekâ katsayısı (IQ) puanlarına sahip olduğunu göstermiştir (36).

Yapılan çalışmalar, plasentanın maternal tiroid hormonlarına yanıt vermede ve bunları düzenlemede merkezi bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Gyamfi ve ark. preeklampsi, düşük, intrauterin gelişim gerilikleri (IUGR) gibi anormal plasentasyon gösteren kadınlarda, anormal tiroid hormonu seviyeleri olduğunu belirlemişlerdir. Plasenta hücrelerinin (Trofoblastlar) proliferasyonu ve farklılaşması için optimal düzeyde tiroid hormonunun gerekli olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca maternal hipotiroidi durumunda, desiduada IL-4, IL10 gibi anti inflamatuar faktörlerin ifadesi belirgin olarak azalmış, plasenta içindeki anti-inflamatuar ortamında bozulduğu gösterilmiştir (37). Bu durum, maternal fetal immuntoleransı bozup erken doğum, preeklampsi, düşükler gibi birçok gebelik patolojisine neden olmaktadır.

2.3. FoxP3 (Forkhead Box P3) Transkripsiyon faktörü

FoxP3, forkhead transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesidir. Esas olarak immün sistemde baskılayıcı rol oynayan Treg hücrelerinde eksprese edilir. FoxP3'ün bir fonksiyonu NFAT ve NFkappaB'nin fonksiyonunu baskılamaktır ve bu durum IL-2 ve efektör T hücre sitokinleri de dahil olmak üzere birçok genin ifadesinin baskılanmasına yol açar.

Foxp3 ifadesinin artmasıyla birlikte naif T hücrelerinin Treg'lere dönüşür. İnsanlarda Foxp3 geninin işlevi hakkında daha az şey bilinmektedir (38). Fare modellerinde Foxp3 inaktivasyonunun Treg eksikliğine yol açtığı gösterilmiştir. Bununla beraber belirgin organ spesifik Foxp3 ifadesi, Treg'lerin gelişimi ve işlevi için önemli bir düzenleyicidir(39).

FoxP3 eksikliği Treg'lerin baskılayıcı işlevini bozar (40). Çalışmalar FoxP3 gen polimorfizmleri ile, sistemik lupus eritematozus, otoimmün tiroid hastalıkları, tip I diyabet ve alerjik rinit gibi otoimmün hastalıklar arasında bir ilişki bulmuştur. FoxP3 ifadesinin azalmasının Treg miktarının azaldığını gösterdiğini ve bununda immün dengenin bozulması anlamına geldiği rapor edilmiştir. Gebelikte ise FoxP3 ekpresyonunun azalmasının Treg sayının azalmasıyla sonuçladığı ve bunun immün toleransın dengesini bozarak gebelik patogenezinde rol alabileceği çalışmalarla gösterilmiştir (38).

Normal gebelik, fetüse karşı maternal bağışıklık toleransı gerektirir. Immün sistemin baskılanması, antijen-spesifik immüniteyi sınırlayarak hareket eden düzenleyici T (Treg) hücrelerinin temel bir işlevidir (41). Treg hücreleri (Treg'ler), X kromozomunun kısa koluna (Xp11.23) haritalanan bir gen olan forkhead ailesi transkripsiyon faktörü forkhead box p3' ün (FoxP3) ifadesiyle tanımlanır (42). Treg'ler, T hücrelerinin immünosupresif olan bir alt kümesidir. FoxP3 ifadesi Treg gelişimi için gereklidir. Treg gelişimi ve işlevi için FoxP3 ifadesi gereklidir. İmmün sitemin baskılanması Treg'lerin önemli bir fonksiyonudur ve FoxP3 ekspresyonundaki eksiklik onların fonksiyonlarını bozar (43). FoxP3 transkripsiyon faktörü, aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörünün ve NFκB'nin fonksiyonunun baskılanması yoluyla etki eder, bu da birçok genin baskılanmasına veya ekspresyonuna yol açar. Treg hücrelerinin eksikliğinin, ciddi sistemik immün aracılı inflamatuar lezyonlara neden olan FoxP3 geninin fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (44)

Tekrarlayan gebelik kayıpları ve PE dahil olmak üzere gebelik komplikasyonları yaşayan kadınlarda dolaşımdaki Treg sayılarında azalma gözlemlenmiştir (45,46)

Treg'ler, naif T hücrelerinin Treg'lere dönüşmesiyle sonuçlanan FoxP3 ifadesinin artması ile üretilir. İnsanlarda FoxP3 geninin işlevi hakkında daha az şey bilinmektedir (47). Fare modellerinde FoxP3 inaktivasyonunun Treg eksikliğine yol açtığı

gösterilmiştir. Yani FoxP3 Treg'lerin gelişimi ve işlevi için önemli bir düzenleyicidir. FoxP3 eksikliğinin Treg'lerin baskılayıcı işlevini bozabileceği gösterilmiştir (48). Hu ve ve ark. ise FoxP3' nin Treg immünosupresif etkisi için gerekli olduğunu söylemişlerdir (49). Böylece gebelik patolojilerinde FoxP3' nin ifadesinin azalması sonucunda Treg sayısının azaldığını bununda feto-maternal immün toleransı bozarak gebelik patolojilerinde rol alabileceği rapor edilmiştir (38). Boer ve ark. ise yaptıkları çalışmaların sonucunda FoxP3'ün Treg hücrelerini dokuda tanımlamak için iyi bir belirteç olduğunu ve kendilerinden önceki literatür verileri doğruladığını söylemişlerdir (50).

Regülatör T Hücreleri

Bağışıklık homeostazını korumak, otoimmüniteyi önlemek ve patojenler ve çevresel saldırılar tarafından tetiklenen inflamasyonu hafifletmek için çeşitli karmaşık düzenleyici mekanizmalar kullanılır. Bu mekanizmaların başında, günümüzde periferik toleransın primer aracıları olarak kabul edilen regülatör T (Treg) hücrelerinin etkileri gelmektedir.

CD4+ T hücrelerinin bir alt kümesi olan regülatör T hücreleri (Treg'ler), immün toleransı düzenlemede rol oynayan ana hücrelerdir. Treg hücreleri, periferik toleransın korunması, otoimmün hastalıkların önlenmesi ve kronik inflamatuar hastalıkların sınırlandırılması için gereklidir. Ancak aynı zamanda immün sistemi baskılayarak ve antitümör bağışıklığını sınırlayarak yararlı yanıtları da sınırlarlar (51).

Treg'ler CD4, CD25 ve FoxP3 (Forkhead ailesi transkripsiyon faktörü forkhead box p3) ile karakterize edilir (52). FoxP3 ekspresyonu Treg gelişimi ve işlevi için gereklidir. FoxP3, regülatör T hücrelerinin gelişiminin genetik programını yönlendiren transkripsiyon faktörüdür. Sadece gelişimi için değil, aynı zamanda işlevleri için de kritik öneme sahiptir (53).

İmmün supresyon Treg'lerin önemli bir işlevidir ve FoxP3 ekspresyonundaki eksiklik işlevlerini bozar (54). FoxP3+ Treg hücreleri, aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü ve nükleer faktör κB'nin fonksiyonunun baskılanması yoluyla etki eder, bu da birçok genin baskılanmasına veya ekspresyonuna yol açar. Treg'ler FoxP3 ile karakterize edilirler. Treg hücrelerinin eksikliğinin, şiddetli sistemik immün aracılı

inflamatuar lezyonlara neden olan FoxP3 geninin fonksiyon kaybı mutasyonlarıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (55) .

Gebelikte Foxp3 Treg Hücreler ve Feto-maternal İmmüntolerans

Gebelik, maternal-fetal bağışıklık arayüzü için benzersiz bir zorluk teşkil eder çünkü semi- allojenik fetüsün anne immün sistemi tarafından reddinin engellemesi için gerekli olan immünosupresyon ile maternal-fetal arayüzü istilacı organizmalardan korumak için proinflamatuar konak savunması arasında bir denge gerektirir (56). Feto-maternal tolerans ise gebelikte gelişir ve fetal dokuları reddedilmekten koruyarak ve başarılı bir gebeliğe yol açar (57). Blastosistin uterus endometriumuna implantasyonundan sonra trofoblastlar endometrial dokuyu ve uterus spiral arterlerini istila etmeye başlar. CD4+ T hücreleri, CD8+ T hücreleri ve CD16−CD56^{bright} doğal öldürücü (NK) hücreleri gibi maternal lenfositler, yüzeylerinde aktivasyon belirteçleri ifade eder ve bu da maternal lenfositlerin trofoblastları veya fetüsleri tanıdığını gösterir. Maternal immün düzenleme ve trofoblast kökenli tolerojenik moleküllerin etkileşimi feto-maternal arayüzde tolerojenik bir ortam oluşturur. İmmün sistemi göz önüne alındığında, regülatör T hücreleri (Treg hücreleri) allojenik gebeliğin sürdürülmesinde önemli bir rol oynar (58). CD4+CD25+FoxP3+ Treg hücreleri T hücresi yanıtını düzenler. Treg hücreleri doku homeostazını sürdürmek ve bağışıklık toleransı oluşturmak için gereklidir (59). Ayrıca tümör büyümesi ve organ nakli toleransı ile de ilgilidir. Fare modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, paternal antijen-spesifik Treg hücrelerinin gebelik sırasında sistemik ve lokal olarak çoğaldığını göstermiştir(60)Seminal plazma, paternal antijen-spesifik Treg hücrelerinin indüksiyonunu başlatır. Treg hücreleri insan gebelikleri sırasında sistemik ve lokal olarak da artar. Son çalışmalar, hedef-spesifik, klonal olarak genişletilmiş Treg hücrelerinin insan gebeliklerinde feto-maternal arayüzde arttığını göstermektedir (61). İnsan gebeliğinde, trofoblast hücreleri villöz ve ekstravillöz trofoblastlara (EVT'ler) farklılaşarak plasentayı oluşturur. EVT'ler desidua ve miyometriyumu istila eder. İmplantasyondan sonra, EVT'ler maternal spiral arterlere daha fazla penetre olarak, spiral arterleri invaze eder (62). Böylece feto-maternal arayüz oluşur ve EVT'ler ile maternal bağışıklık hücreleri birbirleriyle temasa geçer (63).

EVT'ler, majör doku uyumluluğu kompleksini (MHC) kontrol ederek ve immün baskılayıcı molekülleri eksprese ederek maternal immün hücrelerinden kaçarlar. Anne immün sistemi de fetal dokulara karşı toleransı artırmak için dinamik olarak değişir (64).

Villöz trofoblastlarda MHC sınıf I ve sınıf II'nin ekspresyonu yoktur. EVT'ler polimorfik HLA-A, B'yi ifade etmezken, HLA-C ve polimorfik olmayan HLA-E, G ve F'yi ifade ederler (65). Maternal CD8+ T hücreleri ve NK hücreleri paternal HLA-C'yi doğrudan tanıyabilir, CD4+ T hücreleri ise dolaylı olarak tanıyabilir. Öte yandan, HLA-E ve G EVT'leri NK hücresi aracılı sitotoksisiteden korur(66). HLA-G pozitif EVT'ler, tolerojenik dendritik hücrelerin (DC'ler) indüksiyonu yoluyla T hücresi aktivasyonunu düzenler ve doğrudan Treg hücrelerinin genişlemesine neden olur (67). Ayrıca, trofoblastlar indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) ekspresyonu, IL-10 ve TGF-β gibi inhibitör sitokinlerin salgılanması ve programlanmış ölüm ligandının (PD-L I) (37) ifadesi yoluyla maternal immün hücreleri baskılar (68) .

Yapılan çalışmalar Treg hücrelerinin farelerde allojenik gebelikte paternal antijen-spesifik toleransın indüklenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Tafuri ve ark. tarafından allojenik gebelik sırasında paternal MHC'ye özgü tolerans gösterilmiştir. Burada paternal MHC taşıyan tümör greftinin gebelik sırasında reddedilmediği, konseptus MHC'sinin tümör greftiyle aynı olduğu, ancak doğum sonrası dönemde reddedildiği gösterilmiştir (69). Aluvihare ve ark. yaptığı çalışmada, Treg hücrelerinin farelerde allojenik gebelik için gerekli olduğunu, ancak singeneik gebelik için gerekli olmadığını göstermiştir (70). İmplantasyon sırasında Treg hücrelerinin uzaklaştırılması, allojenik gebeliklerde implantasyon başarısızlığına neden olmuştur bu da Treg hücrelerinin memelilerde başarılı implantasyon için gerekli olduğunu gösterir (71). Bu bulgular Treg hücrelerinin allo-antijen-spesifik toleransı indüklediğini ve implantasyondan itibaren gerekli olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar implantasyondan sonra, gebelik boyunca uterustaki Treg hücre popülasyonunun her geçen gün arttğını, ancak periferik lenf düğümleri ve dalaktaki hücre popülasyonu artmadığını görmüşler (72). Bu nedenle paternal antijen-spesifik Treg hücrelerinin birikimi organa özgü bir şekilde düzenlendiği rapor edilmiştir (64).

Her ne kadar fetal antijen-spesifik Treg hücreleri ve bunların sistemik ve lokal genişlemeleri bir fare modelinde gözlemlenmiş olsa da, heterojenik MHC ekspresyonu ve Treg hücrelerinin fizyolojik hedef peptidi ile ilgili sınırlı bilgi nedeniyle insanlarda fetal antijen-spesifik Treg hücrelerinin doğrudan tespiti zordur (73). Ancak bazı raporlarda insan gebeliklerinde fetal antijen-spesifik Treg hücrelerinin varlığı dolaylı olarak ileri sürülmüştür. Yapılan bir çalışmada, tek hücre bazlı T hücre reseptörü (TCR) repertuar analizini ile efektör Treg hücrelerinin sadece desiduada gözlemlendiğini, ancak periferik kanda gözlemlenmediğini ortaya koyulmuştur. Yani paternal antijen spesifik efektör Treg' lerin desiduada konumlandığı görülmüştür. Ayrıca efektör Treg hücrelerinin sayısının 3. trimesterda 1. trimesterden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Klonlanmış olarak genişletilmiş efektör Treg hücreleri 3. trimesterde 1. trimesterden daha yüksekti. Diğer taraftan, desidua ve periferik kan arasında ortak klonotipik efektör Treg hücreleri nadiren gözlendi. Bu nedenle, desidual efektör Treg hücreleri feto-maternal arayüzde ifade edilen bazı antijenleri tanıyabilir ve antijen uyarımı üzerine çoğalabilir. Ancak, periferik kandaki efektör Treg hücreleri nonspesifik olarak çoğalmaktadır (64).

Gebelik Patolojilerinde FoxP3+ Treg Hücreleri

Gebelikte immün sistem aktivasyonu ve düzenlenmesi arasındaki dengenin sağlanmasında Fox3+ regülatör T (Treg) hücreleri merkezi bir rol oynar(74,75).

Semi-allojenik fetüsün tanınması maternal desidual T hücrelerini ve NK hücrelerini aktive eder. Ekstravillöz trofoblastlar (EVT'ler) yüzeylerinde polimorfik paternal HLA-C molekülleri ifade eder ve fetal-maternal HLA-C uyumsuzluğu desidual T hücresi aktivasyonuna neden olur bu da maternal T hücrelerinin fetüsü tanıdığını düşündürmektedir (76). Normal gebelikte immün regülasyon ve immün aktivasyon arasındaki denge iyi kontrol edilir, ancak implantasyon başarısızlığında düzensizleşir.

Gebelikte klonal olarak genişleyen Treg hücreleri feto-maternal arayüzde artar. Bu nedenle, fetal antijen-spesifik toleransın feto-maternal arayüzle sınırlı olduğu düşünülmektedir. Treg hücrelerinin normal feto-maternal etkileşimin sürdürülmesindeki önemi, klonal olarak genişleyen efektör Treg hücrelerinin, düşüklerde sayısındaki azalma

ile karakterize olması ve klonal olarak genişleyen efektör Treg hücrelerinin sayısının preeklampside belirgin şekilde azalması gerçeğiyle vurgulanmaktadır (77). Yani Treg hücreleri gebelikte feto-maternal arayüzde artar ve lokal, fetal antijen-spesifik toleransı tetiklerken, düşükler ve preeklampsi klonal olarak genişleyen efektör Treg hücrelerinin sayısının azaldığı görülmüştür (78). Bu bulgulardan yola çıkarak gebelikte FoxP3+ Treg hücrelerinin feto-maternal immün toleransı sürdürmede önemli rol oynadıklarını ve sayılarının azalmasının ciddi gebelik patolojileri ve fetüs reddine sebep olduğunu görülmüştür.

Paternal antijen-spesifik tolerans gebelik sırasında mevcuttur ve doğumdan sonra ortadan kalkar (79). Treg hücreleri, paternal antijen-spesifik toleransın indüklenmesinde merkezi bir rol oynar. Doğumdan sonra, paternal antijen-spesifik Treg hücreleri sayıca azalır, ancak kaybolmaz ve aynı partnerle ikinci gebelikte, bu Treg hücreleri ilk gebeliktekinden daha hızlı artar (80) .

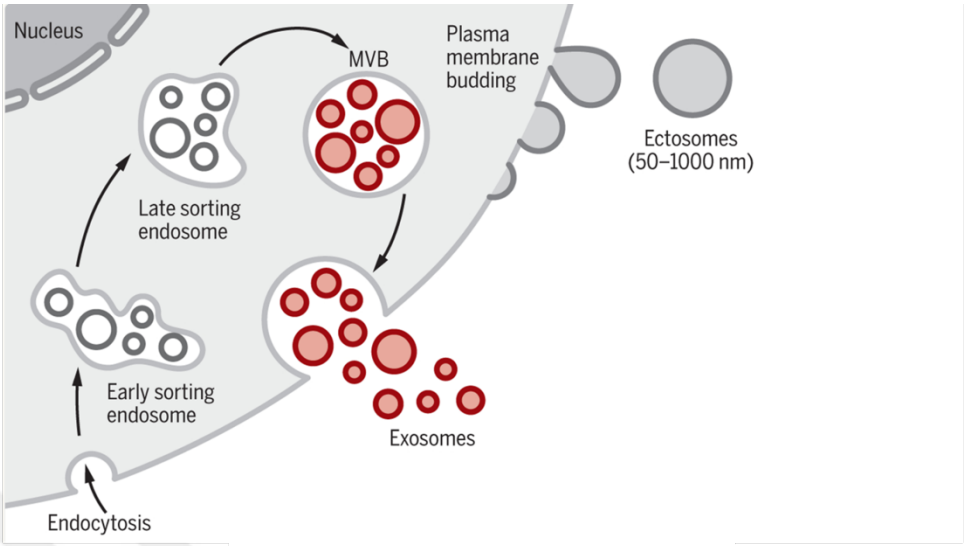
Uzun yıllar boyunca, Treg'lerin güçlü immüno tolerant özelliği, hamilelikteki işlevlerinin araştırılmasını sağlamıştır. Desiduada bulunan Treg hücrelerinin amplifikasyonu, fetal toleransı açıklamak için geniş çapta kabul görmüştür. Fakat bu hücrelerin patolojik koşullarda sayılarının ve fonksiyonlarının değişmesi altında yatan mekanizmalar henüz aydınlatılmış değildir (81). Krop ve ark. Treg hücre sayılarının anormal plasentasyon ve gebelik patolojisi durumunda, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığını göstermiştir. Yine yetersiz Treg sayılarının, idiyopatik infertilite ve tekrarlayan infertilite ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir(82) . Yapılan diğer çalışmalar Treg hücrelerinin implantasyon ve plasentasyon için zorunlu olduğunu göstermiştir. Farelerde yapılan deneyler, CD4+CD25+ Treg hücrelerinin yokluğunda allojenik fetüslerin eşit bir şekilde reddedildiği gösterilmiştir. Fakat maternal MHC' ye sahip fetüsler ise reddedilmediği görülmüştür (83). İnsanda yapılan çalışmalarda ise preeklampside, maternal periferal kan ve desidual dokudaki Treg hücrelerinin azaldığı gösterilmiştir. Yine düşüklerde ve erken doğum vakalarında plasenta dokusunda Treg hücre sayısının azaldığı görülmüştür (84). Başka bir çalışmada ise normal gebeliklerle karşılaştırıldığında, tekrarlayan düşükleri olan kadınlarda hem dolaşım hem de uterin desiduada daha düşük oranda Treg içerdiği gösterilmiştir (81). Ayrıca FoxP3 geninin

endometriumda azalmış ifadesinin IVF başarısıyla ilişkili olabileceği ve bu durum potansiyel olarak sistemik bir bozukluğa işaret edeceği çalışmalar arasında yer almaktadır (85). Sonuç olarak preeklampside, tekrarlayan düşükler, erken doğum, gestasyonel diyabet gibi gebelik patolojilerinde feto-maternal arayüzde bulunan Treg hücre sayısının genellikle kontrolden az olduğu görülmüştür. Gebelik patolojilerinden biri olan maternal hipotiroidide ise FoxP3+Treg hücrelerinin nasıl değiştiği bizim çalışmamıza kadar bilinmemekteydi.

2.4. Eksozomlar

Eksozomlar 30-200 nm çapında, çift membranlı nano veziküllerdir. Hücre-hücre iletişiminden sorumlu olan bu veziküller her hücre tipinden salgılanırlar. Taşıdıkları protein, lipid, mRNA, miRNA gibi biyoaktif moleküllere kargo denir ve bu kargoyu hedef hücrelere taşıyarak onların biyokimyasal süreçlerini değiştirebilmektedirler.

Eksozomlar endozom kökenlidir. Eksozomlar, plazma membranının çift invajinasyonunu ve intraluminal veziküller (ILV) içeren hücre içi multiveziküler cisimlerin (MVB) oluşumunu içeren bir süreçle üretilir. ILV'ler nihayetinde plazma membranına MVB füzyonu ve ekzositoz yoluyla eksozomlar olarak salgılanır (Şekil 4) (86). Plazma zarının ilk içe doğru kıvrılması, hücre yüzeyi proteinlerini ve hücre dışı ortamla ilişkili çözünür proteinleri içeren fincan şeklindeki bir yapı oluşturur. Böylece erken endozom oluşur. Trans-Golgi ağı ve endoplazmik retikulum da erken endozomun oluşumuna ve içeriğine katkıda bulunabilir(87) . Erken endozomlar, geç endozomlara olgunlaşır ve geç endozom mebranlarının içeri doğru invajinasyonu ile MVB oluşur. MVB' ler ya otofagozom ya da lizozomlarla birleşerek degrede olabilir ya da degredasyon yoluna girmeden hücrenin sitoskeletal ve mikrotübül ağı aracılığıyla plazma membranına taşınabilir ve lüminal tarafa yerleşebilir. MVB bağlama proteinleri ile gerçekleşir. MVB membranının invajinasyonu ile ILV'ler yani ilerdeki eksozomlar oluşur. ILV'lerin oluşumunun bir parçası olarak, proteinler (başlangıçta hücre yüzeyinde bulunan) ILV'ler arasında belirgin bir şekilde dağılabilir. İnvajinasyon hacmine bağlı olarak, süreç farklı içeriklere sahip farklı boyutlarda ILV'lere yol açabilir. Hücre membranı ile birleşen MVB' ler ekzositoz ile salınarak eksozomları oluşturur (87,88).



Şekil 4: Eksozomların Biyogenezi (Kalluri ve LeBleu, 2020).

Plasenta Kaynaklı Eksozomlar

Eksozomların embriyo gelişimi, implantasyon, desidualizasyon ve plasentasyon gibi çeşitli üreme süreçlerindeki işlevleri ortaya konmuştur. Ekzosomlar peri-implantasyon ve implantasyon fazı ve gebelik boyunca endometrium ve embriyo arasındaki çift yönlü iletişimin aracılık edilmesinde de rol oynarlar (89).

Plasenta kaynaklı eksozomlar (pEXO), gebeliğin 6. haftasından itibaren anne kanında tespit edilebilir olduğu ve seviyelerinin gebeliğin ilerlemesi ile birlikte artığı gösterilmiştir. Ayrıca önemli bir nokta olarak eksozomların salgılanma paternlerinin ve moleküler yapılarında gebelikle ilişkili komplikasyonlarda değişim gösterdiği görülmüştür. Bu nedenle, eksozomların gebelikle ilişkili hastalıkların teşhisi için potansiyel biyobelirteçler olabileceği düşünülmüştür. Son çalışmalarda ise pEXO'nun başarılı bir gebelik için kritik öneme sahip olan maternal bağışıklık toleransının oluşturulmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir (90).

Plasentada sinsityotrofoblastların, maternal dolaşıma sürekli olarak ekstraselüler veziküller (EV'ler), mikroveziküller ve eksozomlar saldığı gösterilmiştir(91). pEXO'nun,

plasenta dışı hücrelere viral direnç kazandırma, T hücrelerinin tanınmasını ve aktivasyonunu engelleme ve gebelik sırasında makrofaj farklılaşmasını ve polarizasyonunu teşvik etme işlevleri olduğu ileri sürülmüştür.

Eksozomların plazma konsantrasyonunun normal gebe kadınlarda, gebe olmayan kadınlara göre daha yüksek konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir(92). Ayrıca patolojik koşullarda eksozom salınımın genellikle arttığı gösterilmiştir (93). Salomon ve ark. gestasyonel diyabette (GDM) yaptıkları çalışmada, GDM' li bireylerin serumdaki total eksozom miktarının, sağlıklı gebelerinkinden yaklaşık 2 kat fazla olduğunu görmüşlerdir. Gebelik patolojilerinden olan preeklampside yine eksozom salınımının, sağlıklı gebelere göre arttığı görülmüştür (94). Preeklampsi ve GDM'den farklı olarak, preterm doğumdaki pEXO düzeyi, tam dönem gebeliğe kıyasla önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (95).

Son çalışmalar, pEXO'nun eksozomal proteinlerin T hücrelerine aktarılması yoluyla immünosupresyona aracılık ettiğini göstermektedir. T hücresi apoptozuna, T hücresi çoğalmasının inhibisyonuna ve Treg farklılaşmasının indüklenmesine yol açtığı görülmüştür (94).

Treg hücrelerinin farklılaşmasında, eksozomların rolü ilk önce tümör immünolojisinde gösterilmiştir. Tümör kaynaklı eksozomların, T hücresi çoğalmasını, sitotoksik aktiviteleri ve makrofaj polarizasyonunu engellediği tespit edilmiştir (96). Aynı şekilde normal plasentadan perfüzyon yoluyla izole edilen eksozomların, lenfosit çoğalmasını engellediği ve Treg hücrelerinin farklılaşmasını başlattığı rapor edilmiştir (97). Bu bulgular pEXO'ların gebelik sırasında Treg farklılaşmasında modülatörlerden biri olduğunu göstermektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanı Tipi

Araştırmamız tanımlayıcı bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Tıp Fakültesi ARLAB' da gerçekleştirilmiş olup, plasenta örneklerinin eldesi Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1: Araştırma planı.

Mart- Haziran 2023	Literatür taraması ve projenin yazımı
Ağustos 2023	TÜBİTAK proje kabulü
Ağustos 2023	Etik Kurul Onayı
Kasım 2023	Proje bütçesinin gelişi
Aralık 2023- Mart 2024	Malzeme alımı
Nisan- Ağustos 2024	Örnek toplanması ve paralel olarak laboratuvar çalışmaları
Eylül 2024	Verilerin değerlendirilmesi
Ekim – Kasım 2024	Tez yazımı
Aralık 2024	Makale yazımı
Aralık 2024	Tez sunumu

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Kontrol (n=15) ve Hipotroidi (n=13) grupları olmak üzere çalışmamız 2 gruptan oluşmaktadır. Gebelerin yaş aralığı 20-35 olarak belirlenmiştir. Çalışma öncesi hastalardan onam formu alınmıştır. Hastaların tıbbi kayıtlarına ve sağlık durumu anketine verdikleri yanıtlara bağlı kalınarak, Konjenital/edinsel kalp rahatsızlığı, obezite, multipl

gebelik, diabetes mellitus, hipertansiyon ve sigara kullanımı gibi yerleşik risk faktörleri olan hastalar çalışma dışı tutulmuşlardır (98,99).

3.4. Çalışma Materyali

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğine başvuran gebelerin atılacak olan plasentalarından alınan doku parçaları kullanıldı.

3.5. Araştırmanı Değişkenleri

Araştırmamızın bağımlı değişkeni plasentalarda tespit ettiğimiz değerlerdir. Bağımsız değişken ise plasentaları toplanan bireylerin tiroid hormon değerleridir.

3.6.Veri Toplama Araçları

İnsan Plasenta Dokusunun Toplanması

Plasenta dokusu Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümünden elde edilmiştir. Kontrol (n=15) ve Hipotroidi (n=13) grupları olmak üzere plasentalar toplanmıştır.

Kontrol grubu için sağlıklı gebelerden alınan plasentalar kullanılırken, Hipotroidi grubu için TSH serum konsantrasyonu ve serbest T3 ve T4 referans değerlerine bakılarak (ilk trimesterde TSH>2,5 mIU/L ve ikinci trimesterde TSH>3,0 mIU/L) subklinik hipotiroidi tanısı konmuş 20-35 yaş aralığındaki gebelerden seçilmiştir (100,101). Kliniğe gelen subklinik hipotiroidili gebe sayısı daha fazla olduğu için tercih edilmiştir. Bununla birlikte Konjenital/edinsel kalp rahatsızlığı, obezite, multipl gebelik, diabetes mellitus, hipertansiyon ve sigara kullanımı gibi yerleşik risk faktörleri olan hastalar çalışma dışı tutulmuştur (98,99). Kontrol ve Hipotiroidili bireylerin yaşları birbiri ile uyumlu olacak şekilde seçilmiştir.

Plasenta Dokusunun Hazırlanması

Alınan plasenta dokusunun 5 farklı bölgesinden her biri yaklaşık 20 gram ve 1cm kalınlığında fetal ve maternal bölgeyi içerecek şekilde tam kat doku örnekleri alındı. Bu dokular soğuk 1XPBS ile yıkanarak kan tamamen uzaklaştırıldı. Daha sonra alınan bu dokular 2 parçaya bölünerek histolojik değerlendirmeler ve ELISA çalışması için ayrıldı. Histolojik değerlendirmeler için kullanılacak dokular %4' lük formaldehitte 48 saat fikse

edildi. Elisa için kullanılacak dokular ise cryo tüplere alınarak ELISA yapılana kadar -80 ^{0}C 'de saklandılar (102).

Histolojik çalışmalar için formalin ile fikse edlien dokular. Fiksasyon sonrası fiksatifin uzaklaştırılması için bir gece akan musluk suyu altında bekletildi. Daha sonra işlemlerin hepsi 60 ^{0}C inkübatör içinde olmak üzere; dehidrasyon işlemi için artan alkol serilerinin (%70' ten %96'ya) her birinde 20 dk, ardından 20' şer dakika 3 aseton değişimi ve 30 dk 2 ksilol değişiminden sonra 1'er saat sıvı parafinde bekletildiler ve sonra parafine gömülerek doku blokları haline getirildiler.

Doku bloklarından mikrotom ile 5 μm' lik kesitler alınarak H&E ve İmmunohistokimyasal (IHC) değerlendirmeler için kullanılmıştır. Hem H&E boyaması hem de IHC için, her doku bloğundan 3'er kesit alınarak değerlendirme yapılmıştır.

H&E Boyaması ve Dokuların Histomorfolojik İncelenmesi

Hematoksilen&Eozin boyaması için kesitler azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra distile suda bekletildi ve hematoksilen ile 1 dk boyandıktan sonra musluk suyu ile yıkanarak eozin boyası ile 30 sn boyandı. Eozin ile boyanan örnekler artan alkol serilerinden geçirildi ve şeffaflandırma işlemi için 3 seri ksilolden her birinde 20'şer dakika olmak üzere inkübe edildi. Son olarak entellan ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelenmeye hazır hale getirildi. Görüntüler ışık mikroskobu ile Euromex Image Focus 4.0 programı kullanılarak alındı ve kaydedildi. Her bir kesitten 10x büyütmede 5 farklı alan çekilerek değerlendirme yapıldı. Histomorfolojik değerlendirme için plasenta sinsityal nod, intravillöz hemoraji ve kalsifikasyon bölgelerine göre hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılarak değerlendirildi (103). Plasentadaki patolojik bulgulara göre kontrol ve hipotiroidi grupları karşılaştırılarak skorlama yapıldı. Bu skorlama için 0 puan (patolojik bulgu yok), 1 (hafif patolojik bulgular), 2 (orta derecede patolojik bulgular) veya 3 (ciddi patolojik bulgular) olmak üzere kalsifikasyonlar, sinsityal düğümler ve intravillöz kanamalar açısından dokular değerlendirildi (Tablo 2) (20,104).

İmmunohistokimyasal (IHC) Değerlendirmeler

IHC için Scytek (SensiTek HRP Anti-Polyvalent) kit kullanılarak, kit prosedürü takip edildi. Kısaca; lam üzerindeki 5μm' lik doku kesitleri antijen geri kazanımı için

%10’ luk Sitrat tamponda 10 dakika mikrodalgada kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Daha sonra dokuların etrafı pappen ile çizilerek 1xPBS ile 3 kere yıkandı. Dokudaki endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için %3’ lük hidrojen peroksit (H2O2) ile 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonra 1xPBS ile yıkanan kesitlere primer antikor 1/100 seyreltilerek uygulandı. Primer antikor ile kesitler 1 gece 4^0C’ de inkübe edildi. Ertesi gün 1xPBS ile yıkanan kesitlere anti-mouse biotinli sekonder antikor solüsyonu uygulandı ve 20 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 3 kere 1xPBS ile yıkandı. Yıkama basamağından sonra Streptavidin/HRP solüsyonunda 20 dk oda sıcaklığında bekletildi ve görselleştirme için DAB uygulandı. Fazla DAB distile su ile yıkanarak dokudan uzaklaştırdı ve karşıt boya olarak Hematoksilen uygulandı. Hematoksilenin fazlası musluk suyu ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra örnekler ışık mikroskobunda Euromex Image Focus 4.0 programı kullanılarak görüntülendi (105). Plasenta doku kesitlerinde FoxP3+ hücrelerin işaretlenmesi FoxP3 proteini işaretlendi (106). Bu amaçla anti-FoxP3 (anti-mouse monoclonal, Bioss) antikoru kullanıldı. Eksozomların işaretlenmesi için ise anti- CD63 (anti-mouse monoclonal, Invitrogen) antikoru kullanıldı (107). Trofoblastları işaretlemek için ise anti-Ck7 (Sitokeratin 7) (anti-mouse, cell signaling) antikoru kullanıldı. Antikorlar IHC için 1/100 dilüsyonunda uygulandılar. IHC işaretleme sonrası desiduada FoxP3 pozitif alanlar ImageJ programı kullanılarak yüzde olarak belirlendi. Koryon villuslarındaki CD63 pozitif alanlar ise histolojik skorlama ile belirlendi. Bu skorlama için boyama olmayan alanlar **0,** zayıf boyanan alanlar **1**, orta derecede boyanan alanlar **2** ve kuvvetli boyanan alanlar **3** olmak üzere puanlandı (104). Her kesitte desidua için 10x büyütmede rastgele 5 alan ve villuslar için ise 20x büyütmede rastgele 4 alan seçilerek değerlendirme yapıldı.

İmmünofloresan (IF) Değerlendirmeler

Lizinli lamlara üzerine 5µm kalınlığında kesitler alındı ve bir gece inkübe edildi, ksilenle deparafinize edil ve dereceli (%98, %96, %80 ve %70) etanol serisinde rehidrate edildi. Daha sonra kesitler 10 mM sitrat tamponunda (pH 6,0) mikrodalga fırında 15 dakika kaynatıldı. Bu işlem bittikten sonra kesitler 20 dakika soğumaya bırakıldı. Kesitler 1xPBS ile 3 kere yıkandı. Otofloresansı engellemek için %1’ lik sodyum bromür hidrat

(NaBr hidrat) ile 15dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 1xPBS ile 2 kere yıkandı. Permebilizayson için %0,25' lik Triton-x ile 20dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra kesitler, spesifik olmayan bağlanmayı engellemek için 1 saat boyunca %5'lik goat serum ile inkübe edildi. Yıkama yapılmadan kesitler hem rabbit poliklonal FoxP3 (Bioss-10211r/ dilüsyon 1/100), hem de mouse monoklonal sitokeratin 7 (Ck7) (BT-MCA0434/dilüsyon 1/100) ile işaretlenmek için 90dk 37^0C' de inkübe edildiler. Inkübasyon sonrası kesitler 1xPBS ile 3 kere yıkandı. Yıkama işleminden sonra sekonder atikorlar olan anti-rabbit Alexa-Flour 488 ve anti-mouse Alexa-Flour 594 uygulanarak ve 90dk 37^0C' de inkübe edildiler. Tekrar 1xPBS ile 3 kere yıkandıktan sonra DAPI' li medium (Thermo 00-4959-52) ile kapatıldılar. Son olarak Floresan Mikroskop (Olympus BX61) ile görüntüler alındı.

ELISA

Elisa için -80 ^{0}C' de saklanan dokular çıkarılarak çözüldü. Fazla kanı uzaklaştırmak için dokular küçük parçalara bölündü ve soğuk 1x PBS ile yıkandılar. Daha sonra her doku için 0,2 mg tartılarak dokular ayrı tüplere yerleştirildi ve RIPA solüsyonu (her 1ml Ripa solüsyonu için 10µl proteaz inhibitörü eklendi) eklenerek Tissue Lyser II (Qıagen, West Sussex, UK) ile 3 dk homojenize edildikten sonra 5000xg' de +4 ^{0}C' de 7 dk santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant alınarak proteinler ileriki işlem için -80 ^{0}C' de saklandı. Daha sonra dokulardan izole edilen total protein miktarları BCA kit (Elabscience) ile ölçüldü. ELISA için Elabscience ELISA kiti kullanıldı (FoxP3 için cat no: E-EL-H1104, CD63 için cat no: E-EL-H2428) ve kit prosedürü takip edildi. Kısaca; standartlardan ve protein miktarları belirlenen örneklerden her kuyucuğa 100µl eklendi. FoxP3 proteini için dilüsyona gerek duyulmazken CD63 1/100 oranında seyreltildi ve 90dk 37^0C' de inkübe edildiler ve sonra kuyulardan sıvılar uzaklaştırılarak biyotinli antikor eklendi 1 saat 37^0C' de inkübasyon sonrası 3 kez yıkama tamponu ile yıkama yapıldı. HRP konjuge antikor eklenerek 30 dk 37^0C' de inkübe edildikten sonra 5 yıkama yapıldı. 90µl HRP substratı eklenerek 15dk 37^0C' de bekleme sonrası stop solüsyon eklenerek 450nm OD' de ölçüm alındı.

İstatistiksel Analiz

Veriler en az üç biyolojik tekrardan elde edilen ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. Gruplar arası karşılaştırmalar için parametrik olmayan Mann–Whitney U testi kullanılmıştır.Tüm deneylerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler GraphPad Prism (Version10.0) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Şekillerdeki yıldız işaretleri anlamlılık seviyelerini göstermektedir: *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ ve ***$p < 0.005$.

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Veriler en az üç biyolojik tekrardan elde edilen ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. Gruplar arası karşılaştırmalar için parametrik olmayan Mann–Whitney U testi kullanılmıştır. Tüm deneylerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler GraphPad Prism (Version10.0) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Şekillerdeki yıldız işaretleri anlamlılık seviyelerini göstermektedir: *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ ve ***$p < 0.005$.

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları

Kliniğe başvuran maternal hipotiroidili hasta sayısının azlığı, örnek eldesini ve projenin zamanında sonlanmasını zorlaştırmıştır.

3.9. Etik Kurul onayı

Çalışmamız "Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu" tarafından "09.08.2013 8254/GOA" dosya numarası ile kabul edildi (**Ek 2**). Araştırmaya katılan gönüllülerden alınan onam formu örneği ektedir **(Ek 3).**

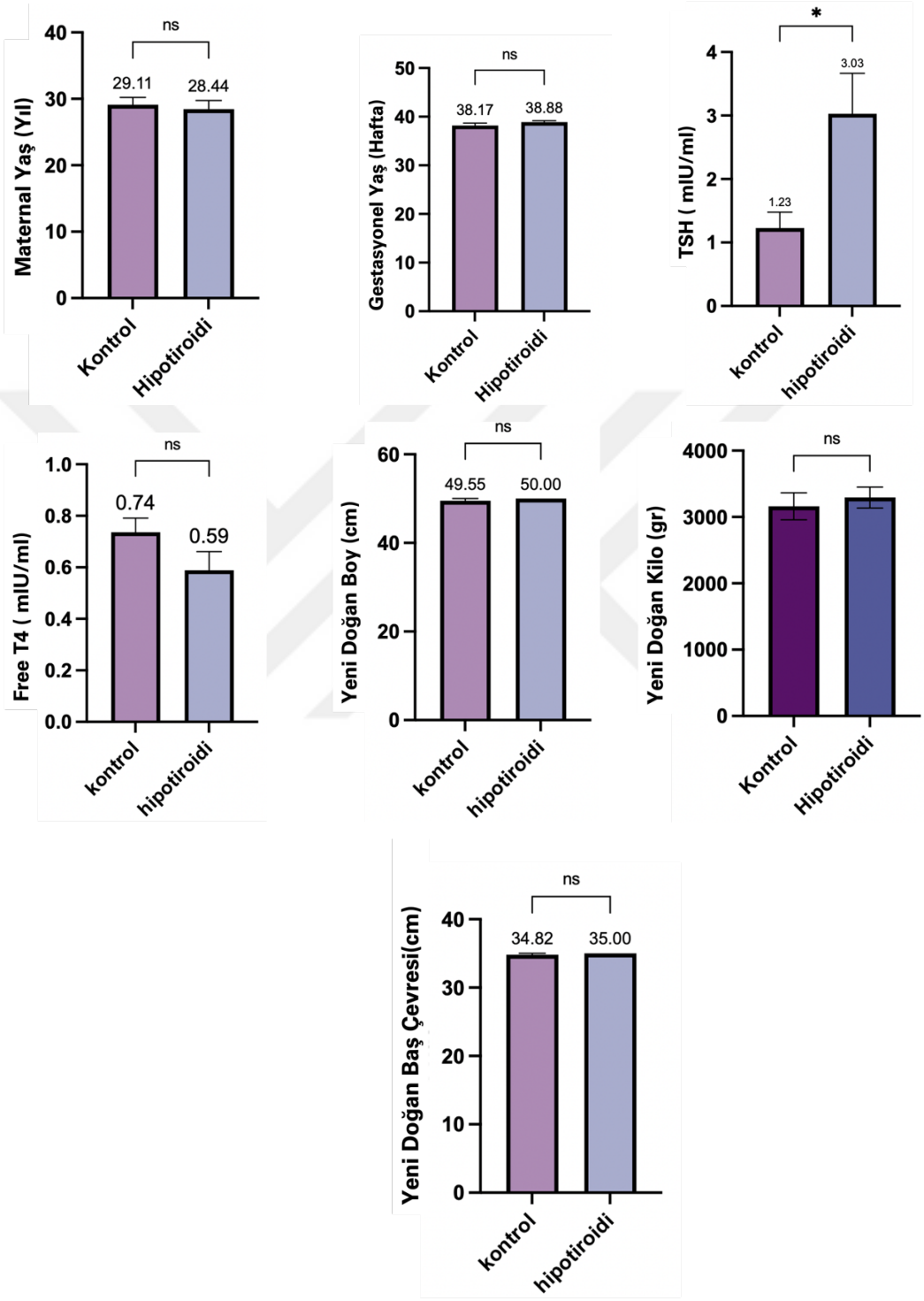
4. BULGULAR

4.1. Morfolojik Değerlendirme

Morfolojik değerlendirme için annelerin yaşı, gebelik haftası, TSH ve serbest T4 değerleri, yeni doğanda için boy, baş çevresi ve ağırlık değerlendirildi.

	Kontrol	**Hipotiroidi**	**P ≤0,05**
Maternal yaş (yıl)	29,11±1,09	28,44±1,31	$0,557^{ns}$
Gestasyonel yaş (Hafta)	38,17±0,51	38,88±0,31	$0,249^{ns}$
TSH (mIU/ml)	1,23±0,24	3,03±0,63	0,04*
Serbest T4 (mIU/ml)	0,74±0,05	0,59±0,07	$0,12^{ns}$
Yeni doğan ağırlığı (gr)	3161,36±203	3293,33±157	$0,615^{ns}$
Yeni doğan boyu (cm)	49,55±0,45	50±0,00	$0,09^{ns}$
Yeni baş çevresi (cm)	34,82±0,18	35±00	0.09^{ns}

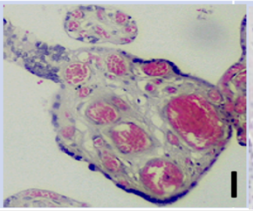
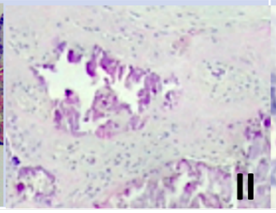
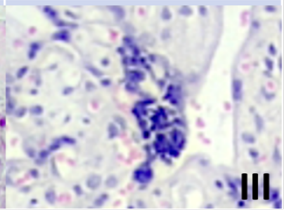
Tablo 2: Morfolojik veriler



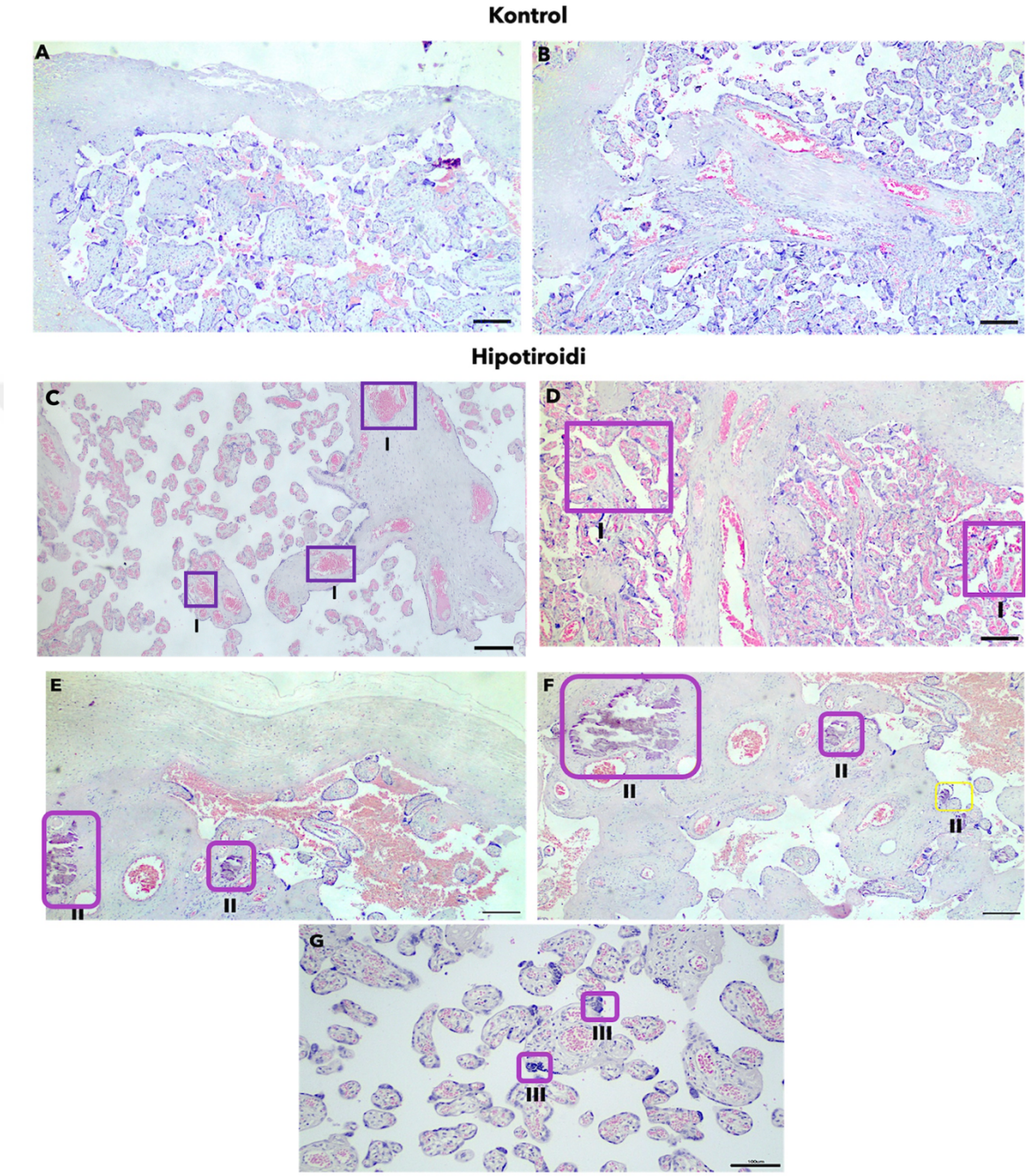
Grafik 1: Morfolojik veriler (* P ≤0,05, ns: non-significant).

4.2. Histomorfolojik Bulgular

Histomorfolojik değerlendirme için Kontrol ve Hasta grup plasentaları sinsityal düğüm, intravillöz hemoraji ve kalsifikasyon varlığı bakımından değerlendirildi. Sinsityal düğüm, terminal villusun yüzeyindeki sinsityal çekirdeklerin kümeleridir. Artmış sinsityal düğümler uteroplasental malperfüzyon (dokunun yeterince kanlanmaması) durumlarıyla ilişkilidir ve plasental muayenede önemlidir (108). Kalsifikasyon ise, plasenta üzerinde küçük, yuvarlak kalsiyum birikintilerinin birikmesiyle, plasentanın yavaş yavaş bozulmasına neden olduğu kalsifiye bir plasenta oluşması durumudur. Gebeliğin sonuna doğru süreç doğal olarak gerçekleşir. Ancak plasental kireçlenme 36. haftadan önce meydana gelirse ya da bu alanlar sayıca çok artarsa, anne ve bebek için komplikasyonlara neden olabilir. Bununla birlikte kalsifikasyonun çok fazla olması plasenta abnormalitesi ile ilişkilidir (109). İntravillöz kanama ise herhangi bir villusta villöz stroma içinde kanamadır. İntravillöz kanama, plasentanın akut hipoksik olayının bir belirtisidir ve plasental parankim enfarktüsünün erken bir evresi olarak ortaya çıkar. Plasentada hipoksiye neden olur(110) .

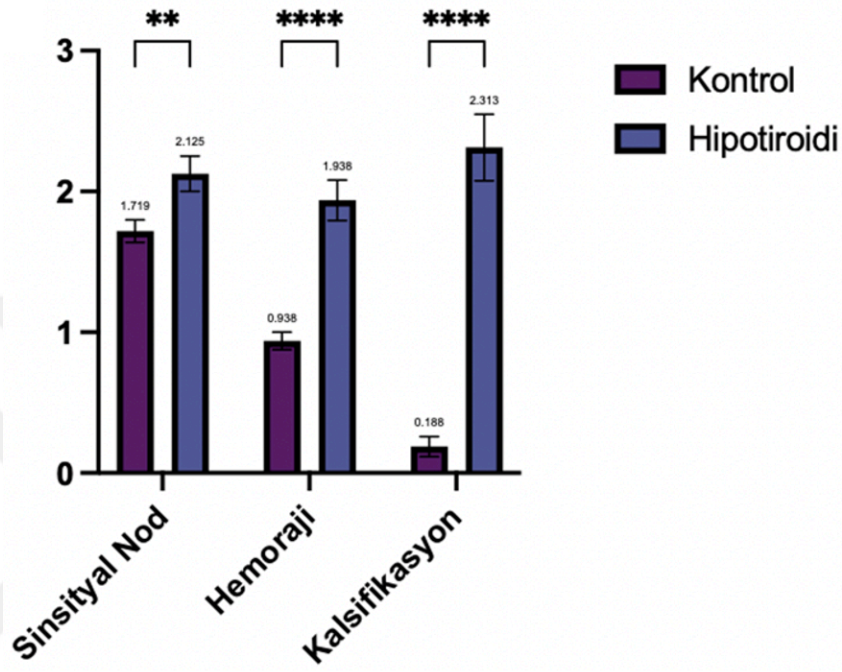
	Hemoraji	Kalsifikasyon	Sinsityal nod
Kontrol	0.93± 0.06	0.18± 0.07	1.71± 0.08
Hipotiroidi	1.93± 0.14*	2.31± 0.23*	2.12± 0.12*
Temsili görsel			

Tablo 3: Histomorfolojik skorlama.



Şekil 5: Plasenta Dokularının İntravillöz hemoraji, Sinsityal nod ve Kalsifikasyon Kriterleri Bakımından Histomorfolojik İncelenmesi. I- İntravillöz hemoraji, II- Kalsifikasyon, III - Sinsityal nodu göstermektedir. (A) ve (B) Kontrol (C-G) Hipotirodi grubu. (Ölçek çubuğu A-F. 200 µm, G. 100 µm)

skorlama için 0 puan (patolojik bulgu yok), 1 (hafif patolojik bulgular), 2 (orta derecede patolojik bulgular) veya 3 (ciddi patolojik bulgular)



Grafik 2: Histomorfolojik skorlama. Hemoraji, sinsityal nod ve kalsifikasyon kriterleri için histomorfolojik skorlama. (Konrol ve Hipotiroidi grubu karşılaştırıldığında *P<0.001' dir.)

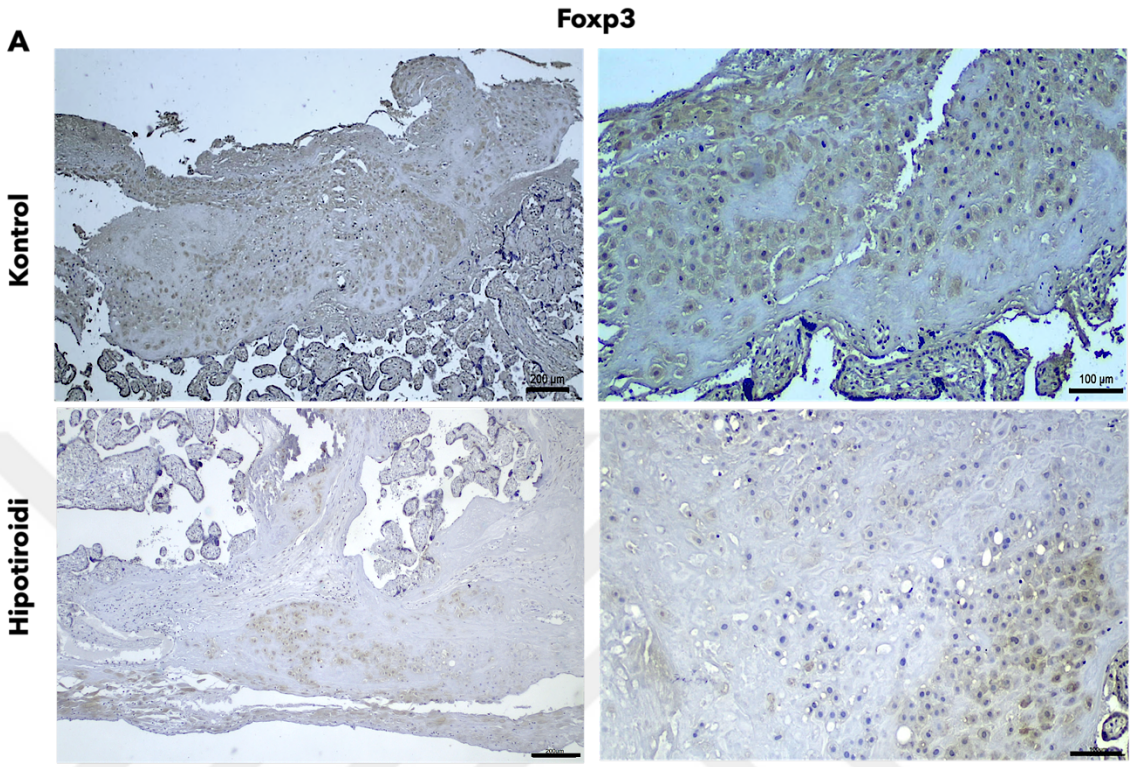
İntervillöz hemoraji ve sinsityal nod alanları karşılaştırıldığında (Şekil 5C, 5D, 5G), özellikle hipotiroidili bireylerin plasentalarında bu alanların arttığı görüldü. (İntervillöz hemoraji hipotiroidili plasentada 1.93 ± 0.14*, kontrol grubunda 0.93 ± 0.06, p<0,001. Sinsityal nod, hipotiroidili plasentalarda, 2.12 ± 0.12* kontrol grubunda 1.71 ± 0.08, p<0,001).

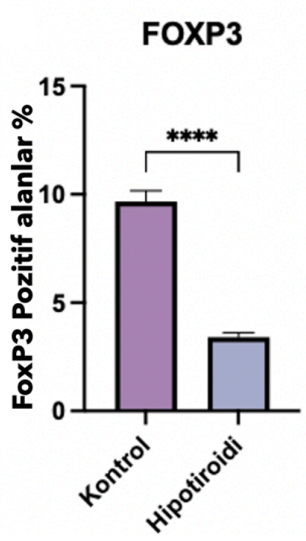
Kalsifikasyon alanlarının (Şekil 5E, 5F) ise kontrol grubuna göre hipotiroidili gruplarda oldukça artmış olduğu gözlemlendi. (Kalsifikasyon 2.31 ± 0.23*, kontrol 0.18 ± 0.07, p<0,001).

Bulgularda görüldüğü gibi total histomorfolojik skorlama, hipotiroidili grup plasentalarında değerlendirilen patolojik kriterlerin, kontrole göre anlamlı bir şekilde arttığını gösterdi. ($p<0,001$).

4.3. İmmünohistokimyasal (IHC) Bulgular

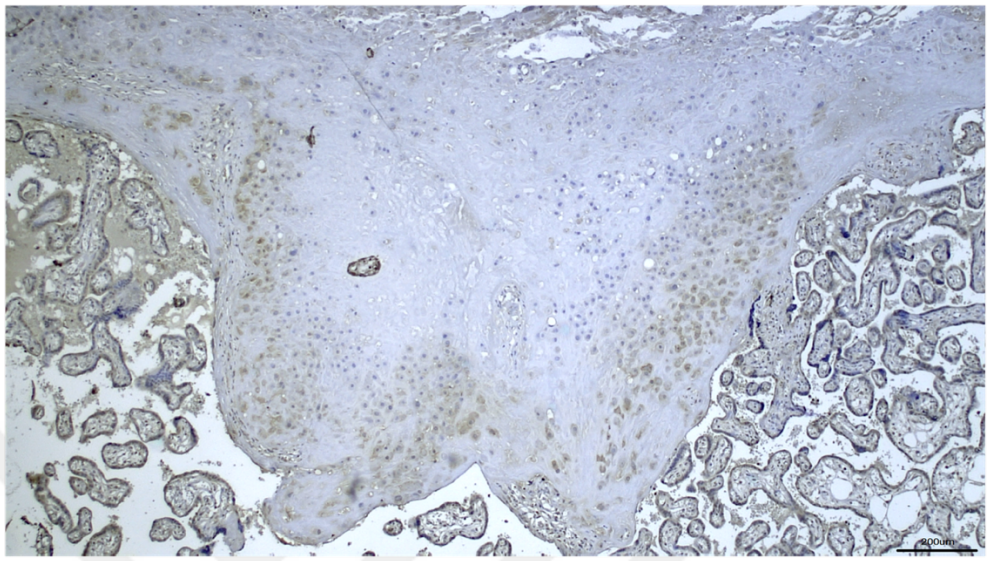
Kontrol ve hipotiroidili plasenta dokularından alınan feto-maternal ara yüz kesitleri, FoxP3+ hücreleri ve eksozomları saptamak için sırasıyla anti-FoxP3 ve anti-CD63 antikorları kullanılarak işaretlendi. Desiduada maternal immün toleransın değerlendirilmesi amacıyla FoxP3 pozitif alanları saptandı. Bunun için Image J programı kullanıldı. Program ile kahverengi olan FoxP3 pozitif alanlar saptanarak yüzdeleri hesaplandı (Şekil 6). Bu sonuçlara göre, FoxP3 immunoreaktivitesi kontrol yani sağlıklı plasentalar ile karşılaştırıldığında, hipotiroidili plasentalardaki ifadesinin anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü (Kontrol 9,6 ±0,4 Hipotiroidi 3,4±0,2 *$p<0,001$) **(Grafik 2).** Şekil 6A' dan kontrol grubunda FoxP3 pozitif hücrelerin desiduada geniş bir yayılım gösterdiği görülmektedir. Hipotiroidi grubunda ise FoxP3 ifadesinin kontrole göre azaldığı ve yayılımının çok daha sınırlı olduğu izlenmektedir.



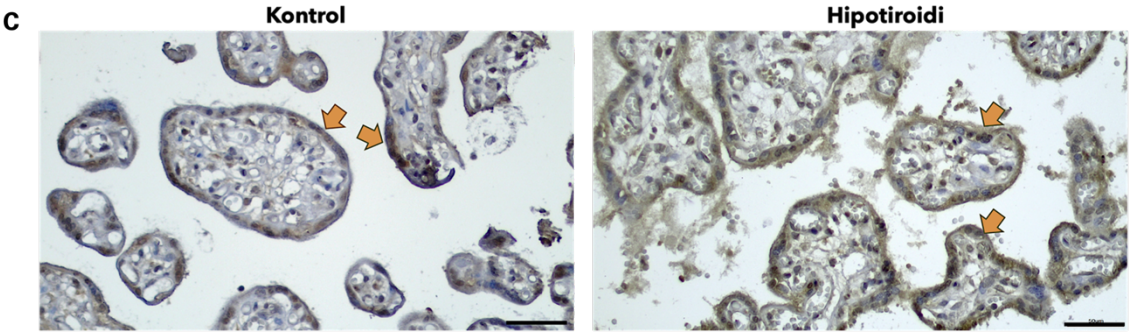


Grafik 2: FoxP3' nin plasenta dokusundaki immünoreaktivite skor grafiği (*p<0,05).

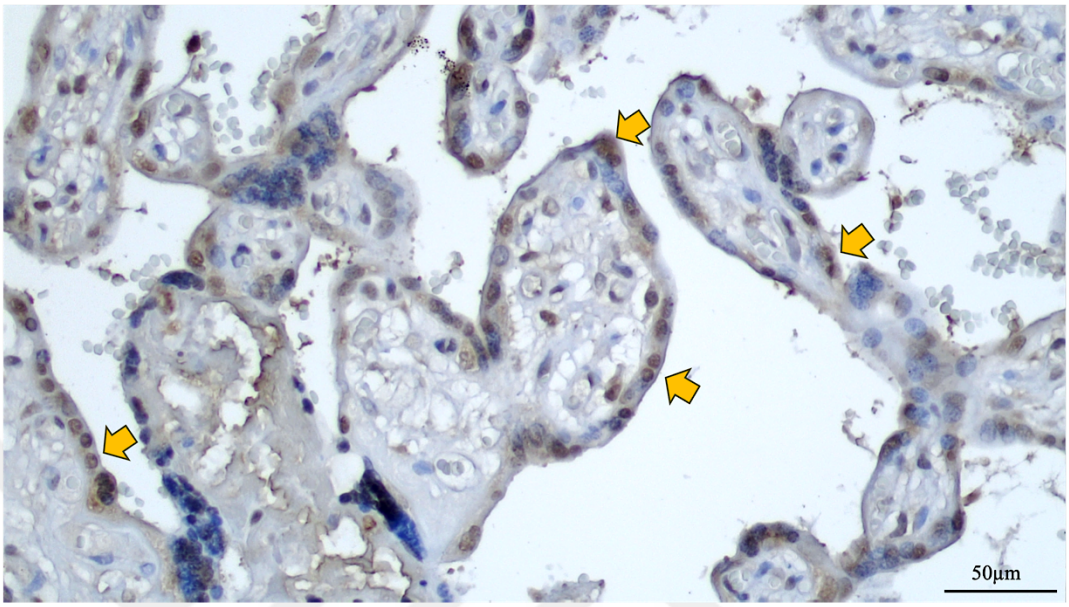
B



C



D

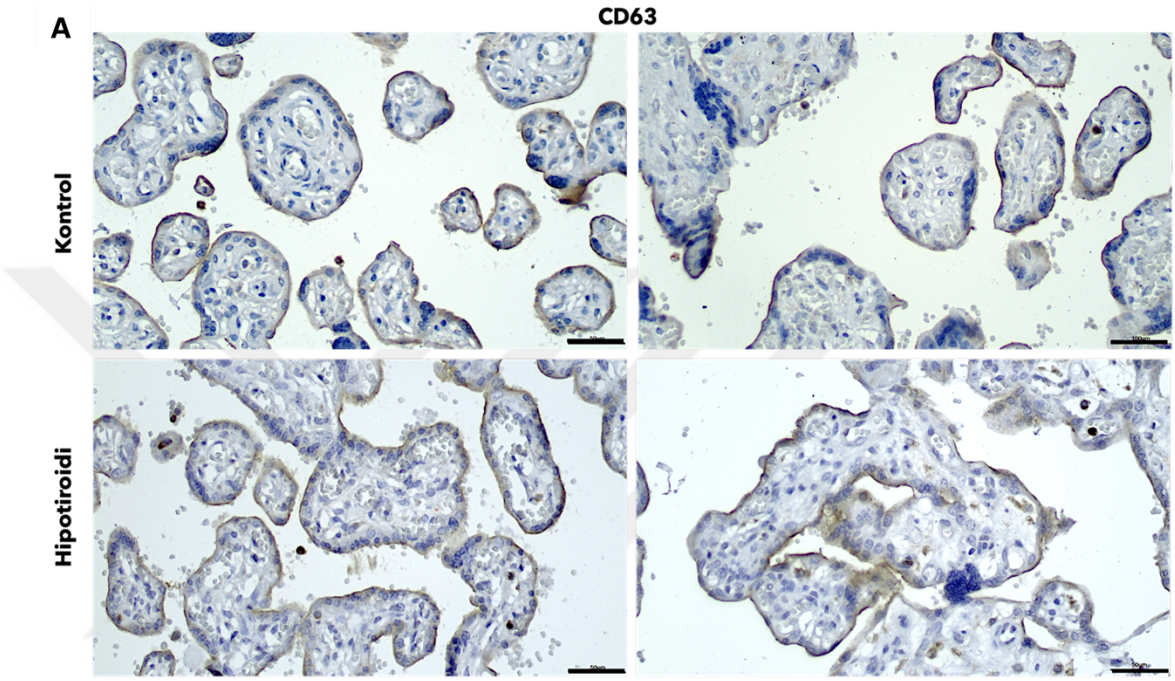


Şekil 6: Kontrol ve Hipotiroidi plasentalarında FoxP3 immünohistokimyasal işaretlemesi. A. Kontrol ve Hipotiroidi grup plasentaların desidua bölgesinde FoxP3 pozitif alanlar. (Ölçek çubuğu sırasıyla 200µm ve 100µm) B. FoxP3 pozitif hücrelerin bazı bölgelerde koryon villuslarına yakın yerleşimli olduğu görülmüştür. (ölçek çubuğu 200 µm) C-D. Kontrol ve Hipotirodi gruplarında koryon villuslarında FoxP3 ifadesi. Turuncu oklar FoxP3 pozitif trofoblastları göstermektedir. (ölçek çubuğu 50 µm).

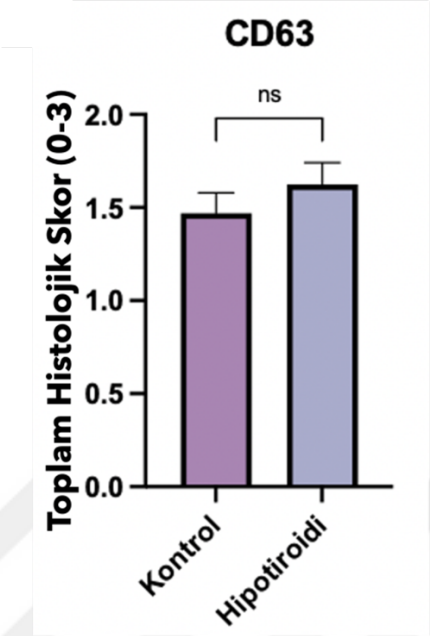
Bununla beraber koryon villuslarında da hem kontrol hem de hipotiroidili grupta FoxP3 ifadesi izlenmiştir. FoxP3' ün özellikle trofoblastlarda lokalize olduğu görülmüştür. (Turuncu oklar) **(Şekil 6B).**

Daha sonra koryon villuslardaki CD63 pozitif alanlar değerlendirmek için kontrol ve hipotiroidili plasentalarda eksozom markerı olan CD63 proteini anti-CD63 antikoru ile işaretlenerek fetüsten salgılanan eksozom paterninin bu patolojide değişip değişmediği incelenmiştir. IHC bulguları hem kontrol hem de hasta grupta özellikle villusların en dış kısmında yani trofoblastlarda CD63 pozitif alanlar olduğunu göstermiştir. CD63' ün özellikle trofoblastlarda, trofoblastlardan ise sinsityotrofoblastlarda immünoreaktivite gösterdiği görülmüştür (Şekil 7A). Kontrol ve hipotiroidi grubu bu immünreaktivite

açısından karşılaştırıldığında, histolojik skorlama sonucunda CD63 ifadesi bakımından iki grup arasında anlamlı bir fark görülememiştir **(Grafik 3).**



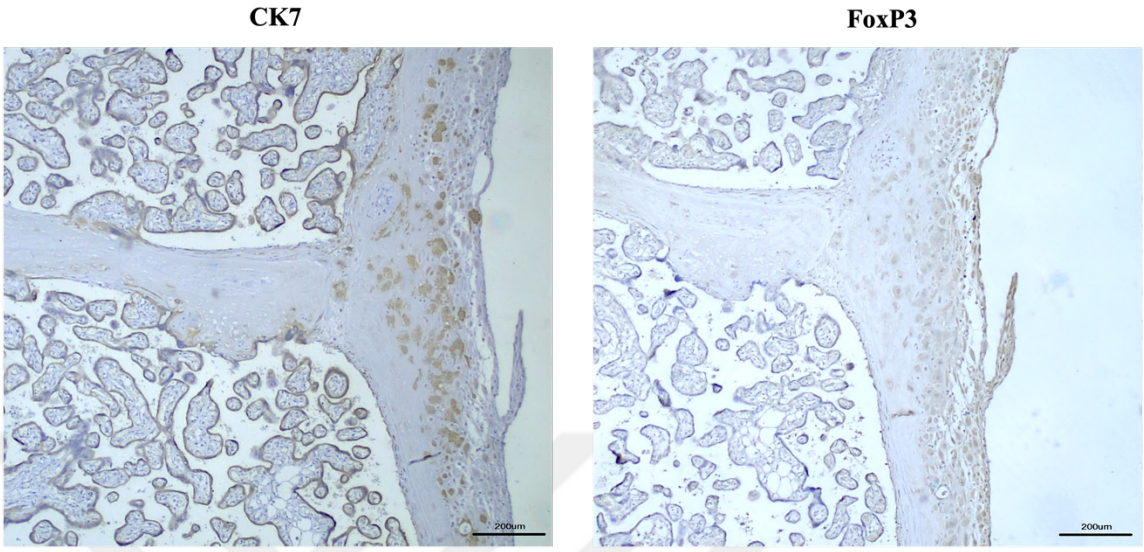
Şekil 7: Kontrol ve Hipotiroidi plasentalarında koryon villuslarında CD63 immünohistokimyasal işaretlemesi. Kontrol ve Hipotiroidili plasentaların, koryon villuslarında CD63 pozitif alanlar. (Ölçek çubuğu 50µm).



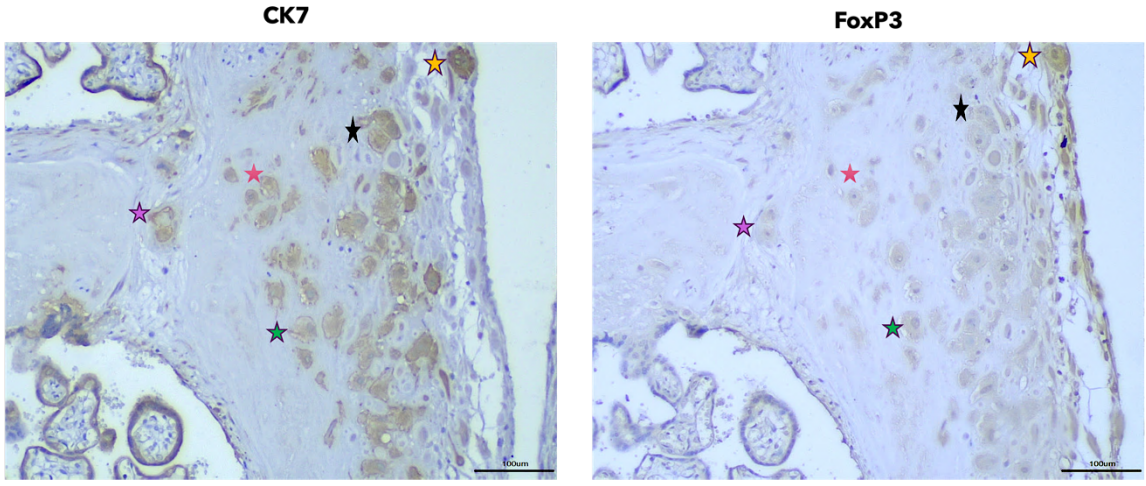
Grafik 3: CD63'ün plasenta dokusundaki immünoreaktivite skor grafiği (*p<0,05).

4.4. Seri Kesit Yöntemi ile FoxP3 ve CK7 İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

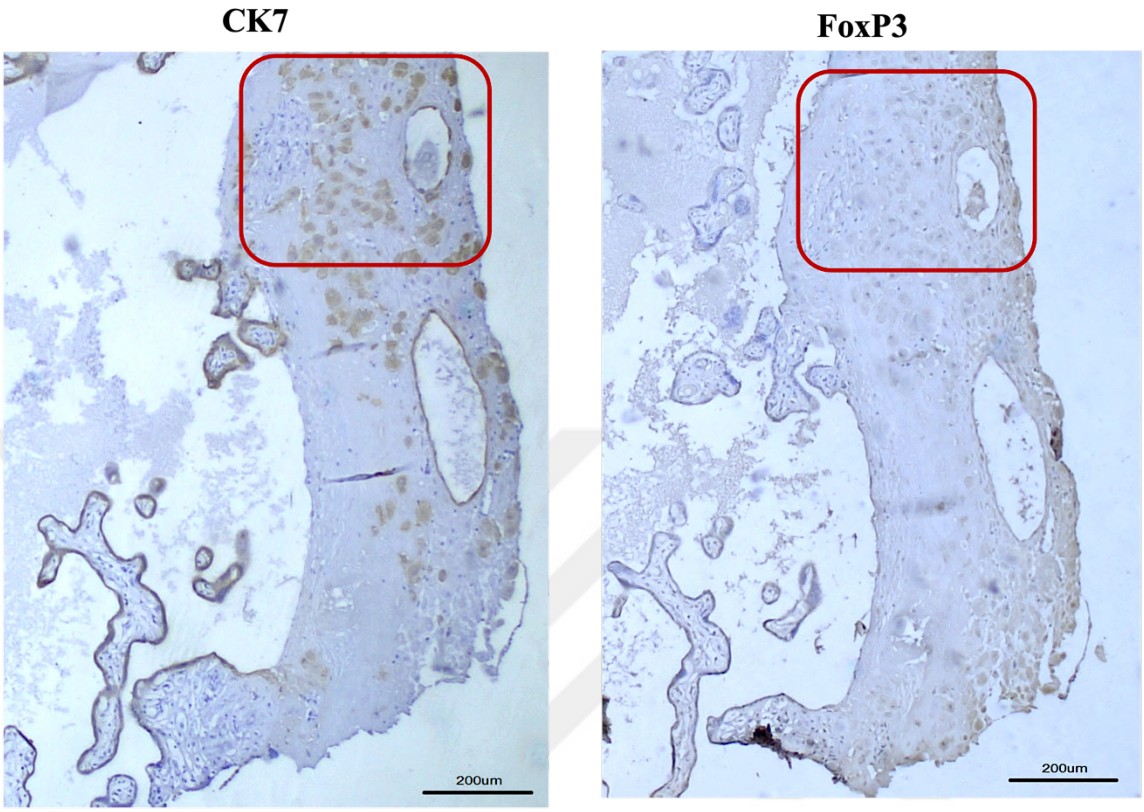
IHC bulgularında, desiduada tespit edilen FoxP3 pozitif hücrelerin çoğunun boyutlarının büyük olması nedeni ile trofoblast olup olamayacakları değerlendirildi. Bunun için plasenta dokularından seri kesitler alınarak bu kesitlerden biri FoxP3 diğeri ise CK7 trofoblast markerı ile işaretlenerek kesitler birbiri ile karşılaştırıldı. Bu değerlendirme hem kontrol hem de hipotiroidi grubu için gerçekleştirildi (Şekil 9- Şekil 13).



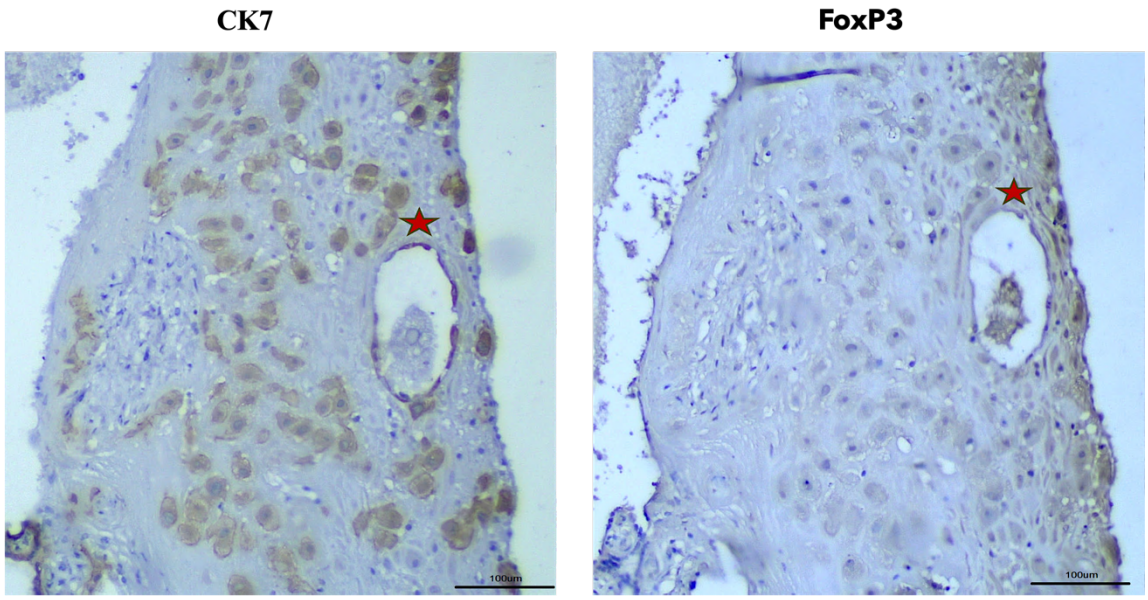
Şekil 8: Hipotiroidi grubu seri kesitlerde CK7 ve FoxP3 immünohistokimyasal boyanması. (Ölçek çubuğu 200µm).



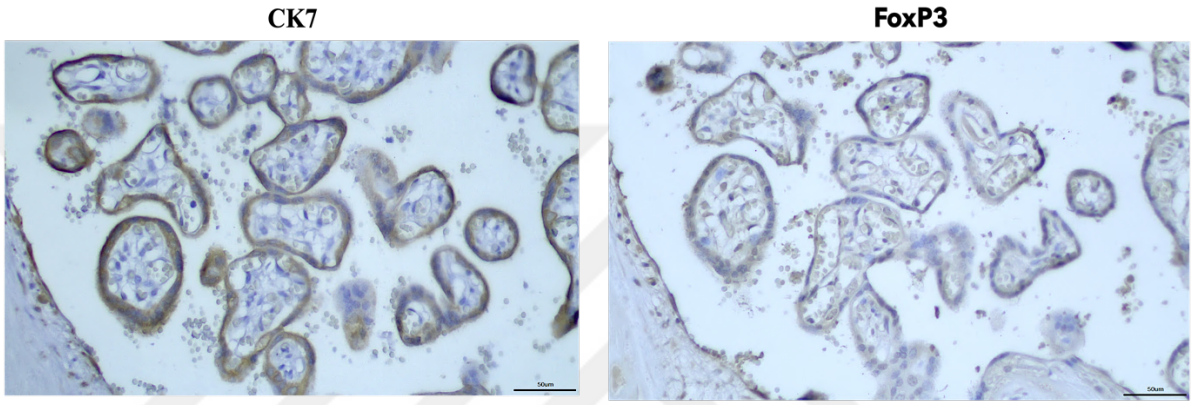
Şekil 9: Hipotiroidi grubu seri kesitlerde CK7 ve FoxP3 immünohistokimyasal boyanması. Burada Şekil 8' deki görsel büyütülmüştür ve seri kesitler karşılaştırıldığında çoğu hücrenin bire bir örtüştüğü yani CK7 pozitif hücrelerin aynı zamanda FoxP3 bakımından da pozitif oldukları görülmüştür. (Yıldızlar bire bir örtüşen hücre konumları ile ilgili bilgi vermektedir). (Ölçek çubuğu 100µm).



Şekil 10: Kontrol grubu seri kesitlerde CK7 ve FoxP3 immünohistokimyasal boyanması. Ölçek çubuğu 100µm.



Şekil 11: Kontrol grubu seri kesitlerde CK7 ve FoxP3 immünohistokimyasal boyanması. Şekil 10' da kırmızı kare içine alınan alanlar büyütülmüştür. Kırmızı yıldız ile işaretlenen alanda yan yana bulunan 2 hücre, 2 kesit arasında double pozitif olan hücrelerin sadece ikisine örnektir. Hücrelerin çoğunun CK7 ve FoxP3 açısından pozitif olduğu görülmektedir (Ölçek çubuğu 100µm).

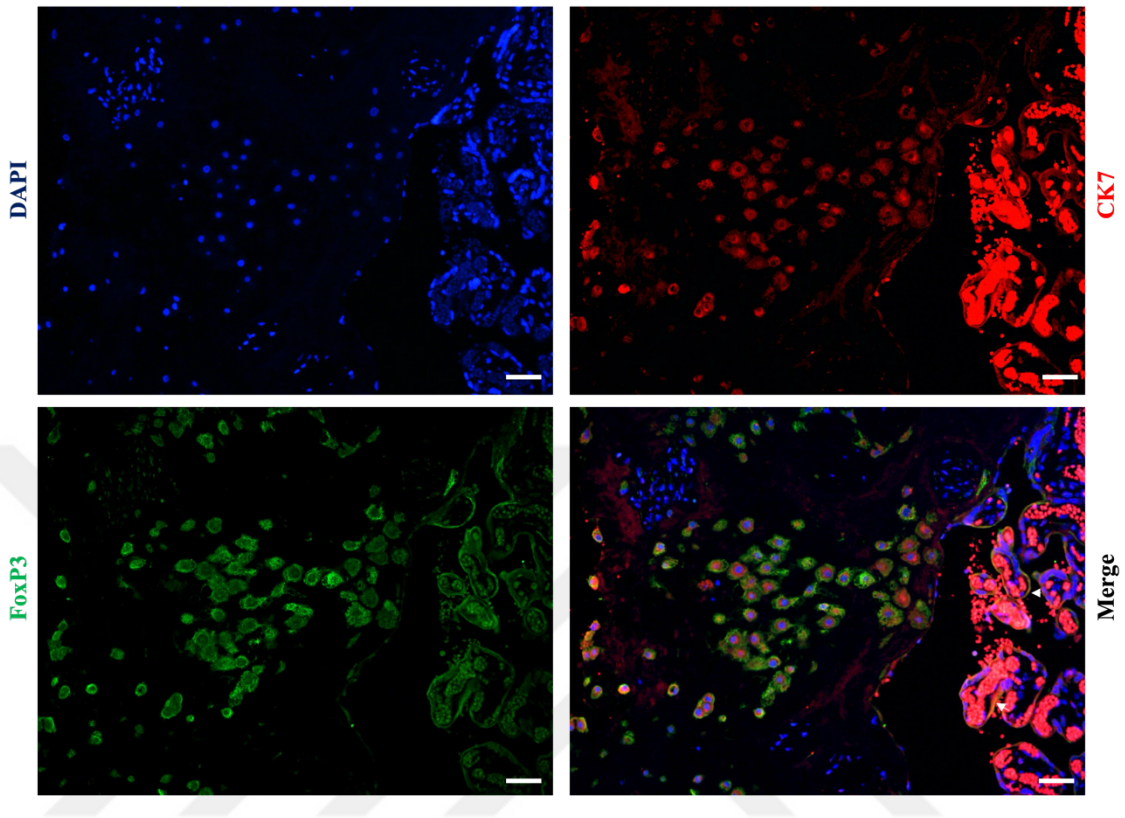


Şekil 12: Kontrol grubu seri kesitlerde koryon villuslarında CK7 ve FoxP3 immünohistokimyasal boyama. Koryonik villuslarda CK7 trofoblastların FoxP3 bakımından da pozitif olduğu görülmektedir. (Ölçek çubuğu 50µm).

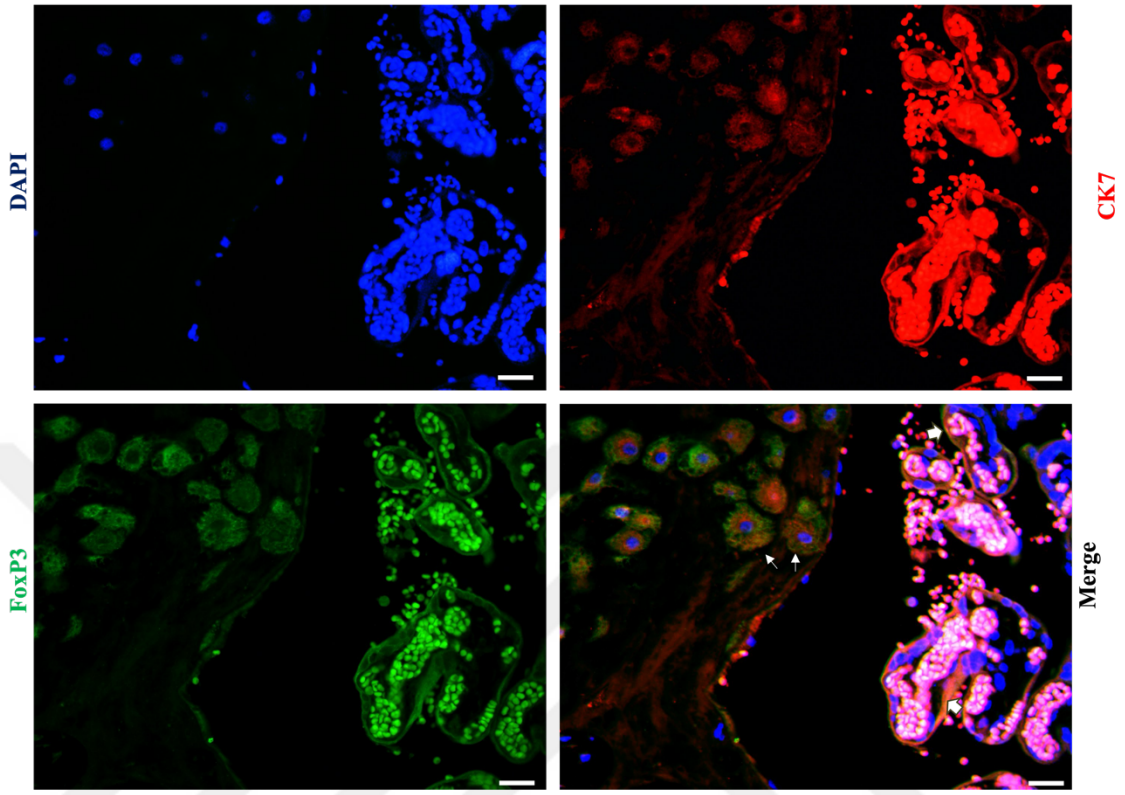
Seri kesitler değerlendirildiğinde FoxP3 ifade eden hücrelerin çoğunun, aynı zamanda CK7 pozitif olduğu görüldü. Yani desiduayı invaze eden CK7 trofoblastların çoğunun hem hipotiroidi hemde kontrol gruplarında FoxP3 ifade ettiği izlendi.

4.5. İmmünofloresan (IF) değerlendirmeleri

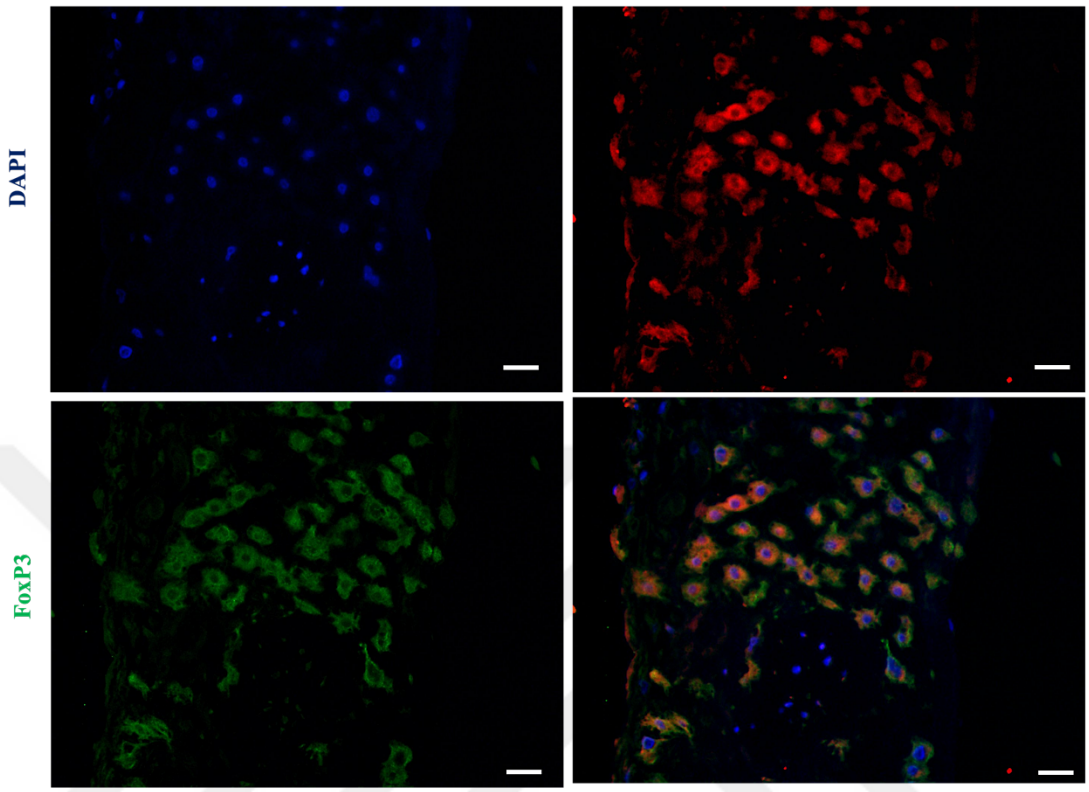
Seri kesitlerden alınan sonuçlar aynı zamanda IF ile değerlendirildi. Böylece immünofloresan işaretleme ile FoxP3 ve CK7' nin aynı kesit üzerinde double boyaması gerçekleştirildi.



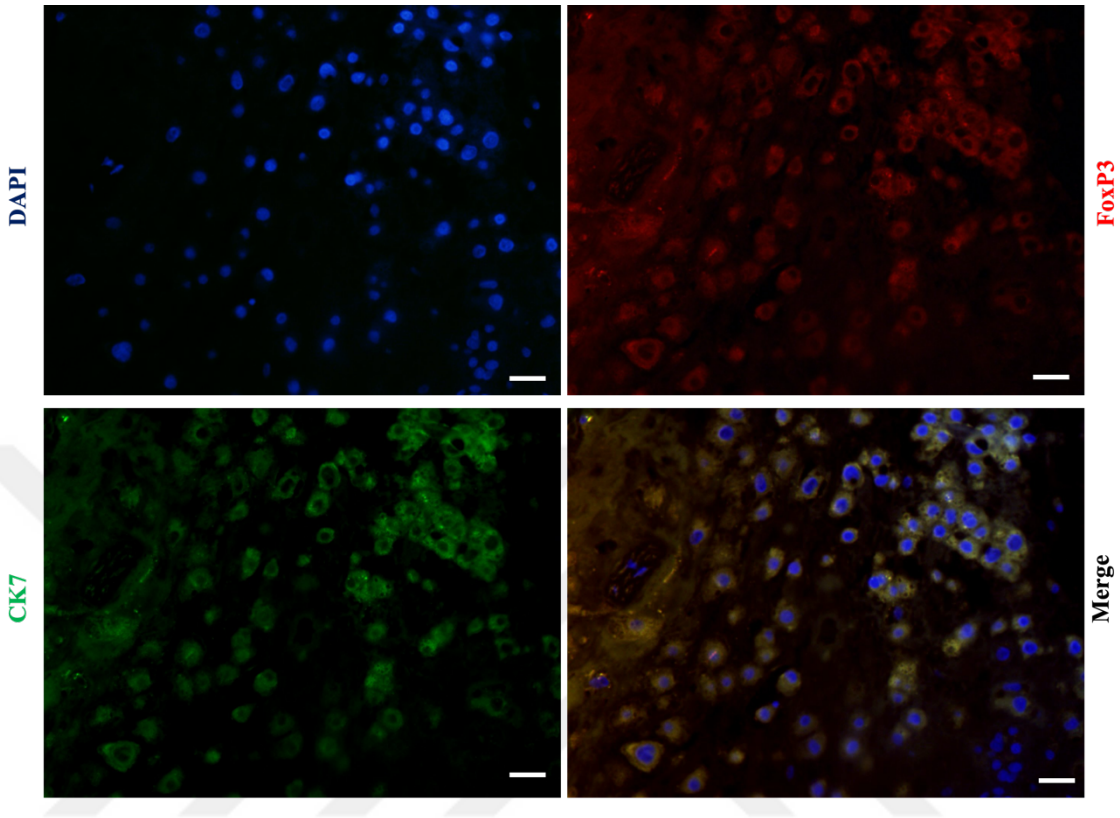
Şekil 13: Kontrol grubu Feto-maternal bölgeyi gösteren kesitlerde CK7 ve FoxP3 immünofloresan görüntüleri (20X). DAPI (mavi), FoxP3 (yeşil), CK7 (kırmızı). Görüntülerin üst üste getirildiği görüntüde (merge) desiduadaki çoğu hücrenin hem FoxP3 hem de CK7 için pozitif olduğu görülüyor. Beyaz oklar koryon villuslarındaki trofoblastlarda, FoxP3 ve CK7 için pozitif olan alanları gösteriyor. (Ölçek çubuğu 50µm.)



Şekil 14: Kontrol grubu Feto-maternal bölgeyi gösteren kesitlerde CK7 ve FoxP3 immünofloresan görüntüleri (40X). DAPI (mavi), FoxP3 (yeşil), CK7 (kırmızı). Merge görüntüde beyaz oklar desiduada CK7 ve FoxP3 idafe eden hücrelerden bir kaçını göstermektedir ayrıca villuslardaki CK7 ve FoxP3 ko-lokalize alanlar yine beyaz oklarla gösterilmiştir. (Ölçek çubuğu 20µm.)



Şekil 15: Hipotiroidi grubunda desiduada CK7 ve FoxP3 immünofloresan görüntüleri (40X). DAPI (mavi), FoxP3 (yeşil), CK7 (kırmızı). Merge görüntüde CK7 ve FoxP3 double pozitif hücreler görünmektedir. (Ölçek çubuğu 20µm.)

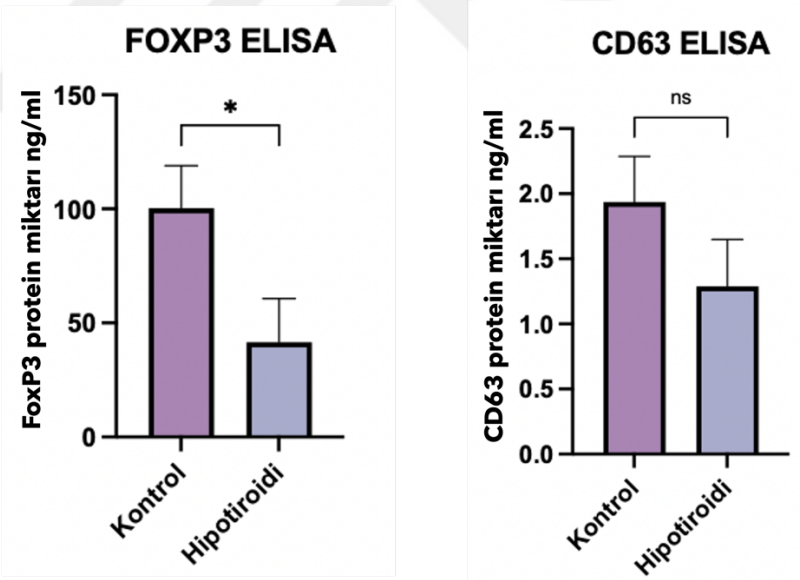


Şekil 16. Desiduada CK7 ve FoxP3 immünofloresan görüntüleri. (40X). DAPI (mavi), FoxP3 (kırmızı), CK7 (yeşil). Burada bu kez FoxP3 kırmızı ve CK7 yeşil dalga boylarında floresan konjuge sekonder antikor kullanarak tekrar işaretlenerek daha önce yapılan immünfloresan işaretlemelerinden alınan görüntülerin farklı sekonder antikorlar ile doğrulaması yapılmıştır. Desiduadaki hücrelerin çoğunun bu iki protein bakımından da pozitif olduğu merge görselde görülmüştür. (Ölçek çubuğu 20µm.)

Sonuç olarak IF bulguları, seri kesitlerden alınan bulguları desteklemiştir. Bu sonuçlara göre hem hasta hem de kontrol grup plasentasında, desiduada ve koryonik villuslarda bulunan CK7 pozitif trofoblastların çoğunun FoxP3 ifade ettiği görülmüştür.

4.6. Plasenta Dokusunda FoxP3 ve CD63 Protein Miktarlarının ELISA yöntemi ile Değerlendirilmesi.

Plasenta dokusunda FoxP3 ve CD63 ifadelerinin protein seviyesinde belirlenmesi için ELISA yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem için -80 ^{0}C 'de saklanan dokular çözülerek total protein izolasyonu yapılmış ve sonra her örnek için BCA yöntemi ile izole edilen total protein miktarı hesaplanmıştır. ELISA sonuçlarına göre FoxP3 protein miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Hipotiroidi grubunda anlamlı bir şekilde azalmıştır. (Kontrol 100,2 ±18, Hipotiroidi 41,6 ± 19 *p<0,001). CD63 protein miktarı ise gruplar arasında değişmemiştir (Kontrol 1,9 ± 0,3 Hipotiroidi 1,2 ± 0,3) anlamlı bir fark görülmemiştir. Sonuç olarak ELISA sonuçları ile IHC sonuçları uyumlu olarak bulunmuştur.



Grafik 4: FoxP3 ve CD63 ELISA sonuç grafiği.

	KONTROL	HİPOTİROİDİ	P ≤0.05
FoxP3	100,2 ±18	41,6 ± 19	0.001
CD63	1,9 ± 0,3	1,2 ± 0,3	0.415

Tablo 4. FoxP3 ve CD63 ELISA verileri.

5. TARTIŞMA

Gebelikte hipotiroidizm, genellikle yüksek TSH ve bazen düşük T4 olarak tanımlanmaktadır. Serumda TSH seviyesinin artmasının ise düşük riskini arttırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bununla beraber maternal hipotiroidinin fetal büyüme geriliğine, düşük doğum ağırlığına, erken doğuma ve nörolojik gelişim problemlerine yol açtığı bilinmektedir (27). Bahsedilen gebelik patolojilerinin genellikle abnormal plasentasyon sonucu oluştuğu rapor edilmiştir. Çalışmalar anormal plasentasyon gösteren kadınlarda, anormal tiroid hormonu seviyeleri olduğunu tespit etmiştir (37).

Sağlıklı bir gebelikte maternal immün sistem allojenik fetüse karşı tolerans geliştirmektedir. Bu tolerans sayesinde gebelik başarılı bir şekilde devam edip sonlanabilmektedir. FoxP3+ hücreler bu toleransın oluşması ve devamında rol alan immünsupresif hücrelerdir. FoxP3 ifadesi Treg hücre fonksiyonu ile ilişkilidir ve FoxP3 ifadesinin immünusupresif fonksiyonların bozulmasına sebep olarak immün toleransın bozulması ve sonucunda birçok gebelik patolojine neden olmaktadır (111).

FoxP3+ hücreler birçok gebelik patolojisinde incelenmiş olmasına rağmen anne ve fetüs üzerinde ciddi negatif etkileri olduğu bilinen maternal hipotiroidide daha önce hiç araştırılmamıştır. Aynı şekilde FoxP3 Treg hücre gelişiminde, farklanmasında ve anne-fetüs arasındaki iletişimde ve immün toleransta rol aldığı bilinen ve patolojik durumlarda salınım paterninin değiştiği ve bunun da genellikle artış olarak rapor edildiği (112) eksozomlarda daha önce hipotiroidide incelenmemiştir.

Biz bu çalışmada sağlıklı gebelerle, maternal hipotiroidili gebelerin plasentasında FoxP3+ hücreleri ve CD63+ eksozomların varlığını ve dağılımını inceleyerek hipotiroidiye katkısını araştırdık. Özellikle desidua maternal immün toleransı değerlendirmek için FoxP3+ hücreler açısından değerlendirilirken, fetal eksozomların maternal dokudaki immün toleransa katkısını anlamak için eksozomlar, koryon villuslarında değerlendirilerek feto-maternal immün toleransa katkıları anlaşılmaya çalışılmıştır.

Daha önce maternal hipotiroidide, feto-maternal arayüzde FoxP3 ifadesi ve eksozom davranışları üzerine bir çalışma bulunmadığı için çalışmamızdan elde ettiğimiz

sonuçları ancak diğer gebelik patolojilerinden alınan veriler ile karşılaştırarak değerlendirdik.

FoxP3+ Treg hücreleri daha çok preeklampside araştırılmış olup, bu çalışmaların da büyük kısmı periferal kandan yapılmıştır, desiduayı inceleyen araştırma sayısı ise çok azdır. Kandan Treg hücreleri flow sitometri kullanılarak CD4, CD25 ve FoxP3 işaretlenerek saptanırken, in situ yani dokuda bu iş daha zordur ve FoxP3 kullanılarak yapılır. Günümüze kadar yapılan çalışmaların çoğu FoxP3'ün Treg hücreleri yerinde tanımlamak için en iyi belirteç olduğunu ortaya koymuştur (50) . Bunun için doku çalışmalarında Treg hücrelerini tanımlamak için araştırmacılar genelikle FoxP3 ifadesini değerlendirmişlerdir.

Preeklampsi (PE), maternal spiral arterlerin yetersiz trofoblast invazyonu, bozulmuş plasental perfüzyon ve yaygın endotel hücre disfonksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bu patolojinin altında yatan nedenler henüz netlik kazanmamış olmasına rağmen ortaya çıkan kanıtlar, gebelik sırasında sitokin aracılı endotel hasarına karşı aşırı maternal inflamatuar yanıtın PE patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu gözlemler de PE'nin kısmen immün sistemi aracılığıyla gerçekleşebileceğini göstermektedir (38). Periferik kandan yapılan bazı çalışmalar preeklampside Treg hücre sayısının azaldığını göstermişlerdir (113,114). Yine preeklampside periferal kandan yapılan başka çalışmalarda ise gruplar arasında bir fark tespit edilmediğini rapor edilmiştir (115,116). Bu nedenle bu çalışmaların sonuçları hala tartışmalıdır.

Desiduada yapılan az sayıda çalışmalardan birinde Tilburgs ve ark. sağlıklı gebe kadınların desiduasında feto-maternal arayüzde Treg hücrelerinin yoğunlukta bulunduğunu ve insanlarda Treg'ler desiduada birikir ve aktif ve baskılayıcı bir fenotip gösterir demişlerdir(117) . Bu grup ayrıca desidual Treg hücrelerinin sayısının sağlıklı term gebeliklerde anne ve fetüs arasındaki HLA uyumsuzluğunun derecesiyle ilişkili olduğunu bildirmiştir; bu da Treg hücrelerinin allojenik bir fetüsün anne tarafından kabulünü kolaylaştırmak için lokal olarak hareket ettiği fikrine daha fazla güvenilirlik kazandırmaktadır (118)

Chen ve ark. preeklampside ve kontrol grubundan aldıkları plasentaların feto-maternal arayüzlerindeki Treg hücre miktarını değerlendirmek için FoxP3 antikoru ile

işaretlemişlerdir. Sağlıklı grup ile karşılaştırdıklarında FoxP3+ hücre sayısının preeklampside azaldığını göstermişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak preeklampsinin feto-maternal immün toleransla ilişkili olabileceğini söylemişlerdir (38). Sonuç olarak preeklampside FoxP3 ekspresyonunun azalması, Treg sayısının azaldığını ve anne ve fetüs arasında immünolojik toleransın dengesizleşmesine yol açabileceğini ve dolayısıyla preeklampsinin patogenezinde rol oynayabileceğini söylemişlerdir (38).

Quinn ve ark. PE ve sağlıklı gebeliklerden elde ettikleri plasentanın feto-maternal arayüzündeki Treg hücrelerini FoxP3 ile işaretleyerek değerlendirmişler. Buldukları sonuçlarda FoxP3+ Treg hücre sayısının PE' li gebelerin desiduasında azaldığını görmüşler. Ayrıca sağlıklı gebeliğin ilk, ikinci trimester ve term dönemdeki plasentalarından elde ettikleri verilere göre, desiduada en fazla sayıda FoxP3+Treg hücresinin bulunduğu gebelik dönemini ikinci trimester olarak belirlemişler (119) .

Winger ve ark. düşüklerde ve erken doğum vakalarında periferal kanda Treg hücre sayısının azaldığı göstermişlerdir (84). Başka bir çalışmada ise normal gebeliklerle karşılaştırıldığında, tekrarlayan düşükleri olan kadınlarda hem dolaşım hem de uterin desiduada daha düşük oranda Treg içerdiği gösterilmiştir (81).

Bizde çalışmamızda maternal hipotiroidili grup ile sağlıklı grubu kaşılaştırdığımızda desisuada FoxP3 pozitif hücrelerin miktarının kontrole göre azaldığını gözlemledik. ELISA sonuçlarımızda IHC sonuçlarımız ile uyumluydu. Bu sonuçlara dayanarak FoxP3+ hücrelerin Maternal hipotiroidi' de azalarak feto-maternal immün toleransın bozulmasına katkı sağladığını söyleyebiliriz. Yapılan diğer çalışmalarda patolojik koşullarda FoxP3 ifadesinin azalmasının klinik bir önemi olabileceğini vurgulamışlardır. Ayrıca patolojik koşullarda azalmasının immün homeostazinin bozulması ile büyük oranda ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Bu nedenle trofoblastlardaki FoxP3 ifadesi, maternal immün sistem gelişimi ve sürdürülmesine katkı sağlıyor olabileceği düşünülmektedir. Bu bulgulardan yola çıkarak FoxP3'ün trofoblastların normal ve anormal proliferasyonu, invazyonu ve farklılaşmasındaki kesin fonksiyonunu tanımlamak ve trofoblastlarda eksprese edilen FoxP3'ün plasenta gelişimi ve başarılı gebelikteki rolünü belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bu bulguların yanında yaptığımız immünohistokimyasal işaretlemenin sonuçlarında, FoxP3 ifadesinin desidual hücreler ve koryon villuslarındaki trofoblastlarda olduğunu gözlemledik. Trofoblastların FoxP3 ifade edip etmediğini doğrulamak için plasenta örneklerini CK7 trofoblast markerı ile işaretledik. İşaretleme sonucunda desiduada CK7 pozitif olan çok sayıda hücre görüntüledik. Bunlar desiduayı invaze eden trofoblastlardı ve daha önce FoxP3 ifade eden hücreler ile benzer lokasyon ve benzer morfolojiye sahiplerdi. Desiduada bulunan bu CK7 pozitif trofoblastların FoxP3 ifade edip etmediğini anlamak için öncelikle seri kesitler alarak bu kesitlerden birini immünühistokimyasal teknikle CK7 diğer kesiti ise aynı teknikle FoxP3 için işaretledik. Kesitler birbiri ile karşılaştırıldığında CK7 ve FoxP3 pozitif olan hücrelerin büyük bir kısmının birebir örtüştüğünü gözlemledik. Daha sonra bu sonuçları double işaretleme yaparak immünofloresan (IF) teknik ile tekrar doğruladık. Bu yöntemde aynı anda CK7 ve FoxP3 proteinleri farklı renkte floresan konjuge sekonder antikorlar kullanılarak görüntülendi. IF sonuçları seri kesit sonuçlarını doğrulayarak desiduadaki FoxP3 pozitif hücrelerin büyük kısmının CK7 pozitif trofoblastlar olduğunu gösterdi. Aynı şekilde koryon villuslarında da trofoblastların FoxP3 ifade ettiğini görüntüledik.

Yapılan az sayıda çalışmada, bizim çalışmamızla korele olarak FoxP3 ifadesinin trofoblastlarda olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalardan ilki Chen ve ark. tarafından yapılmıştır. Kontrol ve PE grubu plasentaları FoxP3 açısından değerlendiren araştırmacılar yaptıkları IHC sonucunda koryon villusları ve desiduanın FoxP3 ifade ettiğini söylemişlerdir. Fakat desiduada FoxP3 ifade eden hücreleri tanımlamamışlardır (38).

Bir diğer çalışmayı Hu ve ark. yapmıştır. Bu çalışmada tekrarlayan gebelik kayıplarında ve kontrol grubundan alınan plasentalar karşılaştırılmış ve FoxP3 miktarının kontrole göre daha düşük olduğu görülmüştür. Aynı zamanda FoxP3 ifadesinin hem desiduadaki hem de koryon villuslarındaki trofoblastlarda olduğunu IHC ve flow sitometri sonuçlarına dayanarak söylemişlerdir. (49).

Son olarakta Ersoy ve ark.(104) yaptığı çalışmada PE ve sağlıklı gebelerde feto-maternal arayüzde Treg hücrelerinin miktarlarını değerlendirmiştir. Treg hücrelerini saptamak için FoxP3' ü kullanmışlardır. Desiduada FoxP3+ Treg hücrelerinin

bulunduğunu fakat 2 grup arasında fark görmediklerini rapor etmişlerdir. Daha sonra IHC sonuçlarında FoxP3 ifadesinin koryon villuslarındaki trofoblastlarda olduğunu farketmişlerdir. Desiduayı bu bakımdan değerlendirmeyen araştırmacılar sadece koryon villusları için IF tekniği kullanarak double işaretleme yapmışlar ve bu 2 proteinin trofoblastlarda ifade olduğunu görerek, koryon villuslarındaki trofoblastlar FoxP3 ifade ediyor demişlerdir (104).

Trofoblastların FoxP3 ifade etmesi araştırmacılar tarafından şöyle açıklanmaya çalışılmıştır. FoxP3' ün trofoblastlardaki ifadesi, trofoblastların proliferasyon ve invazyon davranışları ve plasenta gelişimi ile ilişkili olabilir. FoxP3, Treg hücrelerinin bir belirteci olarak tanımlanmıştır ve immünomodülasyon işlevlerinin temel belirleyicisidir. Normal gebelikte, Treg hücreleri fetal antijenlere karşı toleransın indüklenmesinde temel rol oynar (120). FoxP3'ün Treg hücrelerindeki güçlü immünosüpresif fonksiyonu göz önüne alındığında, trofoblastlarda ifade edilen FoxP3' ün Treg hücrelerine benzer immünosupresif etkilere sahip olabileceği ve Treg hücrelerinin fonksiyonlarını taklit etmesinin feto-maternal toleransın yeni bir mekanizması olabileceği düşünülmektedir. Bunu trofoblastların FoxP3 ifade ederek desiduada maternal immüniniteyi eğiterek yaptığı düşünülmektedir.

Biz de yaptığımız bu çalışmada öncelikle IHC sonuçlarına bakarak, FoxP3+ hücrelerin hem desidua hem de koryon villuslarındaki trofoblastlarda olduğunu farkettik. Daha sonra bu veriyi doğrulamak için seri kesitler alarak FoxP3+ ve CK7+ hücreleri birbiri ile karşılaştırıp birbiri ile örtüştüğünü gözlemledik. Son olarakta seri kesit tekniğinden aldığımız sonuçları IF ile bu 2 protein için double işaretleme yaparak doğruladık. IF sonuçları desiduada FoxP3+ hücrelerin CK7+ torofoblastlar olduğunu ve yine koryon villuslarındaki trofoblastların FoxP3 ifade ettiğini gösterdi.

Biz bu sonuçlarımız ile ilk defa maternal hipotiroidide, FoxP3+ hücreleri kontrolle karşılaştırarak değerlendirdik. FoxP3+ hücrelerin maternal hipotirodide desiduada azaldığını ve bunun yanında desidua ve villuslardaki trofoblastlarda ifade edildiğini gösterdik.

Ayrıca bu çalışmada maternal hipotiroidili annelerin plasentalarında eksozom varlığı ve dağılımını inceledik. Başarılı bir gebelik, fetal trofoblastlar ile maternal desidual

immün hücrelerin arasındaki karmaşık ve karşılıklı iletişimi içerir ve eksozomlarda bu iletişimde rol alırlar. Ayrıca plasental eksozomlar (pEXO) implantasyon, desidualizasyon ve plasentasyonda yer aldığı gibi son yapılan çalışmalarda pEXO'nun maternal bağışıklık toleransının oluşturulmasında önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir (90). Bununla beraber eksozomların patolojik durumlarda salınma paterninin değiştiği ve çoğunlukla arttığı gösterilmiştir (112).

Yapılan çalışmalarda daha çok periferal kandan izole edilen eksozomlar değerlendirilmiştir. Salomon ve ark. GDM' li bireylerin serumunda daha fazla eksozom olduğunu tespit etmişlerdir (94). Bir diğer çalışmada preeklampside pEXO düzeyinin arttığını, bunun tersine preterm doğumda ise pEXO düzeyinin azaldığı görülmüştür (95) . Dokuda ise daha az eksozomları değerlendiren çalışma vardır. Bunlardan biri Tiozzo ve ark. plasenta dokusunda eksozomları IF tekniği kullanarak CD63 ile işaretleyip, eksozomların koryon villusların trofoblastlarından salgılandığını söylemişlerdir (56). Bidarimath ve ark. ise domuz feto-maternal arayüzünde eksozom belirteci olan CD63 ile işaretleyerek eksozom varlığını göstermiş ve eksozomların fetal maternal iletişimde rol aldığını söylemiştir(121) .

Biz de çalışmamızda plasenta dokusunda eksozomları CD63 antikoru ile işaretleyerek değerlendirdik. Bu amaçla plasental eksozomları değerlendirmek için villuslarda bulunan CD63+ alanlar değerlendirildi ve gruplar arasında karşılaştırma yapıldı. Bu karşılaştırmada hasta grupta eksozomlar azalmış görünmesine rağmen iki grup arasında anlamlı fark tespit edilememiştir. ELISA sonuçlarıda IHC sonuçları ile uyumlu olmuştur. Dokuda eksozomlar genellikle CD63 eksozom belirteci ile işaretlenerek değerlendirilmektedir fakat dokuda eksozomları tanımlayabilmek oldukça zordur. Bu nedenle dokuda değerlendirme yapabilmek için yeni tekniklere ihtiyaç vardır. Bununla beraber biz bu çalışmada term dönemdeki plasenta dokusunu değerlendirdik, gebeliğin daha erken evreleri değerlendirildiğinde eksozom salınım paterni daha farklı olabilir. Bu nedenle maternal hipotiroidide eksozom davranışlarını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; biz bu çalışma ile ilk defa maternal hipotiroidi hasta plasentalarının feto-maternal arayüzünde FoxP3+ hücreleri ve eksozomları inceledik. FoxP3 ifadesinin hipotiroidili anne plasentalarında, sağlıklı gruba göre azaldığını gösterdik. Bununla beraber FoxP3' ün aynı zamanda desiduayı invaze eden trofoblastlar ve koryon villuslarındaki trofoblastlar tarafından ifade edildiğini saptadık. Eksozomların ise hasta grupta azalmasına rağmen iki grup arasında anlamlı fark olmadığını tespit ettik. Bu çalışma ile ilk defa maternal hipotiroidi ile FoxP3+ hücreleri ve eksozomları ilişkilendirerek, Maternal hipotiroidide, FoxP3 ekspresyonunun azalması, dolaylı olarak Treg sayısındaki azalma ile anne ve fetüs arasında immünolojik toleransın bozulmasına yol açabileceğini ve Maternal hipotiroidi patogenezinde rol alabileceğini gösterdik.

Bununla beraber histomorfolojik değerlendirmelerin sonucunda patolojik yapıların hipotiroidili plasentalarda anlamlı olarak arttığı gördük. Maternal hipotiroidi plasentanın histomorfolojini negatif yönde etkilemiştir.

Biz çalışmamızda eksozom miktarı bakımından, dokuda yaptığımız işaretlemelerde gruplar arasında anlamlı fark göremedik. Fakat daha sonraki çalışmalarla bu eksozomların plasenta dokusundan izole edilerek tekrar değerlendirilmesi ve IHC bulguları ile karşılaştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Maternal hipotiroidide FoxP3+ hücrelerin normal ve patolojik koşullardaki rolünün ve davranışlarının daha iyi anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Literatürde dokuda genellikle Treg hücre belirteci olarak FoxP3 proteini kullanılmaktadır fakat FoxP3' ün plasentada trofoblastlar tarafından da ifade edildiğini gördük. Kanda Treg hücrelerini saptamak daha kolay iken, dokuda Treg hücrelerinin saptanması için FoxP3 ile birlikte başka belirteçlere ihtiyaç vardır.

Özetle maternal hipotiroidiyi ilk defa FoxP3 ve eksozomlar ile ilişkilendirerek FoxP3+ hücrelerin bu patolojide yer alabileceğini gösterdik.

7. KAYNAKLAR

1. Furuya M. Pathophysiology of placentation abnormalities in pregnancy-induced hypertension. Vasc Health Risk Manag. 2008; 4:1301-13.
2. 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.
3. Brosens I, Pijnenborg R, Vercruysse L, Romero R. The "Great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation. Am J Obstet Gynecol. 2011;204(3):193-201.
4. Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. Development. 2019;146(22).
5. Cindrova-Davies T, Sferruzzi-Perri AN. Human placental development and function. Semin Cell Dev Biol. 2022;131:66-77.
6. Vento-Tormo R, Efremova M, Botting RA, Turco MY, Vento-Tormo M, Meyer KB,. Single-cell reconstruction of the early maternal–fetal interface in humans. Nature. 2018;563(7731):347-53.
7. Perez-Garcia V, Fineberg E, Wilson R, Murray A, Mazzeo CI, Tudor C. Placentation defects are highly prevalent in embryonic lethal mouse mutants. Nature. 2018;555(7697):463-8.
8. Tilburgs T, Evans JH, Crespo ÂC, Strominger JL. The HLA-G cycle provides for both NK tolerance and immunity at the maternal–fetal interface. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015;112(43):13312-7.
9. Zeldovich VB, Robbins JR, Kapidzic M, Lauer P, Bakardjiev AI. Invasive Extravillous Trophoblasts Restrict Intracellular Growth and Spread of Listeria monocytogenes. PLoS Pathog. 2011;7(3):e1002005.
10. Velicky P, Meinhardt G, Plessl K, Vondra S, Weiss T, Haslinger. Genome amplification and cellular senescence are hallmarks of human placenta development. PLoS Genet. 2018;14(10):e1007698.
11. Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. Placenta. 1980;1(1):3-19.

12. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JCP. Rheological and Physiological Consequences of Conversion of the Maternal Spiral Arteries for Uteroplacental Blood Flow during Human Pregnancy. Placenta. 2009;30(6):473-82.
13. Brosens I, Puttemans P, Benagiano G. Placental bed research: I. The placental bed: from spiral arteries remodeling to the great obstetrical syndromes. Am J Obstet Gynecol. 2019;221(5):437-56.
14. Hustin J, Schaaps JP. Echocardiograhic and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1987;157(1):162-8.
15. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of Maternal Arterial Blood Flow and Placental Oxidative Stress. Am J Pathol. 2000;157(6):2111-22.
16. Keith L. Moore T. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology,. 2018.
17. Joshi NP, Mane AR, Sahay AS, Sundrani DP, Joshi SR, Yajnik CS. Role of Placental Glucose Transporters in Determining Fetal Growth. Reproductive Sciences. 2022;29(10):2744-59.
18. Cleal JK, Lofthouse EM, Sengers BG, Lewis RM. A systems perspective on placental amino acid transport. J Physiol. 2018;596(23):5511-22.
19. Lewis RM, Wadsack C, Desoye G. Placental fatty acid transfer. Curr Opin Clin Nutr Metab Care.2018;21(2):78-82.
20. Lager S, Sovio U, Eddershaw E, van der Linden MW, Yazar C, Cook E. Abnormal placental CD8 $^{+}$ T-cell infiltration is a feature of fetal growth restriction and pre-eclampsia. J Physiol.2020;598(23):5555-71.
21. Coleman SJ, Gerza L, Jones CJP, Sibley CP, Aplin JD, Heazell AEP. Syncytial nuclear aggregates in normal placenta show increased nuclear condensation, but apoptosis and cytoskeletal redistribution are uncommon. Placenta. 2013;34(5):449-55.
22. Calvert SJ, Jones CJP, Sibley CP, Aplin JD, Heazell AEP. Analysis of syncytial nuclear aggregates in preeclampsia shows increased sectioning artefacts and

decreased inter-villous bridges compared to healthy placentas. Placenta. 2013;34(12):1251-4.

23. Holland O, Kroneis T, El-Heliebi A, McDowell-Hook M, Stone P, Sedlmayr P. Detection of Fetal Sex, Aneuploidy and a Microdeletion from Single Placental Syncytial Nuclear Aggregates. Fetal Diagn Ther. 2017;41(1):32-40.
24. Wallingford MC, Benson C, Chavkin NW, Chin MT, Frasch MG. Placental Vascular Calcification and Cardiovascular Health: It Is Time to Determine How Much of Maternal and Offspring Health Is Written in Stone. Front Physiol. 2018;9.
25. Meir K, Ariel I. Intravillous Haemorrhage. Pathology of the Placenta. 2019. 161-2.
26. Lee SY, Pearce EN. Assessment and treatment of thyroid disorders in pregnancy and the postpartum period. Nat Rev Endocrinol. 2022;18(3):158-71.
27. Sullivan SA. Hypothyroidism in Pregnancy. Clin Obstet Gynecol. 2019;62(2):308-19.
28. Moog NK, Entringer S, Heim C, Wadhwa PD, Kathmann N, Buss C. Influence of maternal thyroid hormones during gestation on fetal brain development. Neuroscience. 2017.
29. Thompson W, Russell G, Baragwanath G, Matthews J, Vaidya B, Thompson-Coon J. Maternal thyroid hormone insufficiency during pregnancy and risk of neurodevelopmental disorders in offspring: A systematic review and meta-analysis. Clin Endocrinol (Oxf). 2018;88(4):575.
30. Pearce EN. Management of Hypothyroidism and Hypothyroxinemia During Pregnancy. Endocrine Practice. 2022;28(7):711-8.
31. Bestwick JP, John R, Maina A, Guaraldo V, Joomun M, Wald NJ. Thyroid stimulating hormone and free thyroxine in pregnancy: Expressing concentrations as multiples of the median (MoMs). Clinica Chimica Acta. 2014;430:33-7.
32. Abalovich M, Gutierrez S, Alcaraz G, Maccallini G, Garcia A, Levalle O. Overt and Subclinical Hypothyroidism Complicating Pregnancy. Thyroid. 2002;12(1):63-8.
33. Negro R, Schwartz A, Gismondi R, Tinelli A, Mangieri T, Stagnaro-Green A. Increased Pregnancy Loss Rate in Thyroid Antibody Negative Women with TSH

Levels between 2.5 and 5.0 in the First Trimester of Pregnancy. J Clin Endocrinol Metab.95(9)

34. Sahay R, Nagesh Vs. Hypothyroidism in pregnancy. Indian J Endocrinol Metab. 2012;16(3):364.
35. Männistö T, Mendola P, Grewal J, Xie Y, Chen Z, Laughon SK. Thyroid diseases and adverse pregnancy outcomes in a contemporary US cohort. J Clin Endocrinol Metab. 2013;98(7):2725-33.
36. Dong AC, Stagnaro-Green A. Differences in Diagnostic Criteria Mask the True Prevalence of Thyroid Disease in Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis. Thyroid. 2019.
37. Adu-Gyamfi EA, Wang YX, Ding Y Bin. The interplay between thyroid hormones and the placenta: a comprehensive review†. Biol Reprod. 2020;102(1):9-17.
38. Chen X, Gan T, Liao Z, Chen S, Xiao J. Foxp3 (−/ATT) Polymorphism Contributes to the Susceptibility of Preeclampsia. PLoS One.2013;8(4):e59696.
39. Hassannia H, Abediankenari S, Ghaffari J. FOXP3 and TGF-β gene polymorphisms in allergic rhinitis. Iran J Immunol.2011;8(4):218-25.
40. André GM, Barbosa CP, Teles JS, Vilarino FL, Christofolini DM, Bianco B. Analysis of FOXP3 polymorphisms in infertile women with and without endometriosis. Fertil Steril.2011;95(7):2223-7.
41. Park O, Grishina I, Leung Ps, Gershwin Me, Prindiville T. Analysis of the Foxp3/Scurfin Gene in Crohn's Disease. Ann N Y Acad Sci. 2005;1051(1):218-28.
42. Fodor E, Garaczi E, Polyánka H, Koreck A, Kemény L, Széll M. The rs3761548 polymorphism of FOXP3 is a protective genetic factor against allergic rhinitis in the Hungarian female population. Hum Immunol.2011;72(10):926-9.
43. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Genet.2001;27(1):20-1.
44. Kim CH. FOXP3 and Its Role in the Immune System. 2009. 17-29.

45. Fodor E, Garaczi E, Polyánka H, Koreck A, Kemény L, Széll M. The rs3761548 polymorphism of FOXP3 is a protective genetic factor against allergic rhinitis in the Hungarian female population. Hum Immunol.2011;72(10):926-9.
46. Wu Z, You Z, Zhang C, Li Z, Su X, Zhang X. Association between Functional Polymorphisms of Foxp3 Gene and the Occurrence of Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion in a Chinese Han Population. Clin Dev Immunol. 2012;2012:1-7.
47. Jahan P, Sreenivasagari R, Goudi D, Komaravalli PL, Ishaq M. Role of Foxp3 Gene in Maternal Susceptibility to Pre-eclampsia – A Study From South India. Scand J Immunol. 2013;77(2):104-8.
48. André GM, Barbosa CP, Teles JS, Vilarino FL, Christofolini DM, Bianco B. Analysis of FOXP3 polymorphisms in infertile women with and without endometriosis. Fertil Steril. 2011;95(7):2223-7.
49. Hu X, Wang Y, Mor G, Liao A. Forkhead box P3 is selectively expressed in human trophoblasts and decreased in recurrent pregnancy loss. Placenta. 2019;81:1-8.
50. Boer OJ de, Loos CM van der, Teeling P, Wal AC van der, Teunissen MBM. Immunohistochemical Analysis of Regulatory T Cell Markers FOXP3 and GITR on CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T Cells in Normal Skin and Inflammatory Dermatoses. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2007;55(9):891-8.
51. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol. 2008;8(7):523-32.
52. Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T, Ito M. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance. Semin Immunopathol. 2007;29(2):115-22.
53. Monteiro M, Agua-Doce A, Azevedo RI, Lacerda JF, Graca L. Regulatory T Cells. Translational Immunology. Elsevier; 2016. s. 205-46.
54. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet. 2001;27(1):68-73.
55. Kim CH. FOXP3 and Its Role in the Immune System. Içinde 2009. 17-29.

56. Tiozzo C, Bustoros M, Lin X, Manzano De Mejia C, Gurzenda E, Chavez M. Placental extracellular vesicles–associated microRNA-519c mediates endotoxin adaptation in pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 2021;225(6):681.
57. Saito S, Shima T, Nakashima A, Inada K, Yoshino O. Role of Paternal Antigen-Specific Treg Cells in Successful Implantation. American Journal of Reproductive Immunology. 2016;75(3):310-6.
58. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Bertoja AZ, Ritter T. Abnormal T-Cell Reactivity against Paternal Antigens in Spontaneous Abortion. Am J Pathol. 2005;166(3):811-22.
59. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol. 1995;155(3):1151-64.
60. Shima T, Inada K, Nakashima A, Ushijima A, Ito M, Yoshino O. Paternal antigen-specific proliferating regulatory T cells are increased in uterine-draining lymph nodes just before implantation and in pregnant uterus just after implantation by seminal plasma-priming in allogeneic mouse pregnancy. J Reprod Immunol. 2015;108:72-82.
61. Tsuda S, Zhang X, Hamana H, Shima T, Ushijima A, Tsuda K. Clonally Expanded Decidual Effector Regulatory T Cells Increase in Late Gestation of Normal Pregnancy, but Not in Preeclampsia, in Humans. Front Immunol. 2018;9.
62. Fisher SJ. Why is placentation abnormal in preeclampsia? Am J Obstet Gynecol. 2015;213(4):S115-22.
63. Wallace AE, Fraser R, Cartwright JE. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. Hum Reprod Update. 2012;18(4):458-71.
64. Tsuda S, Nakashima A, Shima T, Saito S. New Paradigm in the Role of Regulatory T Cells During Pregnancy. Front Immunol. 2019;10.
65. Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake K, Marquardt H. Protein Expression and Peptide Binding Suggest Unique and Interacting Functional Roles

for HLA-E, F, and G in Maternal-Placental Immune Recognition. The Journal of Immunology. 2003;171(3):1376-84.

66. Li C, Houser BL, Nicotra ML, Strominger JL. HLA-G homodimer-induced cytokine secretion through HLA-G receptors on human decidual macrophages and natural killer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009;106(14):5767-72.
67. Ristich V, Liang S, Zhang W, Wu J, Horuzsko A. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. Eur J Immunol. 2005;35(4):1133-42.
68. Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli U, Taylor H. The Role of Growth Factors and Cytokines during Implantation: Endocrine and Paracrine Interactions. Semin Reprod Med. 2009;27(01):062-79.
69. Tafuri A, Alferink J, Möller P, Hämmerling GJ, Arnold B. T Cell Awareness of Paternal Alloantigens During Pregnancy. Science (1979). 1995;270(5236):630-3.
70. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nat Immunol. 2004;5(3):266-71.
71. Robertson SA, Care AS, Moldenhauer LM. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. Journal of Clinical Investigation. 2018;128(10):4224-35.
72. Shima T, Inada K, Nakashima A, Ushijima A, Ito M, Yoshino O. Paternal antigen-specific proliferating regulatory T cells are increased in uterine-draining lymph nodes just before implantation and in pregnant uterus just after implantation by seminal plasma-priming in allogeneic mouse pregnancy. J Reprod Immunol. 2015;108:72-82.
73. Bacher P, Scheffold A. New technologies for monitoring human antigen-specific T cells and regulatory T cells by flow-cytometry. Curr Opin Pharmacol. 2015;23:17-24.
74. Sasaki Y. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. Mol Hum Reprod. 2004;10(5):347-53.

75. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nat Immunol. 2004;5(3):266-71.
76. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Bertoja AZ, Ritter T. Abnormal T-Cell Reactivity against Paternal Antigens in Spontaneous Abortion. Am J Pathol. 2005;166(3):811-22.
77. Piccinni MP, Raghupathy R, Saito S, Szekeres-Bartho J. Cytokines, Hormones and Cellular Regulatory Mechanisms Favoring Successful Reproduction. Front Immunol. 2021;12.
78. Ahmadzadeh M, Pasetto A, Jia L, Deniger DC, Stevanović S, Robbins PF. Tumor-infiltrating human CD4 $^{+}$ regulatory T cells display a distinct TCR repertoire and exhibit tumor and neoantigen reactivity. Sci Immunol. 2019;4(31).
79. Tafuri A, Alferink J, Möller P, Hämmerling GJ, Arnold B. T Cell Awareness of Paternal Alloantigens During Pregnancy. Science (1979). 1995;270(5236):630-3.
80. Rowe JH, Ertelt JM, Xin L, Way SS. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. Nature. 2012;490(7418):102-6.
81. Zhang D, Lin Y, Li Y, Zhao D, Du M. Mesenchymal stem cells enhance Treg immunosuppressive function at the fetal-maternal interface. J Reprod Immunol. 2021;148.
82. Krop J, Heidt S, Claas FHJ EM. Regulatory T Cells in Pregnancy: It Is Not All About Foxp3. Front Immunol. 2020;11:1182.
83. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nat Immunol.2004;5(3):266-71.
84. Winger EE, Reed JL. Low circulating CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) T regulatory cell levels predict miscarriage risk in newly pregnant women with a history of failure. Am J Reprod Immunol.66(4):320-8.
85. Lu Y, Zhang F, Zhang Y, Zeng B, Hu L, Liao A. Quantitative reduction of peripheral CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells in reproductive failure after artificial insemination by donor sperm. Am J Reprod Immunol. 2013;69(2):188-93.
86. Kalluri R, LeBleu Vs. The biology , function , and biomedical applications of exosomes. Science. 2020;367(6478).

87. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nat Rev Mol Cell Biol.2018;19(4):213-28.
88. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. J Mol Med. 2013;91(4):431-7.
89. Woods L, Perez-Garcia V, Kieckbusch J, Wang X, DeMayo F, Colucci F. Decidualisation and placentation defects are a major cause of age-related reproductive decline. Nat Commun. 2017;8(1):352.
90. Bai K, Li X, Zhong J, Ng EHY, Yeung WSB, Lee CL. Placenta-Derived Exosomes as a Modulator in Maternal Immune Tolerance During Pregnancy. Front Immunol. 2021;12:1-17.
91. Mitchell MD, Peiris HN, Kobayashi M, Koh YQ, Duncombe G, Illanes SE. Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 2015;213(4):S173-81.
92. Salomon C, Torres MJ, Kobayashi M, Scholz-Romero K, Sobrevia L, Dobierzewska A. A Gestational Profile of Placental Exosomes in Maternal Plasma and Their Effects on Endothelial Cell Migration. PLoS One. 2014;9(6):e98667.
93. Ambrosini G, Ebert B, Carvajal RD, Schwartz GK, Rai AJ. Use of antibody arrays to probe exosome and extracellular vesicle mediated functional changes in cells. Methods Enzymol.2020;645:43-53.
94. Salomon C, Scholz-Romero K, Sarker S, Sweeney E, Kobayashi M, Correa P. Gestational Diabetes Mellitus Is Associated With Changes in the Concentration and Bioactivity of Placenta-Derived Exosomes in Maternal Circulation Across Gestation. Diabetes. 2016;65(3):598-609.
95. Menon R, Shahin H. Extracellular vesicles in spontaneous preterm birth. American Journal of Reproductive Immunology. 2021;85(2).
96. Mikami N, Kawakami R, Chen KY, Sugimoto A, Ohkura N, Sakaguchi S. Epigenetic conversion of conventional T cells into regulatory T cells by CD28 signal deprivation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020;117(22):12258-68.

97. Thibault G, Degenne D, Girard AC, Guillaumin JM, Lacord M, Bardos P. The inhibitory effect of human syncytiotrophoblast plasma membrane vesicles on in vitro lymphocyte proliferation is associated with reduced interleukin 2 receptor expression. Cell Immunol. 1991;138(1):165-74.
98. Castillo Lara M, Vilar Sánchez Á, Cañavate Solano C, Soto Pazos E, Iglesias Álvarez M, González Macías C. "Hypothyroidism screening during first trimester of pregnancy". BMC Pregnancy Childbirth. 2017;17(1):438.
99. Nishioka E, Hirayama S, Ueno T, Matsukawa T, Vigeh M, Yokoyama K. Relationship between maternal thyroid-stimulating hormone (TSH) elevation during pregnancy and low birth weight: A longitudinal study of apparently healthy urban Japanese women at very low risk. Early Hum Dev. 2015;91(3):181-5.
100. Novakovic TR, Dolicanin ZC, Djordjevic NZ. Effects of maternal subclinical hypothyroidism on amniotic fluid cells oxidative status. Reproductive Toxicology. 2018;78:97-101.
101. Zhao L, Jiang G, Tian X, Zhang X, Zhu T, Chen B. Initiation timing effect of levothyroxine treatment on subclinical hypothyroidism in pregnancy. Gynecological Endocrinology. 2018;34(10):845-8.
102. Khorami Sarvestani S, Shojaeian S, Vanaki N, Ghresi-Fard B, Amini M, Gilany K, vd. Proteome profiling of human placenta reveals developmental stage-dependent alterations in protein signature. Clin Proteomics. 2021;18(1):18.
103. Khong TY, Mooney EE, Ariel I, Balmus NCM, Boyd TK, Brundler MA. Sampling and Definitions of Placental Lesions: Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement. Arch Pathol Lab Med. 2016;140(7):698-713.
104. Ersoy Canillioglu Y, Senturk GE, Sahin H, Sahin S, Seval-Celik Y. The Distribution of Foxp3 and CD68 in Preeclamptic and Healthy Placentas: A Histomorphological Evaluation. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2023;71(4):211-25.
105. Weldy CS, Liu Y, Liggitt HD, Chin MT. In Utero Exposure to Diesel Exhaust Air Pollution Promotes Adverse Intrauterine Conditions, Resulting in Weight Gain,

Altered Blood Pressure, and Increased Susceptibility to Heart Failure in Adult Mice. PLoS One. 2014;9(2):e88582.

106. Bezemer RE, Schoots MH, Timmer A, Scherjon SA, Erwich JJHM, van Goor H. Altered Levels of Decidual Immune Cell Subsets in Fetal Growth Restriction, Stillbirth, and Placental Pathology. Front Immunol. 2020;11.
107. Tiozzo C, Bustoros M, Lin X, Manzano De Mejia C, Gurzenda E, Chavez M. Placental extracellular vesicles–associated microRNA-519c mediates endotoxin adaptation in pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 2021;225(6):681.e1-681.e20.
108. Loukeris K, Sela R, Baergen RN. Syncytial Knots as a Reflection of Placental Maturity: Reference Values for 20 to 40 Weeks' Gestational Age. Pediatric and Developmental Pathology. 2010;13(4):305-9.
109. Wallingford MC, Benson C, Chavkin NW, Chin MT, Frasch MG. Placental Vascular Calcification and Cardiovascular Health: It Is Time to Determine How Much of Maternal and Offspring Health Is Written in Stone. Front Physiol. 2018;9.
110. Meir K, Ariel I. Intravillous Haemorrhage.Pathology of the Placenta. Cham: Springer International Publishing; 2019. s. 161-2.
111. Svensson-Arvelund J, Mehta RB, Lindau R, Mirrasekhian E, Rodriguez-Martinez H, Berg G. The Human Fetal Placenta Promotes Tolerance against the Semiallogeneic Fetus by Inducing Regulatory T Cells and Homeostatic M2 Macrophages. The Journal of Immunology. 2015;194(4):1534-44.
112. Lee JY, Park JK, Lee EY, Lee EB SYW. Circulating exosomes from patients with systemic lupus erythematosus induce a proinflammatory immune response. Arthritis Res Ther. 2016;18(1):264.
113. Zare M, Doroudchi M, Gharesi-Fard B. Altered Frequencies of CD4+ CD25+ Foxp3+ and CD8+ CD25+ Foxp3+ Regulatory T Cells in Pre-eclampsia. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2018;17(6):540-7.
114. Toldi G, Saito S, Shima T, Halmos A, Veresh Z, Vásárhelyi B. The Frequency of Peripheral Blood CD4+ CD25high FoxP3+ and CD4+ CD25− FoxP3+ Regulatory T Cells in Normal Pregnancy and Pre-Eclampsia. American Journal of Reproductive Immunology. 2012;68(2):175-80.

115. Hu D, Chen Y, Zhang W, Wang H, Wang Z, Dong M. Alteration of peripheral CD $^{4+}$ CD $^{25+}$ regulatory T lymphocytes in pregnancy and pre-eclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand. 2008;87(2):190-4.
116. Paeschke S, Chen F, Horn N, Fotopoulou C, Zambon-Bertoja A, Sollwedel A. Pre-eclampsia is not Associated with Changes in the Levels of Regulatory T Cells in Peripheral Blood. American Journal of Reproductive Immunology. 2005;54(6):384-9.
117. Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, de Groot-Swings GM, Kleijburg C, Scherjon SA. Evidence for a Selective Migration of Fetus-Specific CD4+CD25bright Regulatory T Cells from the Peripheral Blood to the Decidua in Human Pregnancy. The Journal of Immunology. 2008;180(8):5737-45.
118. Tilburgs T, Scherjon SA, van der Mast BJ, Haasnoot GW, Versteeg-v.d.Voort-Maarschalk M, Roelen DL. Fetal–maternal HLA-C mismatch is associated with decidual T cell activation and induction of functional T regulatory cells. J Reprod Immunol.2009;82(2):148-57.
119. Quinn KH, Lacoursiere DY, Cui L, Bui J, Parast MM. The unique pathophysiology of early-onset severe preeclampsia: role of decidual T regulatory cells. J Reprod Immunol.2011;91(1-2):76-82.
120. Schumacher A, Zenclussen AC. Regulatory T Cells: Regulators of Life. American Journal of Reproductive Immunology. 2014;72(2):158-70.
121. Bidarimath M, Khalaj K, Kridli RT, Kan FWK, Koti M, Tayade C. Extracellular vesicle mediated intercellular communication at the porcine maternal-fetal interface: A new paradigm for conceptus-endometrial cross-talk. Sci Rep. 2017;7(1):40476.

8. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr. H.Alper Bağrıyanık

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**goaek@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	8254-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☐ DOKTORA ☒	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Maternal Hipotroidi Hastalarının Plasenta Dokusunda Regülatör T Hücreleri ve Eksozomların İncelenmesi**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. H.Alper Bağrıyanık Histoloji ve Embriyoloji A.D.	
	TEZ SAHİBİNİN ADI SOYADI	Şeyda Demir Yüksel	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ☐

	Belge Adı	**Tarihi**	**Versiyon Numarası**	**Dili**
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2023/26-06**	**Tarih:09.08.2023**
	Prof.Dr. H.Alper Bağrıyanık'ın sorumlusu olduğu **"Maternal Hipotroidi Hastalarının Plasenta Dokusunda Regülatör T Hücreleri ve Eksozomların İncelenmesi"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?	
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒
Prof.Dr. Şükran Köse (Başkan Yardımcısı)	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E ☐	H ☒
Prof.Dr. Suna Asilsoy	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒
Prof.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒
Prof.Dr. Özgür Er	Endodonti A.D.	Diş Hekimliği Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒
Prof.Dr. Hatice Şimşek Keskin	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr.Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒
Dr.Öğr.Üyesi Gamze Tuna	Tıbbi Biyokimya	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒

Ek 2: Onam Formu

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

"*GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR*"

İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

BU BÖLÜM AYNEN KORUNACAKTIR

Araştırmanın Adı: Maternal Hipotiroidi Hastalarının Plasenta Dokusunda Regülatör T Hücreleri ve Eksozomların İncelenmesi

Sorumlu Araştırıcının Adı: Prof.Dr. H.Alper Bağrıyanık

Yardımcı Araştırmacının Adı: Doc.Dr.Erkan Çağlıyan

Destekleyici (varsa): TÜBİTAK

"Maternal Hipotroidi Hastalarının Plasenta Dokusunda Regülatör T Hücreleri ve Eksozomların İncelenmesi" isimli araştırmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma bilimsel araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır ve katılım gönüllülük esasına dayalıdır.

Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da fazla bilgi isterseniz size iletişim bilgileri verilen araştırmacıya sorabilirsiniz.

Araştırmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu araştırmaya katılacak?

Gönüllü olarak katılmanızı teklif ettiğimiz çalışma bir araştırma projesidir. Bu araştırma projesinin amacı; hipotiroidi hastalığına sahip gebelerde gelişen plasental (eş) yapının

bozulmasının sebeplerini araştırmaktır. Araştırmaya 15 hipotiroidi, 15 sağlıklı olmak üzere toplam 30 birey katılacaktır.

Bu araştırmaya katılırsam beni ne bekliyor?

Araştırmamızda, doğum sonrası atılacak olan plasenta alınarak, plasenta dokusu üzerinde araştırma gerçekleştirilecektir. Plasenta gebeliğiniz süresince siz ve bebeğiniz arasındaki ilişkiyi sağlayan geçici bir organdır. Doğum sonrası normal bir süreç olarak yaklaşık yarım saatlik bir sürede vücudunuz plasentayı atmaktadır. Bu nedenle yapacağımız bu araştırmanın size ve bebeğinize herhangi bir etkisi olmayacaktır çünkü dokuyu vücudunuzdan atıldıktan sonra alacağız. Çalışma ile ilgili toplanan plasenta örnekleri, sizden çalışma bazlı tekrar izin alınmak koşulu ile, benzer çalışmalarda da kullanılabilecektir. Çalışmamız 6 ay sürmesi planlanmaktadır. Plasenta dokusunda bir çeşit bağışıklık hücresi olan regülatör T hücreleri ve nano veziküller olan eksozomlar bakılacaktır.

BU BÖLÜM AYNEN KORUNACAKTIR

Bu araştırmaya katılmalı mıyım?

Bu araştırmada yer almak tamamen size bağlıdır. Şimdi bu formu imzalasanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin araştırmadan ayrılmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya araştırmadan ayrılırsanız, sizin için en uygun tedavi planı bu kararınızdan etkilenmeksizin uygulanacaktır. Eğer araştırmayı yürüten araştırmacı devam etmenizin sizin için yararlı olmayacağına karar verirse sizi araştırma dışı bırakabilir, bu durumda da sizin için standart olarak verilmesi gereken en uygun tedavi uygulanacaktır.

Araştırmanın olası riskleri nelerdir?

Araştırmanın sizin için herhangi bir riski bulunmamaktadır. Bu araştırmanın ne size ne de bebeğinize herhangi bir zararı olmayacaktır. Doğal süreçte vücudunuzdan atılacak olan plasenta dokusu kullanılacaktır.

BU BÖLÜM AYNEN KORUNACAKTIR

Araştırmanın olası riskleri konusunda ne gibi önlemler alınacaktı?

Araştırma ile ilgili ortaya çıkabilecek herhangi bir sağlık probleminde her türlü tıbbi girişim tarafımızdan yapılacak; bu konudaki tüm harcamalar da tarafımızdan karşılanacaktır

Bu araştırmaya katılmamın maliyeti nedir?

Bu araştırmada yer almak tümüyle sizin isteğinize bağlıdır. Bu araştırma için size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. Araştırma sırasında oluşabilecek masraflar size ve bağlı olduğunuz kuruma ödetilmeyecektir.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?

Araştırmayı yapan araştırmacı kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz tıp etiği ve KVKK düzenlenmelerine uygun şekilde gizli tutulacaktır. Araştırma için kullanılacak bilgileriniz üçüncü kişilerle paylaşılmayacaktır.

Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Araştırmanın sonunda, kendi sonuçlarınızla ilgili bilgi istemeye hakkınız

vardır. Araştırma sonuçları araştırma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

KATILIMCININ/HASTANIN BEYANI

DEÜTF Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim dalında, Dr.Erkan Çağlıyan/ Dr.Ezgi Bilicen tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve tedavimi yapan kişi ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (*Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim).* Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabileceğim konusunda bilgilendirildim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı

konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr.Erkan Çağlıyan' ı nolu telefondan ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nden arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen araştırmacı

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

AYDINLATMA ve KATILIMCININ BEYANI KESİNLİKLE BİRBİRLERİNİN DEVAMI ŞEKLİNDE OLACAKTIR. AYRI AYRI SAYFALARDA YER *ALMAYACAKTIR.*

Ek 3: Özgeçmiş

ŞEYDA DEMİR

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi	Dokuz Eylül Üniversitesi. Tıp Fak. Dekanlık Binası. Histoloji -embriyoloji Anabilim
Telefon	
E-posta	
İnternet Sayfası	

Öğrenim Bilgileri

28 Eylül 2018 - Şu Anda (6 yıl 3 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (DR)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.68 / 4.0

07 Ekim 2015 - 14 Eylül 2018 (3 yıl)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (YL)
Diploma Numarası: 201809788
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.36 / 4.0

01 Eylül 2009 - 01 Ağustos 2012 (3 yıl)
Yüksek Lisans, Tezli Program, İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ, TÜRKİYE
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK (YL) (TEZLİ)
Tez Başlığı: Camptotesin Ile Apoptozu Indüklenen Insan Hücrelerinde Aday Mirna Ların Fonksiyonlarının Belirlenmesi
Tez Konusu: Camptotesin Ile Apoptozu Indüklenen Insan Hücrelerinde Belirlenen Aday Mirna Ların, Apoptozdaki Rolleri Araştırıldı.
Tarih: 2010
Tez Danışmanı: BÜNYAMİN AKGÜL

01 Eylül 2002 - 01 Eylül 2007 (5 yıl 1 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.5 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

Ekim 2015 - Şu Anda (9 yıl 3 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

Eylül 2013 - Eylül 2015 (2 yıl 1 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, İSTANBUL AREL ÜNİVERSİTESİ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: Orta)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Oluşturma Zamanı: 21 Aralık 2024 13:02:26

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri	Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Histoloji-Embriyoloji
	Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Moleküler Biyoloji ve Genetik -- Sitogenetik
Anahtar Kelimeler	Hücre Moleküler Biyolojisi
	Gen Düzenlemesi
	Doku Gelişimi
	Biyolojik Görüntüleme
	Moleküler İmmünoloji

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

S. DEMIR, E. ERDAL & H. A. BAGRIYANIK, Imaging of Isolated Exosomes by Correlative Microscopy, JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY, 2024, 0022-1554, 72, 3, 8.

F. YILMAZ, Ş. DEMİR & H. A. BAĞRIYANIK, Comparison of Exosome Presence and Morphologic Changes Between Implantation and Inter-Implantation Areas in Rat's Utero by Confocal Microscope and SEM, Dicle Tıp Dergisi / Dicle Med J (, 2022, 1300-2945, 49, 2, 271-277.

Bildiriler

Ş. DEMİR, Ş. E. ERDAL BAĞRIYANIK, E. BİLİCEN, E. ÇAĞLIYAN & H. A. BAĞRIYANIK, Evaluation of Regulatory T Cells and Exosomes in the Placental Tissue of Patients with Maternal Hypothyroidism, Poster Sunumu, 16. Ulusal ve Uluslararası katılımlı Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 26 Eylül 2024, 28 Eylül 2024, 145 - 146.

Ş. DEMİR, F. YILMAZ & H. A. BAĞRIYANIK, Sıçanlarda İmplantasyon ve İnter-implantasyon alanlarının morfolojik ve eksozom varlığı açısından immüno elektron mikroskobi ile değerlendirilmesi, Poster Sunumu, 24. ULUSAL MİKROSKOPİ KONGRESİ, 24 Nisan 2019, 26 Nisan 2019.

Ş. DEMİR & H. A. BAĞRIYANIK, Korelatif Mikroskopi ile Eksozomların Görüntülenmesi, Poster Sunumu, Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 10 Mayıs 2018, 13 Mayıs 2018.

Ödüller

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Araştırma Projesi, Tübitak Araştırma Projesi Ödülü, Ödül Alınan Kurum: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE, 01 Mart 2024.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Poster Bildirisi, Korelatif Mikroskopi Ile Ekzozomların Görüntülenmesi, Ödül Alınan Kurum: TÜRK HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ, TÜRKİYE, 13 Mayıs 2018.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

223S190, Maternal Hipotroidi Hastalarının Plasenta Dokusunda Regülatör T Hücreleri ve Eksozomların İncelenmesi, Yürütücü, Sonuçlandı, SBAG - Sağlık Bi?li?mleri? Araştirma Destek Grubu, 1002 - Hızlı Destek / Hızlı Destek - B, ARDEB, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 15.09.2023 - (), Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.09.2023 - 15.03.2024.

110T412, Naif CD4+T Hücrelerinden Th17 Fenotipinde Efektör T Hücrelerinin Oluşturulması ve Th17 Farklılaşmasında Rol Oynayan MikroRNA'ların Belirlenmesi, Burslu, Sonuçlandı, KBAG - Ki?mya Bi?yoloji? Araştirma Destek Grubu, 1001 - Araştırma, ARDEB, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.03.2013 - 09.07.2013, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.10.2010 - 01.04.2014.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Görev	ARDEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM	UİDB	TEYDEB	Toplam
Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Moderatorlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Raportörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
Katılmadığı Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0

Ek 4: Tez ile ilişkili Yayınlar

1. SCIE kapsamındaki dergide () basılan, tez sahibinin ilk isim olduğu tez ile ilişkili araştırma makalesi

Demir Ş, Erdal E, Bagriyanik HA. Imaging of Isolated Exosomes by Correlative Microscopy. J Histochem Cytochem. 2024; 72(3):149-156. doi: 10.1369/00221554241233346.



Journal of Histochemistry & Cytochemistry

Official Journal of THE HISTOCHEMICAL SOCIETY

5-Year Impact Factor: 3.4

Available access | Research article | First published online February 24, 2024

Imaging of Isolated Exosomes by Correlative Microscopy

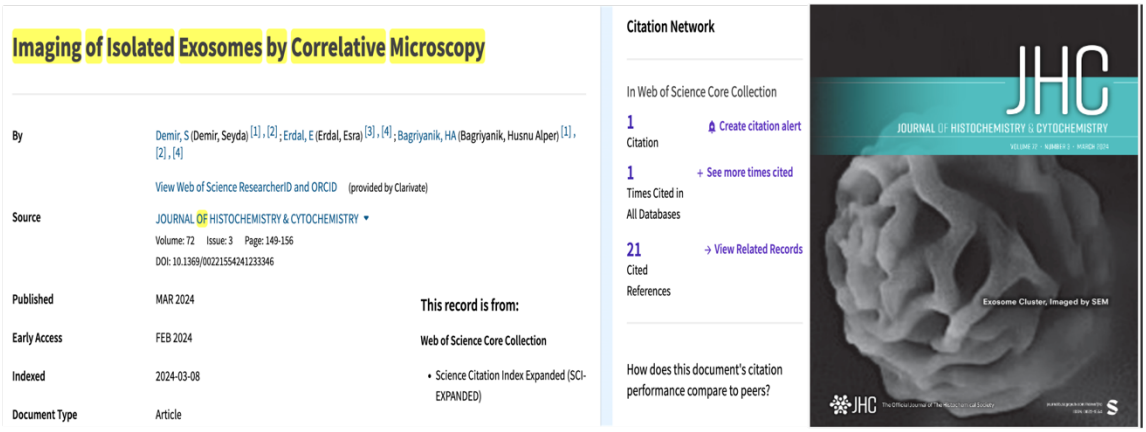
Şeyda Demir, Esra Erdal, and Hüsnü Alper Bagriyanik View all authors and affiliations

Volume 72, Issue 3 | https://doi.org/10.1369/00221554241233346

Contents | PDF/EPUB | Cite article | Share options | Information, rights and permissions

Abstract

Correlative microscopy is a sophisticated imaging technique that combines optical and electron microscopes, with the most common approach being the integration of light microscopy and electron microscopy, known as correlative light and electron microscopy (CLEM). While CLEM provides a comprehensive view of biological samples, it presents a significant challenge in sample preparation due to the distinct processes involved in each technique. Striking a balance between these methods is crucial. Despite numerous approaches, achieving seamless imaging with CLEM remains a complex task. Exosomes, nanovesicles ranging from 30 to 150 nm in size, are enclosed by a lipid bilayer and released by various cell types. Visualizing exosomes poses difficulties due to their small size and minimal electric charge. However, imaging exosomes at high resolution offers a direct method to understand their morphology and functions. In this study, we evaluated exosome imaging with CLEM using a combination of confocal, transmission electron microscope, and scanning electron microscope (SEM). In addition, we conducted a comparative analysis of these two techniques, evaluating their suitability and efficiency in imaging nanoscale structures. In this study, we found that confocal-SEM correlation is more applicable for imaging exosomes. Moreover, we observed that exosomes were found in clusters in confocal-SEM correlation.



Imaging of Isolated Exosomes by Correlative Microscopy

By: Demir, S (Demir, Seyda) [1], [2]; Erdal, E (Erdal, Esra) [3], [4]; Bagriyanik, HA (Bagriyanik, Husnu Alper) [1], [2], [4]

View Web of Science ResearcherID and ORCID (provided by Clarivate)

Source: JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY

Volume: 72 Issue: 3 Page: 149-156

DOI: 10.1369/00221554241233346

Published: MAR 2024

Early Access: FEB 2024

Indexed: 2024-03-08

Document Type: Article

This record is from:

Web of Science Core Collection

• Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED)

Citation Network

In Web of Science Core Collection

1 Citation — Create citation alert

1 Times Cited in All Databases — + See more times cited

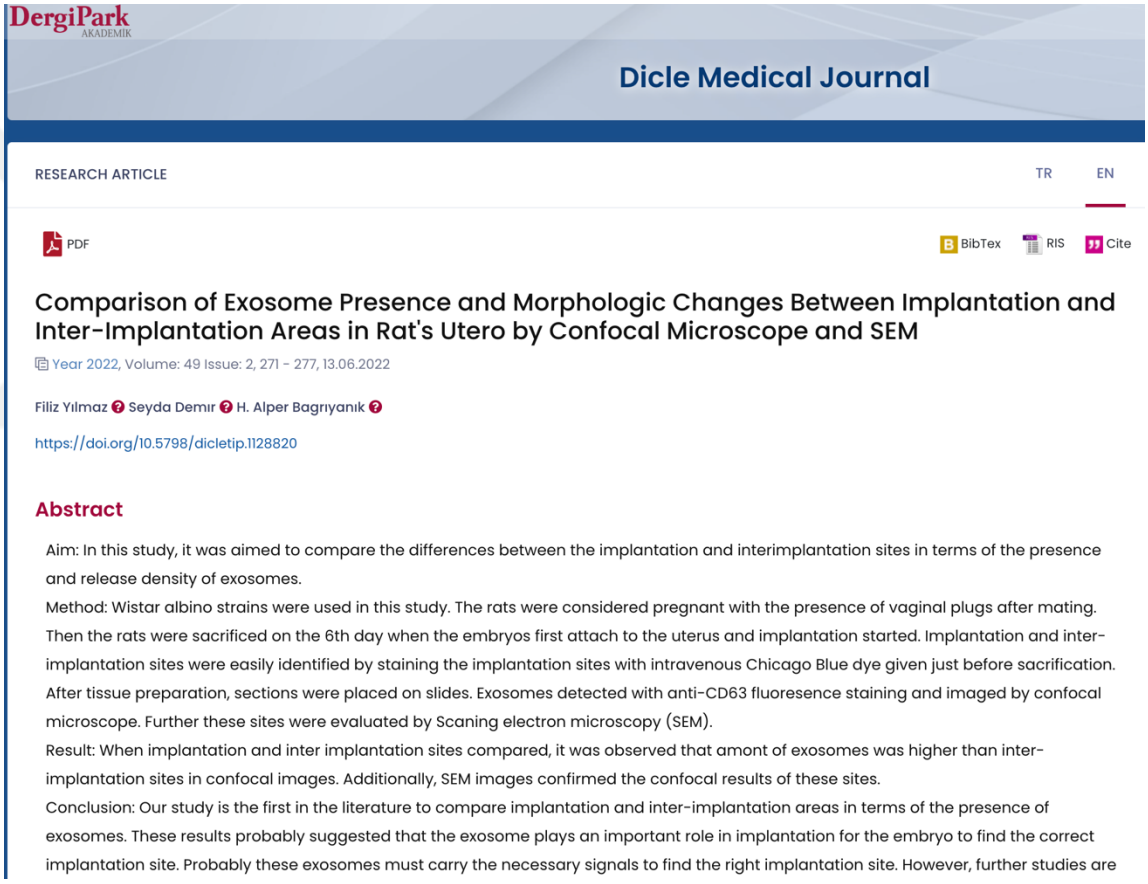
21 Cited References — → View Related Records

How does this document's citation performance compare to peers?

Yayınımız JHC dergisi Mart ayının kapak fotoğrafı olarak seçilmiştir.

2. **Hakemli dergide (Dicle Tıp Dergisi) yayınlanmış tez ile ilişkili araştırma makalesi**

Yılmaz F, Demir S, Bagrıyanık HA. Comparison of Exosome Presence and Morphologic Changes Between Implantation and Inter-Implantation Areas in Rat's Utero by Confocal Microscope and SEM. diclemedj. June 2022;49(2):271-277. doi:10.5798/dicletip.1128820



DergiPark AKADEMİK

Dicle Medical Journal

RESEARCH ARTICLE TR EN

PDF BibTex RIS Cite

Comparison of Exosome Presence and Morphologic Changes Between Implantation and Inter-Implantation Areas in Rat's Utero by Confocal Microscope and SEM

Year 2022, Volume: 49 Issue: 2, 271 - 277, 13.06.2022

Filiz Yılmaz Seyda Demir H. Alper Bagrıyanık

https://doi.org/10.5798/dicletip.1128820

Abstract

Aim: In this study, it was aimed to compare the differences between the implantation and interimplantation sites in terms of the presence and release density of exosomes.

Method: Wistar albino strains were used in this study. The rats were considered pregnant with the presence of vaginal plugs after mating. Then the rats were sacrificed on the 6th day when the embryos first attach to the uterus and implantation started. Implantation and inter-implantation sites were easily identified by staining the implantation sites with intravenous Chicago Blue dye given just before sacrification. After tissue preparation, sections were placed on slides. Exosomes detected with anti-CD63 fluoresence staining and imaged by confocal microscope. Further these sites were evaluated by Scaning electron microscopy (SEM).

Result: When implantation and inter implantation sites compared, it was observed that amont of exosomes was higher than inter-implantation sites in confocal images. Additionally, SEM images confirmed the confocal results of these sites.

Conclusion: Our study is the first in the literature to compare implantation and inter-implantation areas in terms of the presence of exosomes. These results probably suggested that the exosome plays an important role in implantation for the embryo to find the correct implantation site. Probably these exosomes must carry the necessary signals to find the right implantation site. However, further studies are

3. Hakemli dergiye gönderilmiş (manuscript) tez ile ilişkili araştırma makalesi

Characterization of a novel neurodevelopmental rare disease caused by a mutation within the autophagy gene *ATG9B*

Seval Kılıç[1,2], Kerem Esmen[1,3], A. Miray Oto[1,2], T. Bilge Kose[4], Melike Sever-Bahçekapılı[4], Emine Eren-Koçak[4], Şeyda Demir[5,6], A. Semra Hız[1,7], Gökhan Karakülah[1,2], H. Alper Bağrıyanık[1,5,6], Mehmet Öztürk[8], M. Kasım Diril[1,2*]

*Corresponding Author:

E-mail: kasim.diril@ibg.edu.tr

Abstract:

Autophagy is a highly conserved eukaryotic cellular process whose dysfunction results in human pathologies including cancer and neurodegenerative disease. First identified in yeast, ATG genes are central players in autophagy. Although their roles in cancer and neurodegenerative disease are well known, Mendelian diseases associated with ATG genes are rare. Mutations in core autophagy genes *ATG5* and *ATG7* have been previously reported to cause rare genetic disorders with autosomal recessive inheritance pattern.

Here we report, for the first time, a rare genetic disorder that results from a deletion/frameshift mutation in human ATG9B, the placenta specific homologue of yeast ATG9 in humans. The 11-nucleotide deletion causes a frameshift and addition of a premature stop codon, truncating the C-terminal cytosolic domain of the ATG9B protein. The pediatric patients carrying the mutant allele homozygous were children of a consanguineous marriage and displayed neurodevelopmental anomalies including mental retardation. We hypothesized that this phenotype originates during placental development.

To characterize the effects of the mutation and gain insight on the specific functions of ATG9B in a physiological setting, we used mammalian cells and generated a knock-in mouse model. Truncated ATG9B was not stable when expressed in cells. It was localized to perinuclear vesicles like the WT protein, but not to peripheral vesicles. Homozygous knock-in mice were viable, fertile and displayed no gross phenotypical abnormalities. Histomorphometry analysis of the placenta layers did not reveal a significant difference between mutant and control embryos. The assessments of neurobehavioral tests were similar in wild-type and homozygous knock-in mice. However, knock-in mice had a reduced fear memory trend, which is an amygdala-involved response.

11.11.2024 15:23 European Journal of Human Genetics

manuscripttrackingsystem European Journal of Human Genetics

tracking system home | submission guidelines | reviewer instructions | help | logout | journal home

Detailed Status Information

Manuscript #	1243-24-EJHG
Current Revision #	0
Submission Date	7th Nov 24 06:18:12
Current Stage	Under Consideration
Title	Characterization of a novel neurodevelopmental rare disease caused by a mutation within the autophagy gene ATG9B
Manuscript Type	Article
Special Section	N/A
Category	Molecular Genetics
Manuscript Comment	This manuscript is submitted for the first time.
Corresponding Author	Muhammed Kasim Diril (kasim.diril@deu.edu.tr) (Dokuz Eylul University Izmir International Biomedicine and Genome Institute)
Contributing Authors	Seval Kılıç , Kerem Esmen , Ayşe Miray Oto , Tansu Bilge Köse , Melike Sever-Bahçekapılı , Emine Eren-Koçak , Şeyda Demir , Semra Hız Kurul , Gökhan Karakülah , Hüsnü Alper Bağrıyanık , Mehmet Ozturk
	Autophagy is a highly conserved eukaryotic cellular process whose dysfunction results in

4. Tezi ile ilgili çalışmaları hakkında ulusal/uluslararası etkinliklerde sözlü, yazılı ve görsel sunum

Yüksel Demir Ş. Evaluation Of Regulatory T Cells And Exosomes In Thecplacental Tissue Of Patients With Maternal hypothyroidism. Poster Sunumu. NICHE2024; 16th **N**ational and 2nd **I**nternational **C**ongress of **H**istology and **E**mbryology. 26-28 Eylül 2024, 145.



Poster Presentation

EVALUATION OF REGULATORY T CELLS AND EXOSOMES IN THE PLACENTAL TISSUE OF PATIENTS WITH MATERNAL HYPOTHYROIDISM

ŞEYDA DEMİR YÜKSEL

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı,

ciydademir@gmail.com

Abstract

Introduction: Maternal hypothyroidism is defined as a deficiency of thyroid hormones during pregnancy and affects 4% of the population. Thyroid hormone deficiency during pregnancy influences the health of both the mother and the fetus. Thyroid hormones are crucial for the healthy development and neurodevelopment of the fetus, and their deficiency is well known to cause neurological developmental problems. These hormones reach the fetus via the placenta, and thyroid hormones play an active role in placental tissue throughout pregnancy. They are significant in the proliferation and differentiation of placental cells, and their deficiency has been shown to disrupt the anti-inflammatory environment in the placenta. The disruption of this anti-inflammatory environment leads to the impairment of maternal-fetal immune tolerance, which negatively affects maternal and fetal health by causing various pregnancy pathologies such as preterm birth, miscarriages, and preeclampsia. Maternal immune tolerance is essential for the maternal tissue's acceptance of the semi-allogeneic fetus. The establishment and maintenance of this tolerance depend on an active maternal immune tolerance state mediated by regulatory T cells (Tregs). Treg cells are a subgroup of T cells responsible for balancing excessive immune responses and controlling autoimmunity. Tregs are characterized by CD4, CD25, and FoxP3 (Forkhead family transcription factor forkhead box p3), and a deficiency in FoxP3 expression impairs their functions. In many pregnancy-related pathologies, a reduction in Treg cell populations has been observed. It is known that the release of exosomes increases under pathological conditions. Furthermore, exosomes have been shown to influence the proliferation and differentiation of Treg cells. However, the behavior of Tregs and exosomes in the placenta under conditions of maternal hypothyroidism remains unknown.

Objective: In this study, we aimed to investigate the distribution and concentration of FoxP3+ Treg cells and exosomes in healthy and hypothyroid placentas.

Method: In human placental tissues, Treg cells and exosomes were labeled using FoxP3 and CD63 antibodies, respectively, through immunohistochemistry (IHC). The distribution of Treg cells in the decidua and exosomes in the villi was determined. For quantitative analysis, the expression

levels of FoxP3 and CD63 were compared between healthy and patient groups using ELISA. Additionally, histomorphological changes in the placentas were evaluated between these two groups.

Results: IHC results showed a significant decrease in FoxP3 immunoreactivity in hypothyroid placentas compared to the control. Similarly, ELISA results supported the IHC findings.

Demir Ş., Filiz Yılmaz F., Bağrıyanık H.Alper, Sıçanlarda implantasyon ve inter-implantasyon alanlarının morfolojik ve eksozom varlığı açısından immuno-elektron mikroskopi ile değerlendirilmesi. Poster Sunumu, 24. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi.24-26 Nisan 2019, 30.



PB-08 Sıçanlarda implantasyon ve inter-implantasyon alanlarının morfolojik ve eksozom varlığı açısından immuno-elektron mikroskopi ile değerlendirilmesi

Şeyda Demir[1], Filiz Yılmaz[1], H. Alper Bağrıyanık[2]

[1]Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye.
[2]Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi (İBG), İzmir, Türkiye.
drfilizyilmaz@gmail.com

İmplantasyon, embriyo ve endometriyumun aktif olarak eş zamanlı katıldığı dinamik bir süreçtir. Eksozomlar, bu süreçte embriyo ve endometriyumun karşılıklı bilgi alışverişine aracılık eder. Böylece, endometriyumda implantasyon penceresinin oluşumuna katkıda bulunurlar. Sıçanlarda implantasyon penceresi, gebeliğin 5-6. günlerinde oluşurken, implantasyon alanları interimplantasyon alanları ile ayrılır. Sıçanlarda embriyo implantasyon ve inter-implantasyon alanlarının morfolojik ve moleküler açıdan karşılaştırılması hedeflenmiştir. Şuanki literatür bilgimiz ışığında, bu alanlar daha önce eksozom varlığı açısından değerlendirilmemiştir. Morfolojik olarak endometriyum luminal epitel yüzey özellikleri, pinopod yapıları ve moleküler olarak eksozomların varlığı, eksozom yüzey belirteci olan CD63 proteini yoluyla, immüno nano-gold işaretleme tekniği kullanılarak elektron Mikroskobu ile değerlendirilmiştir.

Çalışmada Wistar albino suşu kullanılmıştır. Katıma alma işlemi sonrası vajinal tıkacın görülmesi ile gebe olarak kabul edilen sıçanlar, implantasyon sürecinde izlenen değişiklikleri tespit etmek için 6. günde sakrifiye edilmiştir. Sakrifikasyondan hemen önce verilen intravenöz Chicago Blue boyası ile implantasyon alanlarının boyanması sağlanarak implantasyon ve inter-implantasyon alanları kolaylıkla tespit edilmiştir. Doku takibi sonrası kesitler lizinli lama alınarak nano-gold işaretlemesi yapılmıştır. Bunun için anti-CD63 ile tespit edilen ekzozomlar, nano-gold işaretlemesi ile elektron mikroskopta görünür hale getirilmiştir.

Sıçanlarda embriyo implantasyon ve inter-implantasyon alanlarının morfolojik ve ekzozom varlığı açısından karşılaştırılması yapılarak farklılıklar ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: eksozom, immüno-EM, implantasyon, inter-implantasyon, nano-gold

Evaluation of ımplantation and ınter-ımplantation areas in rats by ımmuno-electron microscopy in terms of morphological and presence of exosomes

Implantation is a dynamic process in which the embryo and endometrium are actively involved. In this process, exosomes mediate the exchange of information between the embryo and the endometrium. Thus, they contribute to the formation of the implantation window in the endometrium. The implantation window in rats occurs on days 5-6 of pregnancy and the implantation sites are separated by inter-implantation sites. Morphological and molecular comparison of embryo implantation and inter-implantation sites in rats is aimed. The regions have not been previously compared in terms of the presence of exosomes. Morphologically, endometrial luminal epithelial surface properties, pinopod structures and presence of exosomes were imaged by electron microscopy using immuno nano-gold labeling technique via exosome marker CD63.

Wistar albino strains were used in this study. The rats were considered to be pregnant with vaginal plugs after mating. Then the rats were sacrificed on day 6 to detect changes in endometrium. Implantation and inter-implantation sites were easily identified by staining the implantation sites with the intravenous Chicago Blue dye given immediately prior to the sacrification. After tissue preparation, sections were

placed on slides with lisine and nano-gold labelling was carried out. For this purpose, the exosomes detected with anti-CD63 were visualized by electron microscopy with nano-gold labeling.
The differences between embryo implantation and inter-implantation sites in rats were compared in terms of morphological and presence of exosomes.

Key Words: exosome, immuno-EM, implantation, inter-implantation, nano-gold