

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**HOFBAUER HÜCRELERİNİN PLASENTAL
DAMARLANMADAKİ MUHTEMEL
ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yasemin SEVAL ÇELİK

Doktora Tezi

Antalya, 2009

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

HOFBAUER HÜCRELERİNİN PLASENTAL DAMARLANMADAKİ MUHTEMEL ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yasemin SEVAL ÇELİK

Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ramazan DEMİR

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2007.03.0122.004)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurul ve Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince ‘Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisanüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği’ ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (Orjinalleri ekte sunulmuştur).

1. **Seval Y**, Korgun ET, Demir R. Hofbauer cells in early human placenta: possible implications in vasculogenesis and angiogenesis. Placenta 2007;28:841-845.
2. Demir R, **Seval Y**, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. Acta Histochem. 2007;109:257-265.
3. Sati L, **Seval Y**, Yasemin Demir A, Kosanke G, Kohnen G, Demir R. Cellular diversity of human placental stem villi: an ultrastructural and immunohistochemical study. Acta Histochem. 2007;109(6):468-479.
4. **Seval Y**, Sati L, Celik-Ozenci C, Taskin O, Demir R. The distribution of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and their receptors tie-1 and tie-2 in the very early human placenta. Placenta. 2008;29:809-815.
5. Sati L, **Seval-Celik Y**, Unek G, Korgun ET, Demir R. The presence of kinesin superfamily motor proteins KIFC1 and KIF17 in normal and pathological human placenta. Placenta. 2009;30(10):848-854.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 21/12/2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ramazan DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Ömür TAŞKIN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Attila DAĞDEVİREN
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Zeynep KAHVECİ
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Emin Türkay KORGUN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ../ ../ 2009 tarih ve ../.. sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

İnsan plasental villus stroması, birçok işlemde rol aldığı düşünülen ve Hofbauer hücreleri (HH) adı verilen makrofajlar içerir. Her ne kadar plasental vaskülogenez ve anjiyogenez üzerine çok sayıda çalışma bulunsun da, HH'lerinin bu işlemlerdeki rolleri hakkında yeterli bilgi yoktur. Bundan dolayı çalışmamızda HH'lerin plasental vaskülogenez ve anjiyogenezde önemli roller oynadıkları hipotezini kurduk ve HH'lerin damarlanmadaki potansiyel rollerini tanısal ve fonksiyonel deneylerle belirlemeyi amaçladık.

Çalışmamızda, insan normal erken gebeliklerden elde edilen plasenta dokuları, ışık ve elektron mikroskopi (TEM) araştırmaları ve in vitro çalışmalar için hazırlandı. Plasenta kesitlerine VEGF, Flt-1, Flk-1, Ang-1, Ang-2, Tie-1, Tie-2 ve Netrin-1 için immünohistokimya teknikleri uygulandı. HH'ler ve damar yapılarının sayıları ve yerleşimleri CD68 (Hofbauer hücre belirteci) ve CD31 (endotel hücre belirteci) ile çiftli boyanmış kesitlerde ışık ve konfokal mikroskopları aracılığıyla belirlendi. HH'lerin ince yapı özellikleri ve tipleri TEM ile incelendi.

Taze plasental dokulardan izole edilen HH'ler CD68 ve CD14 immünositokimyası ve TEM ile karakterize edildi. İzole edilen HH'ler kültüre edildi ve yönlendirilmiş besiyeri toplanarak anjiyogenik faktörler için ELISA ile test edildi. Ayrıca, anjiyogenez testi için HUVEC hücreleri, HH'lerden toplanan yönlendirilmiş besiyeri ile kültüre edildi.

Çalışmamızın sonuçlarına göre HH'lerin büyük çoğunluğu ya anjiyogenik hücre kordonları ve ilkel damar tüpleri ile yakın temastaydı ya da aralarına girmişlerdi. HH'lerin ve damar yapılarının villuslardaki sayıları anlamlı olarak ilişkili bulundu. Daha da ötesi, HH'lerin VEGF, Ang-2 ve Netrin-1'i eksprese ettikleri görüldü. Hatta HH yönlendirilmiş besiyerinin, özel bir matriks üzerinde kültüre edilen HUVEC hücrelerinin kapiller oluşumunu indüklediği görüldü.

Çalışmamız, HH'lerin makrofajik özelliklerinin yanında, plasenta için en önemli işlemlerden biri olan vaskülogenez ve anjiyogenezde yapısal olarak doğrudan, fonksiyonel olarak dolaylı rol aldıklarını gösteren ilk çalışmadır. Sonuçlarımıza göre, HH'ler vaskülogenez ve anjiyogeneze doğrudan katılırlar ve endotel hücreleri üzerinde anjiyogenik etkili faktörler salgırlar. HH'lerin plasental vaskülogenez ve anjiyogenezdeki potansiyel fonksiyonel rollerinin belirlenmesi, normal plasentasyonu kontrol eden mekanizmaları ve intrauterin büyüme geriliği ile pre-eklamps gibi plasentasyon sırasındaki vasküler gelişim bozukluklarının patofizyolojisini anlayabilmemize ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: İnsan plasentası; Hofbauer hücreleri; Vaskülogenez; Anjiyogenez; Hücre izolasyonu

ABSTRACT

The stroma of the placental villi contain numerous macrophages, so-called Hofbauer cells (HCs) which are of mesenchymal origin and are thought to function in many processes. Although there are many studies concerning placental vasculogenesis and angiogenesis, there has been a lack of evidence on the possible roles of HCs in these processes. We hypothesized that HCs play major roles in placental vasculogenesis and angiogenesis. Therefore we aimed to determine the potential roles of Hofbauer cells in vascularization by descriptive and functional experiments.

Placental tissues were obtained from normal first-trimester pregnancies and were prepared for light and transmission electron microscopic investigations as well as for in vitro culture studies. Immunohistochemistry for VEGF, Flt-1, Flk-1, Ang-1, Ang-2, Tie-1, Tie-2 and Netrin-1 was applied to placental sections. The numbers and localizations of HCs and vascular structures were assessed by double immunohistochemistry with CD31 (endothelial cell marker) and CD68 (Hofbauer cell marker) under light and confocal microscopes. The ultrastructural features and types of HCs were identified by electron microscopy.

HCs were isolated from fresh human first trimester placental tissues and characterized by CD68 and CD14 immunocytochemistry as well as TEM. The isolated placental macrophages were cultured and their conditioned media was collected for the determination of angiogenic factors by ELISA. Moreover, HUVECs were cultured with the collected conditioned media for the assay of angiogenesis.

According to our results, majority of the HCs were found to be either in close contact with angiogenic cell cords and primitive vascular tubes or located in between them. Moreover, the number of HCs and vasculogenic structures were found to be significantly correlated. HCs expressed and secreted angiogenic factors such as VEGF, Ang-2 and Netrin-1. Strikingly, Hofbauer cell conditioned medium induced capillary formation of HUVECs cultured on a special matrix.

Our study is of importance for being the first to determine that HCs not only have macrophagic properties, but also have conducting characteristics in the most important process for the placenta, which is vascularization. The findings of this study showed for the first time that there is a Hofbauer cell participation in vasculogenesis and angiogenesis and that these cells have angiogenic influences on endothelial cells. Further functional studies on the roles of HCs in placental vascularization will help elucidate the mechanisms that control normal placentation, which is important in understanding the pathophysiology of conditions associated with the impairment of vascular development during placentation such as intrauterine growth retardation and pre-eclampsia.

Keywords: Human placenta; Hofbauer cells; Vasculogenesis; Angiogenesis; Cell isolation

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleşmesinde;

Danışman hocam Prof. Dr. Ramazan DEMİR'e, tezimin gerçekleşmesi için göstermiş oldukları maddi ve manevi destekleri için,

Anabilim Dalımız'daki hocalarıma ve tüm arkadaşlarıma, ihtiyaç duyduğum her an yanımda oldukları için

Prof. Dr. Alp CAN'a, konfokal mikroskop incelemelerindeki değerli katkıları için,

Prof. Dr. Ömür TAŞKIN ve Dr. Ahmet ÜNEK'e, dokuların temininde bana her türlü kolaylığı sağladıkları için,

TEMGGA Ünitesinin değerli çalışanlarına teknik destekleri için,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli çalışanlarına tüm emekleri için,

Sevgili eşim Alper ÇELİK'e bu zorlu yolda gösterdiği anlayış, özveri ve desteği için,

Sevgili ailemin tüm fertlerine, bana her zaman destek oldukları ve sağladıkları tüm imkânlar için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yasemin SEVAL ÇELİK

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
EKLER	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Plasentanın Gelişimi	4
2.1.1. Pre-laküner Safha	4
2.1.2. Laküner Safha	5
2.1.3. Erken Villöz Safhalar	6
2.2. Villus Ağacının Yapısı	8
2.2.1. Kök villus (Stem villus, KV)	9
2.2.2. Matür intermediyet villus (MİV)	9
2.2.3. Terminal villus (TV)	10
2.2.4. İmmatür intermediyet villus (İMİV)	10
2.2.5. Mezenşimal villus (MV)	10
2.3. Villöz Stroma	10
2.3.1. Mezenşimal Hücreler	10
2.3.2. Retikulum Hücreleri	11
2.3.3. Fibroblast Hücreleri	11
2.3.4. Miyofibroblast Hücreleri	11
2.3.5. Mast Hücreleri	11
2.3.6. Plazma Hücreleri	12
2.3.7. Hofbauer Hücreleri	12
2.4. Hofbauer Hücreleri	13
2.4.1. Tarihçe	13
2.4.2. Morfoloji	13
2.4.2.1. Hofbauer Hücrelerinin İnce Yapı Özellikleri	16
2.4.3. Hofbauer Hücrelerinin Dağılımları	18
2.4.4. Hofbauer Hücrelerinin Kökeni	19
2.4.5. Hofbauer Hücrelerinin Görevleri	20
2.4.6. Hofbauer Hücrelerinin İmmünolojik Yönleri	20

2.5.	Vaskülogenez ve Anjiyogenez	22
2.5.1.	Vaskülogenez	23
2.5.2.	Anjiyogenez	23
2.6.	Plasental Villöz Damarların Gelişimi ve Yapısı	25
2.6.1.	Vaskülogenez 1	25
2.6.2.	Vaskülogenez 2	26
2.6.3.	Anjiyogenez 1	28
2.6.4.	Anjiyogenez 2	29
2.6.5.	Anjiyogenez 3	30
2.7.	Vaskülojenik ve Anjiyogenik Faktörler	31
2.7.1.	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	31
2.7.2.	Anjiyopoietinler (Ang-1 ve Ang-2)	33
2.7.3.	Netrin-1	34
2.8.	Plasentada Vaskülojenik ve Anjiyogenik Faktörler	34
2.9.	Hipotez	35
GEREÇ ve YÖNTEM		36
3.1.	Dokuların Alınması ve Hazırlanması	36
3.1.1.	Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi	36
3.1.2.	Elektron Mikroskop İncelemeleri İçin Doku Takibi	37
3.2.	İmmunohistokimya Yöntemi	37
3.3.	Çiftli İmmunohistokimya Yöntemi	39
3.3.1.	Hofbauer Hücre ve Damar Sayımı	42
3.4.	Çiftli İmmunofloresan Boyama Yöntemi ve Konfokal Mikroskop İncelemeleri	42
3.5.	Hücre Kültürü İncelemeleri	44
3.5.1.	Hofbauer Hücre İzolasyonu	46
3.5.1.1.	Yapışma ile Hücre Ayırıştırma Deneyi (Attachment Assay)	46
3.5.1.2.	Fikol ile Yoğunluğa Bağlı Gradient Santrifügasyonu ve Ardından Yapışma Deneyi	47
3.5.1.3.	Önce Fikol Ardından Perkol ile Yoğunluğa Bağlı Gradient Santrifügasyonu Deneyi	48
3.5.1.4.	“Accuspin Histopak” Sistemi ile Santrifügasyon Deneyi	48
3.5.2.	Hücre Karakterizasyonunun Yapılması	48
3.5.2.1.	İmmünohistokimya Yöntemi	49
3.5.2.2.	İzole Edilen Hücrelerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile İncelenmesi	51
3.5.3.	İzole Edilen Hücrelerin Kültürü ve ELISA ile Anjiyogenez Deneyi İçin Yönlendirilmiş Besiyerinin Toplanması	53
3.5.4.	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	53
3.5.5.	HUVEC İzolasyonu ve Kültürü	55
3.5.6.	Anjiyogenez Deneyi	55
3.5.6.1.	Anjiyogenez Deneyi için Uygun HUVEC Hücre Sayısının Belirlenmesi	56

3.5.6.2.	Hofbauer Hücresi -Yönlendirilmiş Besiyeri ile Anjiyogenez Deneyi	57
3.6.	İstatistiksel Analiz	57
BULGULAR		59
4.1.	Erken Plasental Örneklerde Hofbauer Hücrelerinin Damar Yapıları ile İlişkisi	59
4.1.1.	CD31 ve CD68 ile Çiftli İmmünohistokimya Bulguları	59
4.1.2.	CD31 ve CD68 ile Çiftli İmmünofluoresan Bulguları	65
4.1.3.	Konfokal Mikroskopi Bulguları	67
4.2.	İmmatür İntermediyet Villuslarda (İMİV) Hofbauer Hücre Sayıları ile Damar Yapıları arasındaki İlişki	69
4.3.	Erken Plasental Örneklerde Anjiyogenik Faktörlerin İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi	70
4.3.1.	VEGF ve Reseptörleri Flt-1 ile Flk-1 'in Hofbauer Hücrelerindeki Ekspresyonu	70
4.3.2.	Anjiyopoietinler (Ang-1 ve Ang-2) ve Reseptörleri (Tie-1 ve Tie-2)'nin in Hofbauer Hücrelerindeki Ekspresyonu	72
4.3.3.	Netrin-1'in Hofbauer Hücrelerindeki Ekspresyonu	74
4.4.	Hücre Kültürü Bulguları	75
4.4.1.	Hofbauer İzolasyonu	75
4.4.1.1.	Yapışma ile Hücre Ayrıştırma Deneyinin (Attachment Assay) Bulguları	75
4.4.1.2.	Fikol ile Yoğunluğa Bağlı Gradient Santrifügasyonu ve Ardından Yapışma Deneyinin Bulguları	76
4.4.1.3.	Önce Fikol, Ardından Perkol ile Yoğunluğa Bağlı Gradient Santrifügasyonu Deneyinin Bulguları	77
4.4.1.4.	"Accuspin Histopak" Sistemi ile Santrifügasyon Deneyinin Bulguları	78
4.4.2.	İzole Edilen Hücrelerin Karakterizasyonu	79
4.4.2.1.	İzole Edilen Hücrelerin Faz-Kontrast Mikroskobunda Değerlendirilmesi	79
4.4.2.2.	İmmünofluoresan ile Hücre Tayini	81
4.4.2.3.	İzole Edilen Hücrelerin İnce Yapısının İncelenmesi	82
4.4.3.	ELISA Deneyinin Bulguları	84
4.4.3.1.	VEGF-ELISA Bulguları	84
4.4.3.2.	Ang-1-ELISA Bulguları	85
4.4.3.3.	Ang-2-ELISA Bulguları	85
4.4.4.	Anjiyogenez Deneyinden Elde Edilen Bulgular	86
4.4.4.1.	HUVEC Hücreleri ile Anjiyogenez Deneyinin Bulguları	86
4.4.4.2.	Hofbauer hücresi-Yönlendirilmiş Besiyeri ile Yapılan Anjiyogenez Deneyinin Bulguları	89

TARTIŞMA	92
SONUÇLAR	100
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	117
EKLER	

Ek 1. Seval Y, Korgun ET, Demir R. Hofbauer cells in early human placenta: possible implications in vasculogenesis and angiogenesis. Placenta 2007;28:841-845.

Ek 2. Demir R, Seval Y, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. Acta Histochem. 2007;109:257-265.

Ek 3. Sati L, Seval Y, Yasemin Demir A, Kosanke G, Kohnen G, Demir R. Cellular diversity of human placental stem villi: an ultrastructural and immunohistochemical study. Acta Histochem. 2007;109(6):468-479.

Ek 4. Seval Y, Sati L, Celik-Ozenci C, Taskin O, Demir R. The distribution of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and their receptors tie-1 and tie-2 in the very early human placenta. Placenta. 2008;29:809-815.

Ek 5. Sati L, Seval-Celik Y, Unek G, Korgun ET, Demir R. The presence of kinesin superfamily motor proteins KIFC1 and KIF17 in normal and pathological human placenta. Placenta. 2009;30(10):848-854.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KV	: Kök villus
MİV	: Matür intermediyet villus
TV	: Terminal villus
İMİV	: İmmatür intermediyet villus
MV	: Mezenşimal Villus
IgG	: İmmünglobulin G
MHC	: Majör doku-uyumluluk kompleksi
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
SEM	: Tarayıcı elektron mikroskobu
FcR	: Fc reseptörü
TLR-4	: Toll-benzeri reseptör 4
LPS	: Lipopolisakkarit
HIV	: İnsan immün-yetmezlik virüsü
IL-1	: İnterlökin-1
EH	: Endotelyal hücreler
EPH	: Endotelyal progenitör hücreler
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR-1	: Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü-1
Flt-1	: Fms-benzeri tirozin kinaz-1
Flk-1	: Fötal karaciğer kinazı
VEGFR-2	: Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü-2
bFGF	: Bazik fibroblast büyüme faktörü
GM-CSF	: Granülosit-monosit koloni stimülan faktör
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
PDGF	: Trombosit kökenli büyüme faktörü
Ang-1	: Anjiyopoietin-1
Ang-2	: Anjiyopoietin-2
Tie-1	: Ig ve EGF homoloji domeyini içeren tirozin kinaz

Tie-2	: Tunika endotelyal hücre tirozin kinazı
PlGF	: Plasental büyüme faktörü
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
IL-8	: İnterlökin-8
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü- α
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
G-CSF	: Granülosit koloni stimülan faktör
MAPK	: Mitojen ile aktive olan protein kinaz
HBSS	: Hank'in dengeli tuz solüsyonu
HUVEC	: İnsan göbek kordonu venöz endotel hücreleri
PBS	: Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
DAB	: 3,3' Diaminobenzidine
HRP	: Horse-radish peroksidaz
AP	: Alkalen fosfataz
DAPI	: 4,6-diamino-2-phenylindole
FBS	: Fötal sığır serumu
CK-7	: Sitokeratin-7
ELISA	: Enzim aracılı immünosorbent deneyi
ESM	: Ekstrasellüler matriks
AHK	: Anjiyogenik hücre kordonları
DT	: Damar tübü
HYB	: Hofbauer hücresi-yönlendirilmiş besiyeri
EBB	: Endotelyal Büyüme Besiyeri
HB	: Hofbauer besiyeri
BB	: Bazal besiyeri
MCP-1	: Monosit kemotaktik protein-1
PCNA	: Çoğalan hücre çekirdek antijeni

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
2.1.1. Erken plasental gelişimin tipik basamakları	7
2.2.1. Olgun plasental ağacın uç kısımları ve çeşitli villus tiplerinin enine kesit çizimi	9
2.4.2.1. Hofbauer hücresi ve mast hücresinin karşılaştırması	14
2.4.2.2. İmmatür intermediyet villusun (İMİV) tipik yapısı	16
2.4.2.3. Hofbauer hücresinin geçirimli elektron mikrografı	17
2.4.2.4. Hofbauer hücresi tipleri	18
2.5.2.1. Anjiyogenez tiplerini gösteren şekil	24
2.6.1.1. Plasental villus tiplerinde vaskülogenez ve anjiyogenez	25
2.6.2.1. Plasental villusta vaskülogenez ve anjiyogenez mekanizmaları	28
2.6.3.1. Fötal damar gelişime bağlı villöz gelişim	31
3.5.4.1. ELISA standardlarının hazırlanması	54
3.5.6.1. Anjiyogenez testinin prensibi	56
4.1.1. İMİV kesidinde anjiyogenik hücre kordonlarının (AHK) ve damar tüplerinin (DT) yerleşimi	60
4.1.2. CD31 ve CD68 ile yapılan çiftli immünohistokimya fotoğrafı ve Hofbauer hücresinin elektron mikrografı	61
4.1.3. Hofbauer hücreleri ve damar yapıları arasındaki yakın ilişki görülmektedir	62
4.1.4. Hofbauer hücreleri, AHK'ler ve DT'lerle ilişkisinin şekline göre farklı özellikler ve yerleşimler sergilemektedir	63
4.1.5. Hofbauer hücreleri damar oluşumuna adeta rehberlik etmektedir	65
4.1.2.1. CD68 ve CD31 İmmünofluoresan tekniği ile boyanmış İMİV kesidi	66
4.1.3.1. İMİV kesidinin konfokal mikroskop görüntüleri	67
4.1.3.2. İmmünofluoresanla boyanmış immatür intermediyet villusun (İMİV) farklı derinliklerden geçen kesitlerinin konfokal görüntüleri	68
4.2.1. İmmatür intermediyet villuslarda (İMİV), Hofbauer hücre sayıları ile vasküler yapı sayıları arasındaki ilişki	69
4.3.1.1. VEGF ve reseptörleri Flt-1 ile Flk-1'in erken dönem insan plasentasında immünohistokimyasal olarak gösterilmesi	71

4.3.1.2. VEGF ve CD68'in çiftli immünohistokimya ile Hofbauer hücrelerinde gösterilmesi	72
4.3.2.1. Ang-1 ve Ang-2 'nin erken dönem insan plasentasında immünohistokimyasal olarak gösterilmesi	73
4.3.2.2. Erken dönem insan plasentasında Tie-1 ve Tie-2 immünohistokimyası	74
4.3.3.1. Erken dönem insan plasentasında Netrin-1'in immünohistokimyası	74
4.4.1.1. Hücre kültüründe yapışma deneyinden elde edilen hücrelerin immünofluoresanla boyanması	75
4.4.1.2. Fikol gradient santrifügasyonu sonrasında yapışma deneyinden elde edilen hücreler	77
4.4.1.3. Fikol ve ardından Perkol gradient santrifügasyonu sonunda elde edilen hücreler	78
4.4.1.4. "Accuspin Histopak" sistemi ile santrifügasyon sonunda elde edilen hücreler	79
4.4.2.1. İzole edilen Hofbauer hücrelerinin Faz-Kontrast görüntüleri	80
4.4.2.2. Fikol ile yoğunluğa bağlı gradient santrifügasyonu ve ardından yapışma deneyinin sonucunda elde edilen hücrelerin karakterizasyonu	81
4.4.2.3. İzole edilen hücrelerin faz-kontrast ve TEM görüntüleri	83
4.4.2.4. İzole edilen hücrelerin faz-kontrast ve TEM görüntüleri	84
4.4.3.1. Hofbauer-yönlendirilmiş besiyerinin VEGF protein miktarlarını gösteren grafik	85
4.4.3.2. Hofbauer-yönlendirilmiş besiyerinin Ang-2 protein miktarlarını gösteren grafik	86
4.4.4.1. Farklı konsantrasyondaki HUVEC hücrelerinin anjiyogenik puanları	87
4.4.4.2. HUVEC hücrelerinin ESM matris içinde endotelial büyüme besiyeri ile 3 saat inkübasyonu ile yapılan anjiyogenez deneyinin görüntüleri	88
4.4.4.3. Anjiyogenez deneyinin zamana bağlı ilerleyişi	89
4.4.4.4. Hofbauer hücresi-yönlendirilmiş besiyerinin anjiyogenik kapasitesi	90
4.4.4.5. Hofbauer hücresi yönlendirilmiş besiyeri ile yapılan Anjiyogenez deneyinin görüntüleri	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No	Sayfa
3.2.1. İmmünohistokimya deneyinde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve izotip kontroller	39
3.3.1. Çiftli immünohistokimya deneyinde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve izotip kontroller	42
3.4.1. Çiftli immünofluoresan deneyinde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve izotip kontroller	44
3.5.2.1. İmmünofluoresan deneyinde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve izotip kontroller	50
3.5.6.1. Damar tüp oluşumu paterninin değerlendirilmesi	57
4.3.1. Antikorların Hofbauer hücrelerindeki immüno-boyanma şiddeti	70

GİRİŞ ve AMAÇ

İnsan plasentası, intrauterin dönemde anne ile fetüs arasında besinlerin ve atıkların transferi, hormonların sentezi ve salgılanması ve fetüsün korunması gibi, fotal büyüme ve gelişim için önemli görevler yapan bir organdır. Plasenta gelişimi, farklı hormonları ve büyüme faktörlerini üretebilen ve bunlara yanıt verebilen sayısız hücre tipinin etkileşimini içeren kompleks bir işlemdir.

Damar ağının oluşturulması, olgunlaştırılması ve devamlılığı, başarılı hemokoryal plasantasyon için olduğu kadar normal embriyonik gelişimin sağlanması için de gereklidir. İnsan plasentası, yoğun vaskülogenez ve anjiyogenezin birlikte görüldüğü nadir organlardandır.

Vaskülogenez ve anjiyogenez, fetüs ve plasenta için kritik öneme sahip olup; fotal ve plasental damarların gelişimi için gereklidir. Plasental vaskülogenez, plasental villus özünde yerleşik çok potansiyelli öncü hücrelerden yeni damarların ilk kez oluşturulması işlemidir. Mevcut olan endotelden yeni damar oluşumu olan anjiyogenez ise, vaskülogenez ile oluşturulan damarlardan yeni damarların oluşturulması ve bu şekilde bir damar ağının meydana getirilmesi işlemidir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), buna ait reseptörler; VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2 (Flk-1/KDR), plasental büyüme faktörü (PlGF), Anjiyopoietinler (Ang-1 ve Ang-2) ve reseptörleri (Tie-1 ve Tie-2) gibi vaskülogenez ve anjiyogenez indükleyen ve düzenleyen birçok lokal üretimli faktör ve reseptör bulunmaktadır.

İnsan plasantasının büyük kısmını koryonik villus ağacı oluşturur. Her villusun yapısal iskeletini, fotal makrofajlar olan Hofbauer hücrelerinin yerleştiği bir stroma (mezenşimal villus özü) ve onu çevreleyen sitotrofoblast ile sinsisyotrofoblast tabakaları oluşur.

Hofbauer hücreleri fagositoz yetenekleri ve mikropinositoz aktiviteleri ile tipik makrofaj karakterlerini gösterirler. Hofbauer hücrelerine, stromal sıvı dengesinin düzenlenmesi, immün komplekslerin absorpsiyonu, antijen sunma ve iyon akışı gibi birçok görev yüklenmiştir. Villöz stromanın olgunlaşması ve yeniden modellenmesi esnasında farklı Hofbauer hücre tiplerinin gözlemlendiği bildirilmiştir.

Plasental gelişimin erken devrelerinde görülen vaskülogenez ve anjiyogenezle, Hofbauer hücrelerinin eş zamanlı olarak belirmesi, bu hücrelerin plasental

damarlanmada parakrin rolleri olabileceğine işaret etmektedir. Yine de, Hofbauer hücrelerinin plasental damarlanmaya katılıp katılmadıkları henüz tarif edilmemiştir.

Hipotezimiz; Hofbauer hücreleri, plasental vaskülogenez ve anjiyogeneze hem yapısal, hem de fonksiyonel olarak katılırlar. Bu bağlamda amacımız; Hofbauer hücrelerinin plasental vaskülogenez ve anjiyogeneze önemli rollerini araştırmak için, tanısal deneylere ek olarak fonksiyonel deneylerle plasental makrofajların vaskülogenez ve anjiyogenezdaki rollerini belirlemektir.

GENEL BİLGİLER

Memeliler gebelikleri boyunca fetüsü saran bir zarlar sistemi geliştirirler. Bu zarların materno-fötal fizyolojik değişimler için rahim mukozasıyla karşı karşıya gelmesi veya kaynaşması, plasentanın gelişimini başlatır. Fetüs, göbek kordonu aracılığıyla bağlı olduğu koryonik kese ile çevrilidir. Koryonik kese rahim boşluğunda bulunur ve hemen hemen tüm yüzeyi ile endometriyumla temas halindedir. Endometriyum ve koryon tarafından sağlanan materno-fötal temas bölümü, plasentayı temsil etmektedir.

Bu özgün olmayan tanımlama, organın önemli fonksiyonel ve yapısal farklılıklar gösterebileceğine işaret etmektedir. Türler arası bu kadar önemli farklılıklar içeren başka bir organ yoktur. Türleri kıyaslarken, plasentanın dış şekli, iç yapısal özellikleri o kadar değişkenlik gösterebilir ki, sadece insan plasentasına aşina plasentologların bile, plasenta olarak tanımlayamayacağı plasenta tipleri bulunmaktadır. Tüm plasentalarda ortak olan tek nokta, hepsinin iki farklı dolaşım sistemine; maternal ve fötal sistemlere sahip olmalarıdır. Normal şartlar altında her iki sisteme ait damarlar gebelik boyunca birçok doku tabakasıyla birbirlerinden ayrılırlar. Plasental bariyer veya kanlar-arası (interhemal) zar adını alan bu ayırıcı dokuların kökeni de değişiklikler göstermektedir.

Plasenta, çoğu fötal organın görevini yapan (lokomotor sistem ve santral sinir sistemi hariç) eşsiz bir organdır. Aşağıda belirtilen fötal fonksiyonlar gebelik sırasında kısmen veya tamamen plasenta tarafından üstlenilmektedir:

- Akciğer yerine gaz transferinin yapılması,
- Böbrek yerine salgılama, su dengesi, pH'ın düzenlenmesi,
- Bağırsaklar yerine katabolik ve rezorbtif fonksiyonların yerine getirilmesi,
- Çoğu endokrin organın sentez ve salgısal işlevlerinin görülmesi,
- Karaciğerin sayısız salgısal ve metabolik işlevinin görülmesi,
- Gebeliğin erken döneminde hematopoezin oluşması,
- Derinin ısı transferi yapması,
- Birçok immünolojik görevin başarılması

Bu kadar çok görevi yapan bir organın her türde aynı yapıda bir filogenetik gelişim göstermesi mümkün değildir. Bu durumun mantıksal bir sonucu olarak dış yapısı, materno-fötal girinti-çıkıntılar (interdigitasyon) ve materno-fötal engelin (bariyerin) yapısı ile farklılık gösteren birçok plasenta tipi mevcuttur.

2.1 Plasentanın Gelişimi

Plasentanın gelişimi; “pre-laküner”, “laküner” ve “erken villöz” safhalar olmak üzere üç ana başlıkta incelenebilir (Şekil 2.1.1).

2.1.1. Pre-laküner Safha

Plasentanın gelişimi fetal zarların rahim mukozasıyla yakın ve sabit temaslar kurmasıyla (blastosistin implantasyonu) başlar. İmplantasyonun ilk basamağı apozisyonudur. İnsanda implantasyon, koitus sonrası (pc.- post coitus) 6-7. günlerde görülür. Bu evrede implante olan blastosist 107-256 hücreden oluşur (1). Hücrelerin (trofoblast) çoğu blastosistik boşluğu çevreleyen dış duvarı yapar (Şekil 2.1.1.a). Genel ifade ile, trofoblastlar placentada dahil, fetal zarların öncüsüdürler. Daha büyük hücrelerin oluşturduğu iç hücre kitlesi embriyoblastları oluşturur. Embriyo, göbek kordonu ve amniyon bu hücrelerden köken alır. Daha da ötesi, hem embriyoblast kökenli mezenşim, hem de embriyoblast kökenli damarlar, plasentanın oluşumuna katılırlar.

Tüm türlerde implantasyon, blastosistik trofoblastların apikal plazma membranı ile uterus epitelinin apikal plazma membranlarının birleşmesi ile başlar. Bu fenomen, Denker (1990) tarafından bir hücreli biyoloji paradoksu olarak ortaya konmuştur; çünkü epitelin apikal plazma membranları normalde yapışkan değildir (2). Yapışkanlık, birbirlerine ve bazal laminalarına yapışma özelliği bulunan bazo-lateral epitelyal membranlara ait bir özelliktir.

Blastosist fallop tüpüne (yumurta kanalı, tuba uterina) ve oradan uterus boşluğuna gelinceye kadar, blastosist ve endometrium, pre-implantasyon evre süresince bu doğal özelliği gösterirler. Her iki epitelin (uterus ve blastosist trofoblastı) apikal yapışkanlığının ortaya çıktığı kısa ve çok özel evreye “implantasyon penceresi” denir (3).

Endometriyal epitele blastosistin tutunması ve nüfuz etmesi (invazyon) sırasında, blastosistin implante olan kutbundaki trofoblast hücreleri hızlıca çoğalarak iki tabaka trofoblast oluşturur (4). İki tabakadan dışta olan (maternal dokuya bakan) trofoblast hücreleri birbirleri ile birleşir füzyona uğrar ve sinsisyotrofoblast tabakayı oluşturur. Blastosist duvarının maternal dokuya ulaşamayan geriye kalan hücreleri birleşme (füzyon) göstermez ve sitotrofoblast adını alır (Şekil 2.1.1.a). Takip eden diğer günler boyunca ve artan invazyonla beraber trofoblastlar çoğalır, sinsiyotrofoblast kitlesi artar ve implantasyon kutbunda belirgin bir kalınlığa ulaşır. İmplantasyon kutbunda, düzgün yüzeyli bir kitle halinde değil, parmaklı çıkıntılar şeklinde uzantılar ve dallarla endometriyumun derinlerine invaze olurlar. 7-8. günler arasında gerçekleşen ve sinsisyotrofoblastların bazal çıkıntıları hariç daha katı bir yapıda izlendiği bu evre “prelaküner safha” olarak adlandırılmıştır (5).

Sinsisyotrofoblast oluşumu sırasında çoğalma potansiyellerini kaybederken, trofoblastların büyümesi ve çoğalmasını “kök hücre” şeklinde davranan sitotrofoblastlar sağlarlar. Sinsisyotrofoblastlar çekirdek bölünmesi yerine hücresel füzyonla oluşurlar. Sinsisyotrofoblastlar kesintisiz bir sistem oluşturur ve hücrelerarası (intersellüler) aralıklarla ayrılmazlar. Diğer bir ifade ile, sinsiyotrofoblast tabakası, aralarında hücre membranı olmayan bir epitel tabakasıdır. İmplantasyon sürecinde oluşan taslak embriyonun çevresini saran iki trofoblast tabakası ve onların altında (embriyo ile trofoblast arasında) bulunan embriyodışı mezoderm (ekstraembriyonik mezoderm) den oluşan birime “koryon” denir.

2.1.2. Laküner Safha

pc. 8. günde implantasyon kutbunda büyüyen sinsisyotrofoblastik kitle içerisinde küçük sinsisyum-ichi (intrainsisyal) vakuoller oluşmaya başlar. Vakuoller hızlıca büyür ve bir laküna sistemi oluşturur (Şekil 2.1.1.b, c). Laküna oluşumu implantasyon kutbunda başlar ve gebelik ilerledikçe sinsisyotrofoblastik kitle tüm blastosist yüzeyini kaplar. Bu olay blastosistin iyice derinlere implantasyonu ve dolayısıyla uterus epitelinin implantasyon alanının üstünü örtmesiyle pc. 12. günde son bulur (1). Bu evrede blastosistin yüzeyi tamamen sinsisyotrofoblast ile kaplıdır. Trofoblastik çoğalma ve sinsisyal birleşme (füzyon) implantasyon kutbunda başladığı için, anti-implantasyon alanı ile kıyaslandığında trofoblastik duvar burada daha kalındır. İmplantasyon kutbundaki bu daha kalın trofoblast tabakası daha sonra plasentayı yapar ve daha ince olan karşı taraftaki ince trofoblastik kabuk, başlangıçta aynı yapıyı oluşturmaya çalışsa da gerileyerek düz koryonu (koryon leve) oluşturur. Laküna oluşumu blastosistin üzerini örten trofoblastik örtüyü üç tabakaya ayırır (Şekil 2.1.1.c, d):

- 1- Blastosist boşluğuna bakan birincil (primer) koryonik plak
- 2- Trabekülalarla beraber laküner sistem
- 3- Endometriyuma bakan trofoblastik kabuk

Birincil koryonik plak, yer yer iki, bazen üç katman oluşturan kesintisiz bir sitotrofoblast tabakasından oluşur. Lakünalara doğru, bu sitotrofoblastlar sinsisyotrofoblastlarla örtülüdür (Şekil 2.1.1.d). pc. 14. günde mezenşimal hücreler sitotrofoblastların iç yüzeyine dağılırlar ve burada gevşek bir ağ yapısındaki embriyo dışı mezenşimi (ekstra embriyonik mezenşim) oluştururlar.

Birincil (primer) koryonik plağın daha aşağısında laküner sistem bulunur. Bu lakünalar, trabeküla adını alan sinsisyotrofoblast bölmeleri (septaları) ile birbirlerinden ayrılırlar (Şekil 2.1.1.d). pc. 12 günde, bu trabekülalar primer koryonik plaktan köken alan sitotrofoblastlar tarafından işgal edilirler (Şekil 2.1.1.d). Birkaç gün içerisinde, sitotrofoblastlar bütün trabekülalar boyunca uzanırlar. Trabekülaların uç kısımlarının birleştiği yerde trofoblastın en dış kısmı olan trofoblastik kabuğu oluştururlar (1). Lakünalar başlangıçta sadece sinsisyotrofoblastlardan oluşurken, sitotrofoblastların

lakünalar aracılığıyla kabuğa ulaşması ile (15. gün pc.) daha heterojen bir yapı kazanır (Şekil 2.1.1.e). Sinsisyotrofoblast lakünaların alt kısmını oluşturur ve yer yer çok tabakalılık gösteren sitotrofoblastlarla devam eder.

İmplantasyonun erken evrelerinde maternal dokunun erozyonu sinsisyal trofoblastların litik (eritici) etkisi ile gerçekleşir ve sitotrofoblastların kabuğun en altında bulunması bu durumu değiştirir. Sitotrofoblastların hızlı çoğalma (proliferatif) özelliği ve endometriyumun derinliklerine hızlı göçü, invazyon ve implantasyon alanının genişlemesini sağlar (1, 6).

Endometriyal stroma da bu işlemler sırasında önemli değişiklikler geçirir. İnvaze olan trofoblastların varlığı ve hormonal aktivitesi, endometriyal stromal hücrelerinin çoğalması ve büyümesine sebep olur ve böylece stromal hücreler desidual hücrelere dönüşür (7).

Bazal sinsisyotrofoblastın invazif aktivitesi 12. pc. günde mevcut bulunan maternal kan damarlarının bozulmasına neden olur. Aynı zamanda, bozulan damarlardan dışarı sızan kan hücreleri ilk kez lakünalar içinde görülmeye başlar (1).

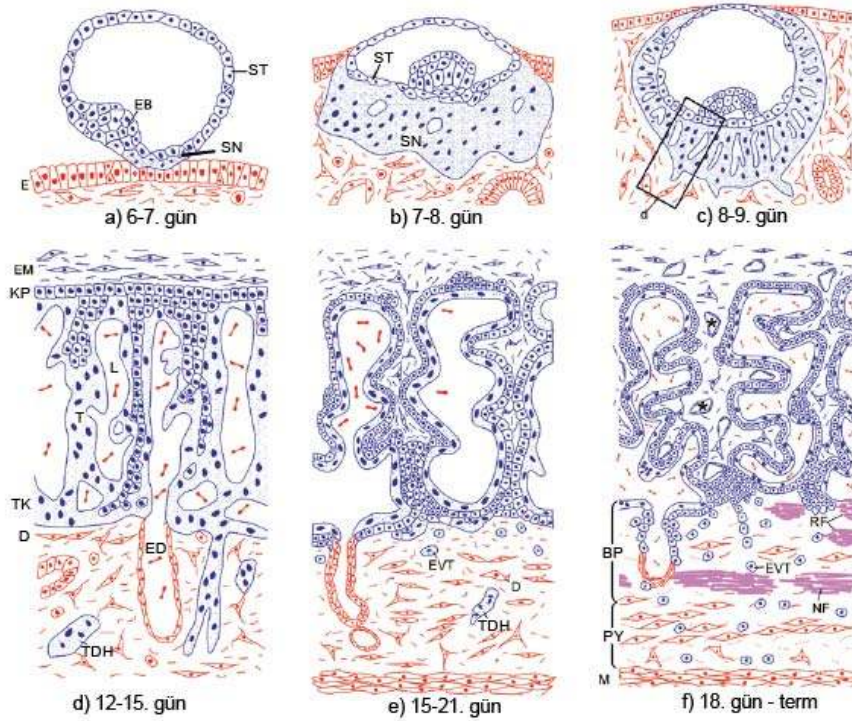
Daha sonraki gelişimsel basamaklarda, bütün lakünalar sistemi maternal kanla dolmaya (perfüze olmaya) başlar. Endometriyumun daha derinlerinin invazyonu ile spiral arterler de erode edilir ve lakünalar içi kan basıncının artışına neden olur. Böylece plasentanın ilk gerçek maternal sirkülasyonu başlamış olur.

2.1.3. Erken Villöz Safhalar

pc. 13. günde ilk maternal eritrositlerin lakünalarda görülmesinden hemen sonra trabekülalarda artan sitotrofoblast çoğalması (proliferasyonu) ve sinsisyal füzyon görülür. Sonuç olarak sadece uzamasına değil, lakünalara doğru yan dallar veren bir trabeküler büyüme görülür (Şekil 2.1.1.d, e). Boyu ve çapı büyüyen bu birincil (primer) villuslar sitotrofoblastlarca invaze edilir. Böylece plasentanın villöz safhaları başlamış olur. Artarak ilerleyen çoğalcı (proliferatif) aktivite ve primer villusların dallanması ile villöz ağaç ve trabeküladan gelişen kökleri oluşur (Şekil 2.1.1.e). Bu kökler trofoblastik kabukla ilişkide ise “demirleyici villuslar” adını alırlar. Bu arada, laküner sistem de intervillöz aralığa dönüşür.

Sadece 2 gün sonra, primer koryonik plağın ekstraembriyonik mezenşimi/mezodermi villusların içine doğru girmeye başlar ve sekonder (ikincil) villuslar oluşur (Şekil 2.1.1.e). Birkaç gün içerisinde, mezenşim periferik olarak villus uçlarına ve demirleyici villusların tabanına doğru genişler (1) fakat trofoblastik kabuğa ulaşmaz. İlk fetal kapillerler, 18-20. günler pc. arasında villusların özünü (stroma) oluşturan mezenşim dokuda gözlenir. Bunlar lokal olarak mezenşimal hücrelerden farklılaşan hemanjiyoblastik progenitor hücrelerden köken alırlar (8, 9). Aynı progenitor

hücreler, erken endotel ile döşeli primitif kapillerler içinde yer alan hematopoietik kök hücrelere de kaynaklık ederler. Villöz stromada kapiller kesitlerinin görülmeye başlaması ile tersiyer (üçüncül) villuslardan bahsedilir (Şekil 2.1.1.f). Terme kadar, fetal olarak damarlandırılan bu villuslara tersiyer villus denir. Buna rağmen sadece yeni villöz oluşumlar (trofoblastik ve villöz tomurcuklar) veya geçiş dönemindeki villuslar, primer veya sekonder villuslara karşılık gelir.



Şekil 2.1.1. Erken plasental gelişimin tipik basamakları. a, b) Pre-laküner safha; c) Laküner safha; d) Laküner safhadan primer villus safhasına geçiş; e) Sekonder villus safhası; f) Tersiyer villus safhası. SN: Sinsisyotrofoblast; ST: Sitotrofoblast; EB: Embriyoblast; E: Endometriyal epitelyum; D: Desidua; EM: Ekstraembriyonik Mezoderm; L: Maternal Kan Lakünesi; ED: Endometriyal Damar; KP: Primer Koryonik Plak; TK: Trofoblastik Kabuk; T: Trabekül=primer villus; EDT: Ekstra Villöz Trofoblast; BP: Bazal Plak; PY: Plasental Yatak; NF: Nitabuch'un Fibrinoidi; RF: Rohr Fibrinoidi; TDH: Trofoblastik Dev Hücre; (*): Fötal kan damarı. Kırmızı: Maternal hücreler, Mavi: Fötal hücreler, Mor: Maternal-Fötal karışık yapı (10).

Villuslarda fetal damarlanma başlar başlamaz, yine fetal olarak damarlanan allantoyis, koryonik plağa ulaşır ve birleşirler. Allantoyik damarlar koryonik plağın içine ve Benirschke'ye göre hatta büyük villusların içine doğru dahi büyür (11) ve burada yerel (lokal) olarak oluşmuş intravillöz kapiller segmentlerle temasa geçerler. Tam bir fetoplazental dolaşım 5.haftanın (pc.) başında yeterli miktardaki kapiller segmentin düzenli bir kapiller yatağı oluşturmak üzere birleşmesiyle birlikte görülür. Takip eden haftalarda da intravasküler hematopoez görülür.

Erken villus ağacının gelişmesi şu şekilde gerçekleşir (12): Daha büyük villusların yüzeylerinde yerel (lokal) sitotrofoblast çoğalması ve ardından sinsisyal birleşme (füzyon) ile sinsisyal tomurcuklar oluşur (Şekil 2.2.1). Bu tomurcuklar erken primer villuslara benzerler ve sadece trofoblastlardan oluşurlar. Bu tomurcukların birçoğu dejenere olurken, sadece bazıları villöz mezenşimle istila edilir ve villöz tomurcuklara dönüşürler. Villöz tomurcuklar yapısal olarak plasentasyonun primer villuslarına karşılık gelirler. Stroma içinde fetal damarların oluşumu (Şekil 2.2.1), uzamaları ve genişlemeleri ile birlikte mezenşimal villuslar oluşur. Bunların yüzeyleri boyunca tomurcuk oluşumu yeniden gözlenebilir.

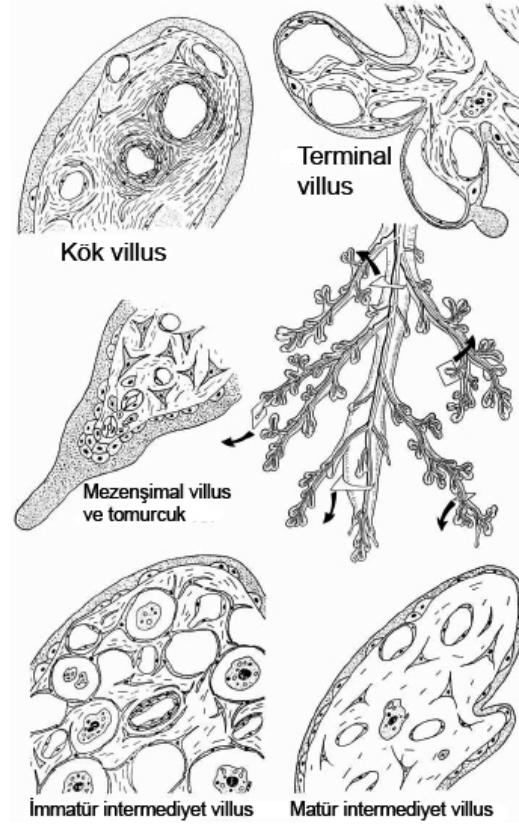
Plasentada intervillöz bir dolaşımın olduğu varsayılırsa, fetal ve maternal kanın birbirlerine yakın temasa geçmeleri, intravillöz (fetal) dolaşım başlar başlamaz gerçekleşir. Her iki kan, birbirlerinden daima plasental bariyerle birbirinden ayrılır. Plasental bariyer; 1) villus yüzeyini kesintisiz bir şekilde örten sinsisyotrofoblast tabakası, 2) 1. trimesterde kesintisiz, ikinci ve üçüncü trimesterde kesintili bir sitotrofoblast (Langhans' Hücreleri) tabakası, 3) trofoblastik bazal lamina, 4) bağ dokusu, 5) endotelial bazal lamina ve 6) fetal endotel tabakalarından oluşur.

Gelişimin devamı boyunca tersiyer villuslar, karmaşık farklılaşma işlemlerinden geçerek, birbirlerinden yapısal ve fonksiyonel olarak farklılıklar gösteren çeşitli villus tiplerini oluştururlar.

2.2. Villus Ağacının Yapısı

Plasental gelişim süresince, aynı temel yapıya sahip, farklı fonksiyonlar gören farklı tip villuslar oluşur (Şekil 2.2.1). Bunlar, villus etrafındaki maternal kan ile villus özünü birbirinden ayıran bir epitel benzeri trofoblast tabakası ile örtülüdür. Diğer epitel türlerinden farklı olarak trofoblastlar birbirlerinden ayrı bireysel hücreler şeklinde değil, birbirlerinden kesin sınırlarla ayrılmayan kesintisiz, çok çekirdekli bir sinsisyotrofoblast tabakasını içerir. Sinsisyotrofoblast tabakasının altında Langhan'ın hücreleri adını alan ve sinsisyumun kök hücreleri olan, onların büyümesi ve yenilenmesini destekleyen sitotrofoblast hücreleri vardır. Trofoblastik bazal lamina, trofoblastları villusun özünden (iç kısmından, stromasından) ayırır. Stroma çeşitli sayıda ve tipte bağ dokusu hücreleri, bağ dokusu lifleri, ara madde ve farklı ebatlardaki fetal damarları içerir. Büyük kök villuslarda bu damarlar genellikle arter ve venler şeklinde iken, yan dallarda genellikle kapillerler ve sinüzoidler şeklindedir.

Villus ağacının dalları; boyutları, stromal yapıları, içerdikleri damar yapısı ve yerleşimlerine bakılarak farklı segmentlere ayrılır. Beş farklı villus tipi tanımlanmıştır (13-15). Her villus tek bir öncüden, erken plasental gelişimin tersiyer villusuna karşılık gelen mezenşimal villustan köken alır.



Şekil 2.2.1. Olgun plasental ağacın uç kısımları ve çeşitli villus tiplerinin enine kesit çizimi (10).

2.2.1. Kök villus (Stem villus, KV)

Oldukça yoğun fibröz bir stroma, ışık mikroskopu altında ayırt edilebilir bir medya tabakasına sahip arter, ven, arteriyol veya venüller ile karakterizedir. Kök villuslar; a) ana kök (truncus chorii), b) trunkustan çıkan kalın, dört nesil dal (rami chorii), c) sayıları 2 ile 30 arasında değişen ve birbirine eşit olmayan çatallaşan (dikotomik) dallanmalar (ramuli chorii) d) kök villusların özel bir tipi olan demirleyici villus. Demirleyici villuslar, hücre kolonlarıyla bazal plağa tutunurlar.

2.2.2. Matür intermediyet villus (MİV)

Bunlar uzun, ince, uç (periferal) dallanmalardır. Bunların damarları ışık mikroskopuyla ayırt edilebilen medya tabakasından yoksundur. Gebeliğin son trimesterinde mezenşimal villuslardan oluşan MİV'ler terminal villusları oluştururlar. Dolayısıyla mezenşimal ve tamamen gelişmiş villuslar arasında bir geçiş formudur.

2.2.3. Terminal villus (TV)

Matür intermediyet villusların yaptığı, üzüm benzeri, son dallanmalardır. Yüksek derecede kapillerizasyon ve oldukça genişlemiş (dilate) sinüzoidlerle karakterizedir. Fetomaternal alışverişin ana kısmını oluştururlar.

2.2.4. İmmatür intermediyet villus (İMİV)

Kök villusların periferik, immatür, yumru şeklindeki devamıdır. İmmatür plasentalarda baskın villus tipidir. İMİV'ler ilk iki trimester boyunca mezenşimal villusların matürasyonu ile oluşurlar. Daha sonra kök villuslara dönüşürler. Dolayısıyla İMİV'ler de MİV'ler gibi, mezenşimal ve tamamen gelişmiş villuslar arasında bir formdur. İMİV'lerin kök villuslardaki gibi oldukça kalın bir trofoblastik kabuğu vardır. En karakteristik özellikleri ağsı (retiküler) yapıdaki stromalarıdır. Sabit stromal hücrelerinin büyük yelkenvari uzantılarıyla sınırlandırılan çok sayıdaki stromal kanallardan oluşur. Hofbauer hücreleri bu kanallar içinde yerleşiktir. Fötal damarlar ve kollajen lif demetleri bu stromal kanalların aralarında yer alırlar.

2.2.5. Mezenşimal villus (MV)

Bunlar en primitif villuslardır ve genellikle birinci nesil tersiyer villuslar olarak kabul edilirler. Gebeliğin ilk dönemlerinde baskın tiptir. Bu dönemde, mezenşimal villuslar, İMİV'lerin öncüleridir. Gebeliğin daha sonraki dönemlerinde KV ve İMİV'lerin uçlarında, oldukça küçük, ince, göze çarpmayan yapılar şeklinde izlenirler. Aynı zamanda villöz çoğalma ve dallanma bölgesi olarak rol oynar. Bunlar primitif stroma özünü sahiptirler. Stroma gevşek olarak yerleşen kollajen liflerden oluşur ve bazı mezenşimal hücreleri ile Hofbauer hücrelerini çevreler. Fötal kapillerler gelişmemiştir ve dilate sinüzoidler görülmez. Kalın trofoblastik tabakanın altında primitif kapillerlerin farklı gelişimsel evreleri izlenir.

2.3. Villöz Stroma

Villöz stromanın temel yapısını bir ağ oluşturan sabit bağ dokusu hücreleri oluşturur. Bunlar, bağ dokusu liflerini, serbest bağ dokusu hücrelerini (Hofbauer hücreleri) ve fötal damarları çevrelerler. Plasentanın yaşına ve villusun tipine göre farklı tiplerde stromal hücreler tanımlanmıştır (9, 13, 16-18).

2.3.1. Mezenşimal Hücreler

Farklılaşmamış stromal hücrelerdir. 2. ayın sonuna kadar en baskın hücrelerdir (17). Gebeliğin daha ileriki devrelerinde sadece yeni oluşan mezenşimal villuslarda görülür. Bu hücreler genellikle küçük (10-20µm uzunluğunda ve 3-4 µm eninde), az sitoplazmalı, mekik şekilli hücrelerdir. Bunlar birbirlerine az sayıdaki ince uzantılarla tutunur. Uzantıları yelken şeklinde değil de, daha çok yapraksı (filiform) şekilde olduğu için stromal kanallar oluşturmazlar. Büyük oval çekirdekleri genelde merkezden

kaymıştır. Bu hücreler diğer bütün stroma tiplerinin öncüsü olan mezenşimal stromayı oluştururlar.

2.3.2. Retikulum Hücreleri

İkinci ayın sonunda, stromal yapı ve hücrel kompozisyonunda büyük değişiklikler gözlenir (18). Birkaç gün içerisinde, bundan sonra gebeliğin sonuna kadar immatür intermediyet villusların ana stromal hücresi olan sayısız, küçük retikulum hücreleri oluşur. Bu hücreler uzamış şekilli, büyük gövdeleri (20-30µm uzunluğunda) vardır. Hücre gövdelerinden çok sayıda, uzun, ince ve dallanan uzantı çıkar. Kesitlerde bu uzantıların komşu hücrelerin uzantıları ile temaslar kurarak, ağlar oluşturdukları görülür (Şekil 2.5.2.2). Üç boyutlu preparasyonlarda, bu yelken şeklindeki uzantıların ekstrasellüler kompartmanı 20-50µm çapındaki çemberlere ayırdığı görülür (Şekil 2.5.2.2). Bu stromal kanallar, villus eksenine paralel yerleşir. Fötal damarlar, bağ dokusu lifleri bu stromal kanalların arasına yerleşirler. Komşu kanallar arası pencereler, plasental makrofajlara (Hofbauer hücreleri) belli düzeyde hareketlilik sağlar. İmmatür intermediyet villuslarda küçük retikulum hücreleri bağ dokusunun sabit hücrelerinin çoğunu oluşturur. Matür intermediyet villuslarda daha büyük retikulum hücreleri bulunabilir.

2.3.3. Fibroblast Hücreleri

Fibröz stromanın sabit bağ dokusu hücreleri hem mezenşimal hücrelerden hem de retikulum hücrelerinden farklıdır. Fibroblastlar daha çok kök villuslarda ve daha az olmak kaydıyla immatür intermediyet villuslarda büyük damarları çevreler şekilde bulunurlar. Bu hücreler geniş sitoplazmalı, 30-50µm uzunluğunda ve 5-8µm enindedir. Retikulum hücrelerinin aksine, bunların az sayıda, kısa, dallanan, yapraksı (filiform) veya kalın uzantıları vardır.

2.3.4. Miyofibroblast Hücreleri

Feller ve ark. (19), villusların elektron mikroskopik olarak ve immünohistokimyasal olarak tipik miyofibroblast özelliğinde hücreler içerdiğini öne sürse de, diğer araştırmacılar benzer bulgulara sahip değildir. Elektron mikroskopik olarak, tipik miyofibroblast karakterindeki hücreler sadece kök villuslarda bulunmaktadır (20, 21). Damar düz kas hücrelerinden farklı olarak miyofibroblast hücreleri villusun uzun eksenine paraleldir.

2.3.5. Mast Hücreleri

Bu hücreler, daha çok kök villuslardaki büyük fötal damarların duvarlarında bulunurlar (22) (Şekil 2.5.2.1.c).

2.3.6. Plazma Hücreleri

Bu hücreler, plasental yapıda çok ender gözlenen bir hücre tipidir. Gelişmemiş plasentaların kök villuslarının stromalarında gözlenirler (23).

2.3.7. Hofbauer Hücreleri

Villus stromasında bulunan diğer bir hücre tipi de plasental makrofajlar olan Hofbauer hücreleridir. Bu araştırmanın konusunu oluşturan hücre tipidir. Bu hücreler kısaca, yuvarlak, uzamış veya ovoid şekilli olabilirler. Çekirdekleri eksentrik yerleşmiş ve 10-40µm çapındadırlar. Gebeliğin erken dönemlerinde sitoplazmaları bol vakuollüyen, gebelik ilerledikçe vakuol sayısı ve boyutları azalır, intrasitoplazmik granüller daha belirgin hale gelir (16). Bu hücrelerin doğası önceleri çok tartışılırken, şimdilerde sadece doku makrofajları olduklarına inanılmaktadır. Makrofajların morfolojik, histokimyasal ve fonksiyonel karakteristiklerine sahip olmalarının yanında (24), bu hücrelerdeki gibi IgG (immünglobulin G) yüzey reseptörleri ve sınıf II MHC (Major doku uyumluluk kompleksi-Major histocompatibility complex) moleküllerini de eksprese ederler (25).

Hofbauer hücreleri plasental gelişimin en erken devreleri ve gebelik boyunca villuslarda bulunurlar (26). Gebelik ilerledikçe villöz stromanın daha yoğun kıvama gelmesiyle birlikte bu hücrelerin görünmesi maskelenir ve sadece stromal boşluklarda ödem varsa görünür hale gelirler. Bu hücrelerin villuslar damarlanmadan önce ortaya çıkmaları, gebeliğin erken dönemlerinde bu hücrelerin mezenşimal hücrelerden farklılaştığı izlenimini vermektedir. Gebeliğin daha sonraki evrelerinde ise bu Hofbauer hücre popülasyonu fetal kemik iliği kökenli hücrelerle destekleniyor olabilir (27, 28). Hofbauer hücreleri bu nedenle heterojen bir hücre topluluğu olabilir. Nitekim bu hücrelerin mitotik aktivite göstermeleri (27), bu hücre topluluğunun bir alt sınıfının, bağımsız ve kendini yenileyebilir olduklarına işaret eder.

Hofbauer hücreleri hem immün hem de immün olmayan fagositoz yapabilir, plasental dokulara geçen maternal antijenleri yakalayabilirler ve plasenta içindeki birçok sitokin, prostaglandin ve tromboksan için önemli bir kaynaktır (29, 30). Diğer ve çoğu halen hipotetik olan görevleri arasında; plasental su dengesinin sağlanması, transport mekanizmalarına katılım, muhtemel endokrin fonksiyon ve vaskülogenezin kontrolünde rol almaları bulunmaktadır.

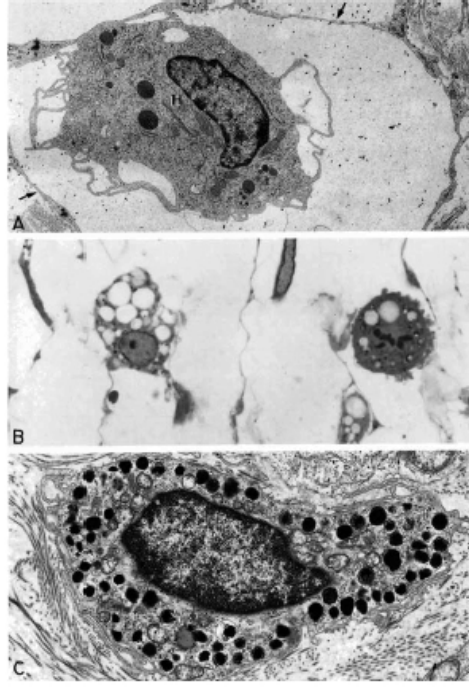
2.4. Hofbauer Hücreleri

2.4.1. Tarihçe

Hofbauer hücreleri, plasentanın f3tal makrofajları olarak kabul g3rmüştür. Birçok araştırmacı, insan plasental villus stromasında büyük hücrelerinin varlığını bildirmişlerdir. Hücrelerin adıyla özdeşleşen Hofbauer, bu hücrelerin normal villuslardaki detaylı tarifini yapmıştır (31, 32). Bu hücreler günümüzde de Hofbauer hücreleri olarak adlandırılmaktadır.

2.4.2. Morfoloji

Erken ve daha sonraki birçok çalışmada Hofbauer hücreleri yuvarlak, uzamış veya oval şekilli hücreler olarak tanımlanmıştır (31, 33). Bu hücrelerin boyutları, uzantılarının boyutlarına bağlıdır. Hücrelerin çapı 10-40µm arasındadır. Genelde eksentrik yerleşimli olan çekirdeği oval, yuvarlak veya böbrek şekillidir. Çift çekirdekli hücelere az rastlanır. İyi gelişmiş çekirdek membranı vardır fakat nüklear kromatin belirgin değildir. Hofbauer hücreleri ile yapılan ilk çalışmalarda bu hücrelerin en önemli özelliklerinin sitoplazmalarındaki yoğun vakuoller ve granüller olduğu belirlenmiştir (31, 34). Bu yüzden bu hücreler aynı zamanda “köpüksü = foamy” hücreler olarak ta bilinirler. Işık mikroskopu ve elektron mikroskopu ile yapılan daha yeni çalışmalarda, bu hücrelerin membrana bağlı, çeşitli boyutlarda elektron geçirgen sayısız vakuoller, yoğun granüller (muhtemelen lizozomlar), kısa endoplazmik retikulumlarla karakterize olduğu görülmüştür (Şekil 2.4.2.1. ve 2.4.2.2.a, c) (1, 35, 36). Enders ve King (1970) yaptıkları çalışmada, bu hücrelerin gebeliğin ilk yarısında oldukça büyük, sayısız intrasitoplazmik vakuoller içerdiklerini göstermişlerdir (Şekil 2.4.2.1.a, b ve 2.4.2.2.a) (36). Gebelik ilerledikçe vakuol sayıları ve boyutları azalır ve Hofbauer hücrelerinde muhtemelen lizozomlar olan intrasitoplazmik granüllerin sayısı artar (Şekil 2.4.2.2.c).

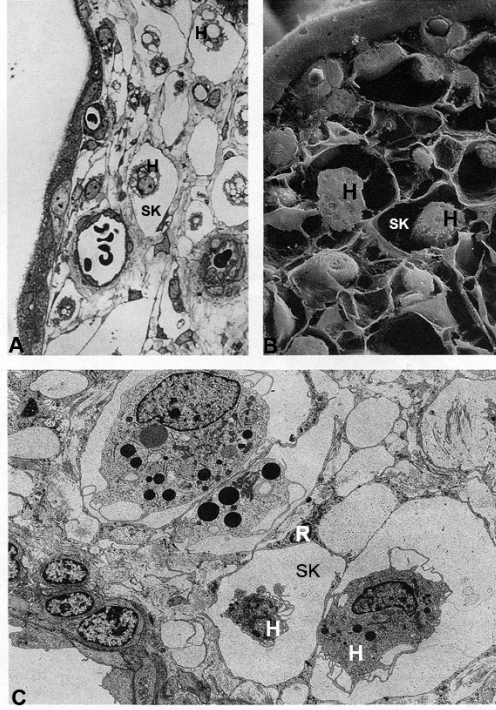


Şekil 2.4.2.1. Hofbauer hücresi ve mast hücresinin karşılaştırması. A) Retikulum hücrelerinin yelkenvari sitoplazmik uzantılarıyla (oklar) oluşturduğu stromal kanal içine yerleşik bir Hofbauer hücresinin (H) elektronmikrografı (x5300). Bu stromal kanalların içinde bir miktar sıvı bulunmasına rağmen, bağ dokusu lifleri bulunmaz. B) 12. hafta immatür intermediyet villusun iki Hofbauer hücresi gösteren yarı-ince kesidi. Soldaki erken dönemde sıklıkla gözlenen bol vakuollü Hofbauer hücresi tipi. Sağdaki, daha yuvarlak, az vakuollü ve hücre yüzeyinde baloncuk benzeri çıkıntıları olan bir Hofbauer hücresi. Bu hücre aynı zamanda mitoz geçirmekte (x1000). C) Özellikle kök villusların büyük damarlarına yakın yerleşen ve özel salgısal granülleriyle tanınan bir mast hücresi elektronmikrografı (x16000) (37).

Bu granüle tipteki Hofbauer hücresi, daha nadir bulunan Mast hücresinden kolaylıkla ayırt edilebilir (Şekil 2.4.2.1.c). Buna rağmen az sayıda veya hiç vakuol içermeyen Hofbauer hücreleri de gebeliğin erken dönemlerinde görülebilir ki bu hücreler immatür Hofbauer hücreleri olarak kabul edilir (27, 38). Bu bulgu, vakuollü Hofbauer hücrelerinin morfolojik olarak belirgin olduğunu ve tamamen farklılaşmış çok daha büyük mononükleer fagosit popülasyonunun bir üyesi olduğunu varsayan immünolojik araştırmalarla uyumludur (25, 39).

Fusiform şekilli Hofbauer hücrelerine de rastlanır. Bunları fibroblastlardan ayırt etmek oldukça güçtür. Bunları fibroblastlardan ayırt etmenin en kolay yolu köpüksü sitoplazmayı ayırt etmektir. Hofbauer hücreleri küçük büyütmede plazma hücreleri ile de karıştırılabilirler. Genel olarak Hofbauer hücreleri boyalara karşı düşük ilgi (afinite) gösterirler çünkü sitoplazmalarında glikojen yoktur ve glikoproteinler ile ribonükleoproteinler azdır.

Hofbauer hücrelerinin intrasitoplazmik vakuolleri, yüzey özellikleri ve villus özünün diğer komponentleri ile ilişkisinin ilk üç-boyutlu görüntülenmesi, dondurup-kırma metodunu tarayıcı elektron mikroskopu ile kombine eden bir yöntem sayesinde mümkün olmuştur (16, 18). Hofbauer hücrelerinin yüzey morfolojisi, küresel veya uzamış kabarcıklar veya mikropikalar ile karakterizedir (Şekil 2.4.2.2.b). Bu özellikler düzensiz bir şekilde dağılmışlardır. Diğer Hofbauer hücreleri iyi gelişmiş, düzgün yüzeyli, büyük lamellipodlarla karakterize girintili-çıkıntılı bir yüzeye sahiptirler. Bu hücrelerin yer yer üst üste binerek huni benzeri yapılar oluşturdukları gözlenmiştir. Bazen de hem lamellipod (lamelli-ayakçık) hem de kabarcıkların her ikisini de içeren Hofbauer hücreleri gözlenmiştir (16, 18, 40). Bunlara ek olarak, gebeliğin ilk yarısına ait koryonik villus stromasına ait tarayıcı elektron mikroskopu incelemelerinde, Hofbauer hücrelerinin büyük çoğunluğunun sabit stromal hücrelerinin yelken benzeri çıkıntılarının oluşturdukları kollajen içermeyen stromal kanallarda yerleşik olduğunu göstermiştir (Şekil 2.4.2.2.b) (14, 16, 40). Bu kanallar özellikle koryonik villus özünün merkezinde iyi gelişmiş ve çoğunlukla da villusun ana eksenine paralel yerleşmişlerdir. Bu stromal kanallarda yerleşik Hofbauer hücrelerinin bazılarının uzamış bir şekle sahip oldukları ve kanallar arası uzanabildikleri görülmüştür (16, 40). Hofbauer hücrelerinin morfolojik özellikleri, bu hücrelerin villus özünde hareket edebildiklerini öne sürmektedir. Stromal kanallar gebeliğin ilk yarısında koryonik villuslarda bolca bulunur (Şekil 2.4.2.1.a, b ve 2.4.2.2.a, b) ve sayıları terime doğru azalır.



Şekil 2.4.2.2. İmmatür intermediyet villusun (İMİV) tipik yapısı. A) Tipik retiküler stromasıyla 22 haftalık bir İMİV yarı-ince kesidi. Yuvarlak, vakuollü Hofbauer hücreleri, bağ dokusu lifi içermediğinden boşluklar şeklinde gözlenen stromal kanallara yerleşirler (x520). B) Dondurma-kırma yöntemi ile oluşturulmuş bir İMİV kesidinin taramlı elektron mikrografi (x1050). C) Terme ait İMİV retiküler stromasının elektronmikrografi. Hofbauer hücrelerinin (H), retiküler hücrelerin (R) oluşturduğu stromal kanallarda (SK) yerleştiği görülmektedir (x2700)(37).

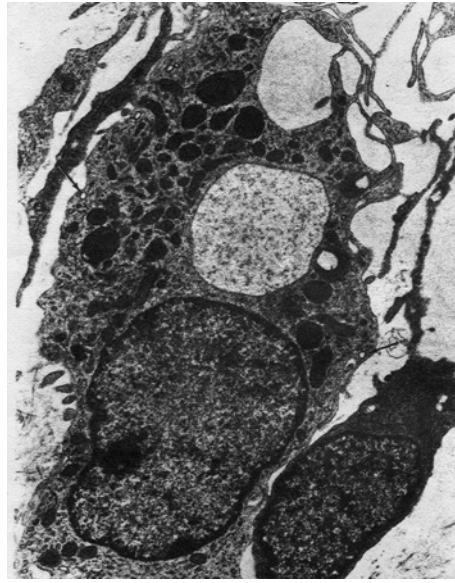
Hofbauer hücrelerinin bazal plakta dahi bulunması, bu hücrelere farklı bir rol biçmiştir: diyabetik rhesus uyuşmazlığı (26).

2.4.2.1. Hofbauer Hücrelerinin İnce Yapı Özellikleri

Hofbauer hücrelerinin uygun ince-yapı tasviri, geçirimli elektron mikroskobunda (TEM) villus stromasında mezenşimal elemanlar ile kıyaslanmasıyla olur. Tipik Hofbauer hücresi düzensiz sitoplazmik hatları ve vakuolleşme ile kolaylıkla tanınabilir (Şekil 2.4.2.3). Bu hücreler büyük vakuoller, kaplı pinositotik veziküller ve endoplazmik retikulumdan türevlendiği belli olan düz veziküller, lizozomlar ve koyu renkli granüller içerirler. Yoğun bir membrana sahip mikropinositik vezikülleri hem Hofbauer hücresinin gövdesinde hem de uzantılarında yüzey boyunca görmek mümkündür. Hofbauer hücresinin iyi gelişmiş kompakt bir Golgi cisimciği bulunur. Bu cisimcik küçük gruptaki sisternalar ile karakterize olup çekirdeğin sadece bir tarafında yerleşiktir. Hofbauer hücrelerinin mitokondriyonları çubuk şekillidir. Bunların kristalları sıkıca paketlenmemiştir. Endoplazmik retikulum hem granüllü hem de granülsüz kısımlar içerir. Ribozomlar membran boyunca eşit olmayan aralıklarla yerleşirler ve

sisternalar geniş değildir. Düz endoplazmik retikulum kısa tübüler yapılar olarak izlenir ve granüllü endoplazmik retikulumun kısa segmentleriyle birleşir.

Hofbauer hücrelerindeki lipid damlacıklarının, farklı yoğunluktaki granüller ve diğer inklüzyonların sayıları oldukça değişiklik gösterdiğinden tipik bir yapıdan söz etmek mümkün değildir. Bu hücrelerin içinde görülen çeşitli inklüzyonlardan sayıca en çok farklılık gösteren büyük granüllü inklüzyonlardır. Her ne kadar Hofbauer hücreleri asit fosfataz aktivitesi gösterebilirler de, asit fosfataz pozitif granülleri hakkında herhangi bir ultrastrüktürel çalışma yapılmamıştır. Bu nedenden dolayı bu yoğun granüllerden hangilerinin lizozomlar olabileceğini ayırt etmek güçtür.

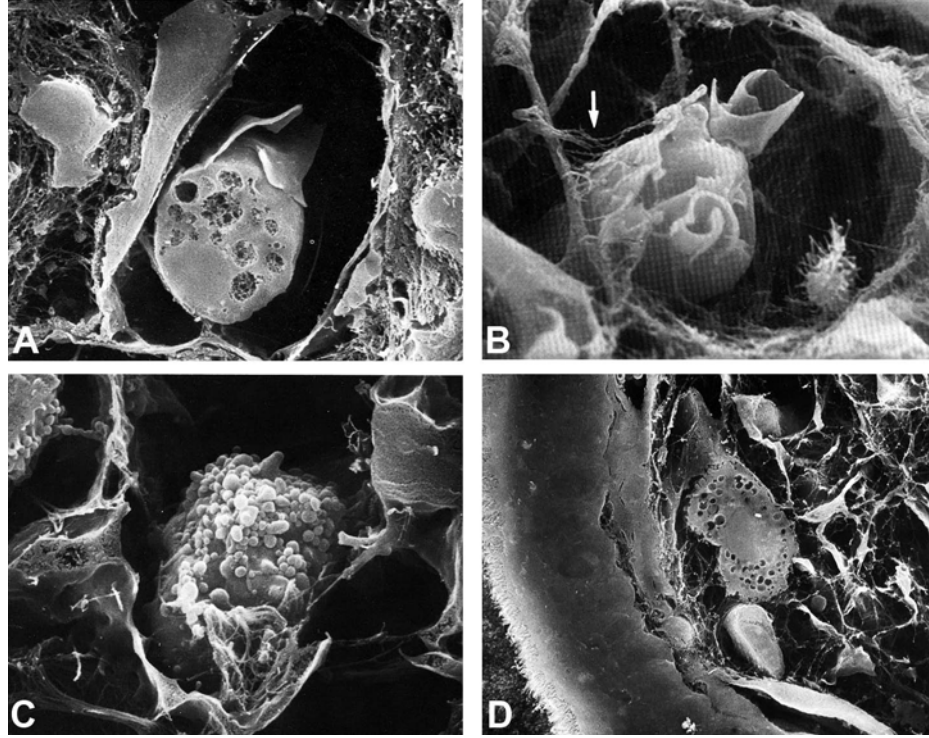


Şekil 2.4.2.3. Hofbauer hücresinin geçirimli elektron mikroskobu. Eksentrik çekirdeği, koyu granülleri, lipid damlacıkları, mikropinositik vezikülleri (oklar) ile tipik bir Hofbauer hücresi görülmektedir (36).

Hofbauer hücrelerinin belirgin özelliklerinin bir diğeri de çeşitli tipte sitoplazmik uzantılarının olmasıdır. Castellucci (1980), Hofbauer hücre yüzeylerini, dondurup-kırma yöntemi ile tarayıcı elektron mikroskobunda (SEM) incelemiş ve bu hücreleri yüzey morfolojilerine dayanarak sınıflandırmıştır (16):

- 1) Gebeliğin 8-17. haftalarında görülen ve dalgalı (ondulalı) lamellipodlar içeren Tip 1 (Şekil 2.4.2.4.a),
- 2) Gebeliğin 8-17. haftalarında görülen ve hem lamellipod hem de daha küçük yuvarlak çıkıntılar (kabarcık) içeren Tip 2 (Şekil 2.4.2.4.b),
- 3) Tüm gebelik boyunca izlenen, eliptik-uzamış kabarcıklar ve bazen uzun mikrovilluslar içeren Tip 3 (Şekil 2.4.2.4.c),

4) Tüm gebelik boyunca izlenen, az gelişmiş lamellipod (mikroplika benzeri) ve birkaç küçük kabarcık içeren Tip 4 (Şekil 2.4.2.4.d) olmak üzere 4 sınıfta incelemiştir.



Şekil 2.4.2.4. Hofbauer hücreleri tipleri (16). Dondurma-Kırma yöntemi ve ardından SEM ile incelenmiş A) Tip 1, B) Tip 2, C) Tip 3 ve D) Tip 4 Hofbauer hücreleri görülmektedir (16).

2.4.3. Hofbauer Hücrelerinin Dağılımları

Hofbauer hücreleri plasental villuslarda ilk kez 18. pc. günde görülürler (1). İmmatür plasentaların villuslarında da her zaman bulunurlar. Normal plasentalarda Hofbauer hücrelerinin gebeliğin 4. veya 5. aylarından sonra sayıca çok azaldıkları veya ortadan kayboldukları öne sürülse de, bu hücrelerin termde de varlığını korudukları bir gerçek olup (Şekil 2.4.2.2.c), gebelik ilerledikçe sayılarındaki azalma, plasental olgunlaşma sırasında villöz stromanın yoğunlaşmasına bağlı olarak sıkışmaları ve maskelenmelerinden ileri gelir (26).

Vakuollü tip Hofbauer hücrelerinin erken dönemde ve daha granüler tipin daha sonraki dönemlerde baskın olan tip olmalarına rağmen ara formlara gebeliğin her döneminde rastlanabilir. Bazı Hofbauer hücrelerinin çok az vakuölü bulunabilir. Hatta 1. trimesterin sonunda bazı Hofbauer hücreleri birçok inklüzyon ve küçük vakuollü yapıya sahip olabilir. Yine de bu özellikteki Hofbauer hücreleri daha çok 5. aydan sonra görülür. Normal term plasentalarında vakuollerin sayısı ve yüzey çıkıntıları azalır. Hatta

erken plasentalarda oldukça belirgin olan ekstrasellüler kompartmanların geç dönem plasentalarında bulunmaması Hofbauer hücrelerinin bu döneme ait plasental kesitlerde ışık mikroskopu ile görülmesini zorlaştırır.

Özellikle stromanın daha gevşek olduğu patolojik durumlarda (örneğin; maternal diabette ve kan uyumsuzluğunda görülen ve villöz olgunlaşmanın bozulduğu prematür plasentalarda) term plasentasında sayısız Hofbauer hücrelerinin varlığı kolaylıkla ayırt edilebilir (26). Hofbauer hücreleri aynı zamanda insan amniyonu ve koryonunda da tanımlanmıştır (1).

2.4.4. Hofbauer Hücrelerinin Kökeni

İlk tarif edildiğinden bu yana Hofbauer hücrelerinin kökeninin ne olduğu konusu tartışmaya konu olmuştur. Chaletzky (1981) tarafından öne sürülen ve Hofbauer hücrelerinin maternal desidua kökenli olduğu gibi birçok teori geçersiz kılınmıştır (41).

Bu hücrelerin kökenini belirlemeye yönelik en önemli bulgulardan biri Wynn (1967)'in yaptığı seks kromatin boyamasından elde ettiği Hofbauer hücrelerinin fötal orijinli olduğu bulgusudur (42). Araştırmacıların çoğu artık Hofbauer hücrelerinin koryonik mezenşimal kökenli olduğuna ve bu hücrelerin villus özünün sabit stromal hücrelerinden farklılaştığına inanmaktadırlar (17, 26, 43, 44). Morfolojik araştırmacılar bu kavramı sorgulamıştır çünkü her iki hücre tipi arasında bir geçiş formu gözlemlenmemiştir (9, 18). Yine de Hofbauer hücreleri üzerinde yapılan gözlemler (8) ve çeşitli organların makrofajları ve makrofaj öncüleri ile ilgili elde edilen verilere (45-47) dayanarak Hofbauer hücrelerinin plasentanın gelişiminin erken evrelerinde, henüz fötal dolaşım oluşmadan mezenşimal hücrelerden köken aldığı savı göz ardı edilemez (Şekil 2.5.1.1.a, b). Daha sonra, fötal dolaşım başlar başlamaz, Hofbauer hücreleri, diğer organlardaki makrofajlar gibi fötal kemik iliği kökenli monositlerden köken alabilir (27, 48). Hatta Moskalewski (1975), Hofbauer hücreleri ve monositler arası geçiş formları gözlemlemiştir (49). Bu hipotez ile ilgili olarak akılda bulundurulması gereken şey, gebeliğin sonunda, insan kordon kanının yetişkin kanındakinin üç katı daha fazla monosit içerdiğidir (50). Bu monosit alt-popülasyonları belirgin fonksiyonel heterojenite gösterirler (50). Maternal arteriyel kanın intervillöz aralığa ulaşması 1. trimesterin sonunda (10-12 haftalar arası) olduğundan dolayı, maternal monositlerin plasenta villus özüne geçip bu hücrelere farklılaşmaları mümkün değildir (51).

Hofbauer hücrelerinin gebelik boyunca farklı yerlerden köken alabilecekleri öne sürülmüştür ve bu nedenle heterojen bir hücre topluluğu oluştururlar (27). Bu veriler Hofbauer hücrelerinin mitotik bölünme gösterebildiklerini söyleyen in vivo (Şekil 2.4.2.1.b) ve in vitro gözlemlerle uyumludur (27, 39). Hofbauer hücrelerinin mitozu (Şekil 2.4.2.1.b) bu hücrelerin farklı kökenli ve fonksiyonlu alt topluluklarının (subpopülasyonların) sürekli varlığının sağlanması için önemlidir. Bunlara ek olarak mitotik aktivite aynı zamanda bu hücrelerin kısmen bağımsız, kendini yenileyen (replike

olabilen) ve lokal çevre tarafından gerekli olduğunda sayılarını hızlıca arttırabildiklerine işaret etmektedir (27).

2.4.5. Hofbauer Hücrelerinin Görevleri

Villöz stromanın olgunlaşması ve yeniden şekillenmesi (modellenmesi) esnasında farklı Hofbauer hücre tiplerinin gözlemlendiği bildirilmiştir (24). Hofbauer hücreleri fagositoz yetenekleri ve mikropinositoz aktiviteleri ile tipik makrofaj karakterlerini sergilerler.

Hofbauer hücrelerine, stromal sıvı dengesinin düzenlenmesi, immün komplekslerin emilimi, antijen sunma gibi birçok görev yüklenmiştir (24, 35). Bu hücreler plasental su içeriğini, iyonların taşınmasını ve interstisyel iyonların akışını düzenlerler (35). Hofbauer hücrelerinin intrasitoplazmik vakuolleri ve büyük lamellipodlarının villus stromasında bulunan fetal serum proteinlerinin azaltılmasında ve erken plasantanın su dengesinin kurulmasında görev aldıkları düşünülmüştür. Hofbauer hücrelerinin bu görevinin, plasantanın interstisyel alandaki proteinleri kan damar sistemine geri döndürecek bir lenfatik sistemi olmamasından kaynaklanabilir (36). Hofbauer hücrelerinin koryonik villus özlerinde kolaylıkla gezabilmeleri stromal kanalların varlığı aracılığıyla sağlanır ve lenfatik sisteme bir alternatif olarak görev yaparlar (14, 36). Ayrıca, Hofbauer hücrelerinin stromal kanallardaki hareketi, bu makrofajların: 1) Konağın savunulmasındaki rollerini (16, 25), 2) Diğer mezenşimal hücrelerin çoğalmasının teşviki veya baskılanması ile villus özünün yeniden şekillendirilmesindeki rollerini (9, 16, 18) göstermelerine yardımcı olur. Hofbauer hücrelerinin hareket kabiliyetlerinin son trimesterde kısmen engellendiği de bilinmelidir. Bu dönemde stromal kanallar ya yoktur ya da çok dardırlar. Bu nedenle Hofbauer hücrelerinin bu villuslarda farklı ek rollerinin olabileceği düşünülmüştür (18).

Birçok yazar Hofbauer hücrelerinin endokrin rolleri olabileceği yönünde tahminlerde bulunmuştur. Prosdocimi (1953) bu hücrelerin hCG sentezlediğini öne sürmüş ve immunohistokimyasal olarak bu hücrelerde hCG varlığı daha sonra gösterilmiştir (52, 53). Bu glikoprotein bu hücrelerde sentezlenmesi çok olası olmadığından, çevreden fagositozla hücre içine alınmış olması muhtemeldir (39), diğer yandan makrofajlarda immunohistokimyasal olarak gösterilen proteinlere ait bulguların bu hücrelerin fagositoz aktivitesi göz önünde bulundurularak değerlendirilmesi gerekir (ör: hormonlar, plasental proteinler).

2.4.6. Hofbauer Hücrelerinin İmmünolojik Yönleri

İmmünolojik bulgular, Hofbauer hücrelerinin gebelik boyunca koryonik plakta ve villöz stromada bolca bulunduğunu göstermiştir (25, 54). Hofbauer hücreleri üzerine yapılan immunohistokimyasal araştırmalar, bu hücrelerin immünolojik rolleri hakkında daha fazla bilgi edinmemize neden olmuştur.

Hofbauer hücrelerinin IgG için Fc reseptörleri (FcR) içerdikleri gösterilmiştir (Uren ve Boyle 1985, Zaccheo 1982). Bu reseptörlerin maternal antifötal antijen-antikor komplekslerini bağlayarak koruyucu görevde bulundukları öne sürülmüştür (25, 54, 55). Hofbauer hücreleri, immün fagositoz yapma (25, 56-58) ve ekzojen antijen-antikor komplekslerini ortadan kaldırabilme kapasitesindedir (59).

Braunhunt (1984) Hofbauer hücrelerinde α -1 antikomotripsin varlığını gösterse de, term plasenta Hofbauer hücrelerinde lizozimin varlığını imünolojik yöntemlerle gösterememiştir (60). Zaccheo (1989) birinci trimester Hofbauer hücrelerinin in vitro ortamda lizozim salgılayabildiklerini göstermiştir (58). Bu farklılıkların kullanılan metodlardaki değişiklikten mi yoksa term ve birinci trimester Hofbauer hücrelerinin farklı fonksiyonlar görmelerinden mi olduğu bilinmemektedir.

Hofbauer hücrelerinin, TLR4 gibi Toll-benzeri reseptörleri (Toll-like Receptors-TLRs) içerdikleri gösterilmiştir (61). TLR'ler doğal bağışıklık yanıtları açısından önemlidirler. Son çalışmalar, doğal bağışıklık yanıtlarının, patojenlerden gelen çeşitli moleküler tehditleri tanıyarak proinflamatuvar sitokin gen transkripsiyonunu başlatan TLR'ler tarafından aktive edildiğini öne sürmektedir (62, 63). TLR4, lipopolisakkarid (LPS)-indüklü sinyal iletiminden sorumludur (64). İlginç olarak, Kumazaki ve ark. (2004) TLR4'ün term öncesi koryoamniyotit durumunda, villuslardaki Hofbauer hücrelerinde ekspresyonunun arttığını göstermiştir (61). Bu bulgu da, Hofbauer hücrelerinin doğal immün yanıtlarda ne kadar önemli olduklarına işaret etmektedir.

Hofbauer hücrelerinin MHC sınıf I ve II belirteçlerini eksprese ettikleri (57, 65-67), MHC sınıf II'nin en az 3 iyi belirlenmiş alt bölge (DR, DP ve DQ) içerdikleri bilinmektedir. Birinci trimester Hofbauer hücreleri çok nadiren DR ve DP-pozitifken, DQ antijenlerini eksprese etmezler (58, 65-68). DQ antijenlerinin 1. trimester hücrelerinde olmayışı, bu antijenlerin T hücre klonlarının sitotoksik hücrelere dönüşümü için bir sınırlandırma elemanı olmasıyla ilişkili olabilir (69).

MHC sınıf II antijenleri, ikinci trimesterin başlarından itibaren plasental makrofajlar tarafından kazanılmaya başlarlar (54, 66-68, 70). Term plasenta dokularında DR-pozitif villöz stromal makrofajlar birbirleriyle yakın ilişkideki koryonik villus gruplarında görünürler (65, 67). Öte yandan, DP, DQ antijenleri, bazal plağa en yakın villuslarda yerleşik az sayıdaki Hofbauer hücrelerinde gözlenir (67). Bunlara ek olarak, bu türdeki DP ve DQ antijenleri, DR antijeninin yokluğunda hiçbir plasental makrofajda bulunmazlar (67). Koryonik villuslardaki bu yama benzeri MHC sınıf II antijen ekspresyonu ve DP, DR ve DQ pozitif hücrelerin villus- desidua komşuluğundaki birikimi, bu alanların immün stimülasyonunun artırılmış olduğuna işaretir. Her ne kadar kesin bir bulgu olmasa da, Hofbauer hücrelerinin fötal lenfositlere antijen sunma kapasitesinde oldukları düşünülebilir. Bu olay, plasenta geçişli infeksiyonlarda fötal yanıt ile ilgili olabilir.

Goldstein (1988) ve Nakamura ile Ohta (1990), gebelik boyunca Hofbauer hücrelerinin CD4 antijenine özgü antikorlarla güçlü reaksiyon verdiklerini göstermişlerdir (54, 71). Bu antijen MHC sınıf II moleküllerinin polimorfik olmayan determinantlarıyla etkileştiği düşünülen bir hücre yüzey glikoproteinidir (72). Bu antijen lenfositlerin T-helper (yardımcı T hücreleri) alt sınıfında mevcuttur ve kan monositleri, bazı doku makrofajları ve dendritik hücreler tarafından zayıf şekilde eksprese edilir (73-75). Aynı zamanda insan immün-yetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency virus-HIV) için membran reseptörü olarak görev yapar. Lewis (1990), HIV-1 antijeni ve nükleik asidini, immünohistokimya ve in situ hibridizasyon yöntemleriyle sero-pozitif hastaların plasentalarında Hofbauer hücrelerinde göstermiştir (76). Bu nedenle Hofbauer hücreleri HIV-pozitif kadınların fetüslerinde HIV'nin giriş kapısı veya deposu (rezervuarı) olarak rol oynayabilirler. Nitekim Torres ve ark. (77) Hofbauer hücrelerinde HIV-1 ko-reseptörlerinin (CCR5 ve CXCR4) Hofbauer hücre yüzey membranında bulunduğunu göstermiştir.

Hofbauer hücrelerinin immünohistokimyasal belirteçlerinden biri anti-Leu-M3 antikorudur (58, 65). Bu antikoru, primer olarak monosit ve makrofajlarda eksprese olan ve 55kDa'luk bir glikoprotein olan CD14 monosit farklılaşma antijenini tanıdığı bildirilmiştir (78). CD14 antijeninin bir çeşit büyüme faktörü reseptörü olarak görev aldığı ve bu nedenden dolayı Hofbauer hücrelerinin plasental morfogeneze ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (9, 16, 18).

Flynn (1982, 1985) ve Glover (1987) plasental villöz makrofajlarının interleukin-1 (IL-1) ürettiklerini göstermiştir (79-81). Antijen sunma olayı sınıf II antijen ekspresyonu ve IL-1 sekresyonu ile ilişkili olduğundan, fetal plasental makrofajların neredeyse bir yetişkin hücre gibi antijen sunma fonksiyonu olabileceği öne sürülmüştür (81). Hatta antijen sunma olayının dokuya özel farklı faktörler tarafından düzenlendiği düşünülmüştür. Yagel (1987) progesteronun fizyolojik konsantrasyonlarının fetal plasental makrofajlardan bir immünosupresan olduğu bilinen prostaglandin E2 salınımını arttırdığını göstermiştir (82). Bu bulgu fetal plasental makrofajların fetomaternal yüzeyde immün-baskılayıcı bir rol oynadıklarına işaret eder. İzole edilmiş Hofbauer hücreleri in vitroda hem hücre-aracılı lenfolizi hem de lenfosit reaksiyonunu inhibe etmiştir (83). Bu nedenle Hofbauer hücreleri fetüse karşı gelişebilecek T hücre yanıtını bastırmada çok önemli fonksiyona sahiptir.

2.5. Vaskülogenez ve Anjiyogenez

Plasental villus gelişiminin belirleyici basamaklarının anlaşılması için, damar oluşumunun öneminden dolayı, vaskülogenez ve anjiyogenezin genel özelliklerinin bilinmesi şarttır. Genel olarak söylemek gerekirse, damarlar birbirinden farklı şekilde işleyen ve kontrol edilen farklı iki yolla oluşur: Vaskülogenez ve Anjiyogenez. Kan damarlarının gelişimi, çeşitli mekanizmalar yoluyla gerçekleşebilir.

2.5.1. Vaskülogenez

Vaskülogenez, primitif kan damarlarının mezoderm kökenli öncül (prekürsör) hücrelerden ilk kez oluşturulmasıdır. Vaskülogenez terimi; hemanjiyoblastların damarların oluşacağı bölgeye göç etmeleri, kordonlar oluşturup endotelial hücrelere farklılaşmalarını ve dolayısıyla damarların ilk kez (de novo), sıfırdan oluşturulmalarını ifade etmektedir (84).

2.5.2. Anjiyogenez

Yetişkin vaskülatürü, embriyoda anjiyoblastlar olarak adlandırılan endotelial hücre prekürsörlerinden damarların ilk kez, sıfırdan oluşturulduğu vaskülogenez işlemi ile oluşturulur. Vaskülogenez ile oluşturulan endotelial hücre ağı, daha sonra anjiyogenez tarafından bir kalıp (şablon) olarak kullanılır (85) ve vasküler ağ genişletilir.

Oluşturulduktan sonra primer kapiller ağı, anjiyogenez yoluyla, mevcut damarlardan yeni damarların tomurcuklanması ve dallanması ile yeniden modellenir (85). Normal fizyolojik anjiyogenez, fetal-plasental gelişim ve büyüme sırasında gözlenmekle beraber (86), yetişkinde dişi üreme yollarındaki siklik olaylar haricinde nadiren gözlenir (87).

Anjiyogenez, dişilerin üreme yaşamı boyunca menstrual siklus süresince korpus luteum ve endometriyumda gözlenen hızlı büyüme ve gerilemenin bir parçası olarak düzenli bir şekilde gözlenirken (88-90), patolojik anjiyogenez, malignansiler, kronik inflamatuvar bozukluklar (romatoid artirit), yaşa bağlı maküler dejenerasyon, endometriyoz ve diyabetik retinopatiler gibi durumlarda gözlenir (91).

Kapillerler veya en küçük damarlara ait mikrovasküler endotelial hücreler (EH) anjiyogenez işleminde rol alan hücrelerdir. Yetişkinde yeni damar oluşumu 4 farklı mekanizma ile gerçekleştirilebilir: 1) tomurcuklanma yoluyla anjiyogenez, 2) içten bölme (intussusception) yoluyla anjiyogenez, 3) damar uzaması yoluyla anjiyogenez ve 4) dolaşımdaki endotelial progenitor hücrelerin (EPH) büyümekte olan damarlara katılması yoluyla anjiyogenez (Şekil 2.5.2.1).

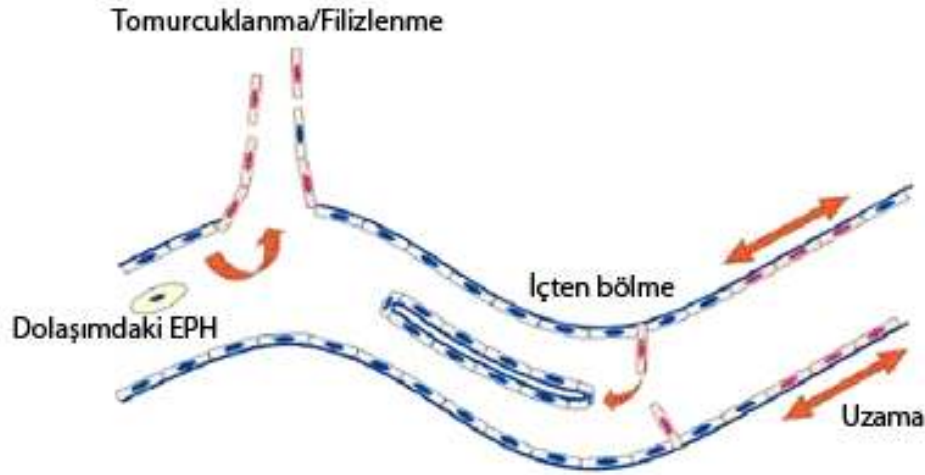
1) Klasik anjiyogenez, ya da tomurcuklanma yoluyla anjiyogenez: endotelial hücrelerin aktivasyonu yoluyla, bazal membranın yıkımını sağlayacak proteazların bu hücrelerce salgılanması ile başlar. Bu aşamadan sonra endotelial hücreler, anjiyogenik uyarana (stimulus) doğru göç ederler, çoğalırlar ve tüpçükler oluşturmak üzere uç uca eklenirler (92). Daha sonra yeni bir bazal membran oluşturulur ve büyük damarlar, düz kas hücreleri ile, diğer damarlar da perisitlerin çevrelemesi ile stabilize edilirler. Klasik, tomurcuklanma yoluyla anjiyogenez; normal olarak EH aktivasyonu, bazal membranın

yıkımı, EH'lerin çoğalması ve göçü, EH tomurcuklarının füzyonu, tüp gibi bir seri basamağı içerirken, intussusception ve damar uzaması, bu basamakların hepsini gerektirmez. Her ne kadar bu son iki anjiyogenik mekanizmaya ait hücresel olaylar hakkındaki detaylı bilgilerimiz eksik ise de, "EH proliferasyonu" hemen hemen tüm anjiyogenik olayların ana komponenti gibi gözükmektedir.

2) İçten bölme (Intussusception) yoluyla anjiyogenez: çoğalan endotelial hücreler içeri doğru göç ederek damar lümenini ikiye ayırırlar. Damar duvarının bu işlemin ardından yeniden şekillenmesi, birbirine paralel iki yeni damarın oluşması ile sonuçlanır. Bu şekildeki damar oluşumunun en önemli avantajları; damar duvarının delinmesine veya haraplanmasına gerek duyulmaması ve kan akımının tüm işlem boyunca devam etmesidir.

3) Damar uzaması ve damar genişlemesi: muhtemelen büyümekte olan dokulardaki mevcut kan damarlarının, onları çevreleyen hücrelerin metabolik gereksinimlerine yanıt olarak sürekli yeniden yapılanması yoluyla gerçekleşir. Bu mekanizma aynı zamanda yeniden modellenme veya budama olarak ta bilinir (92).

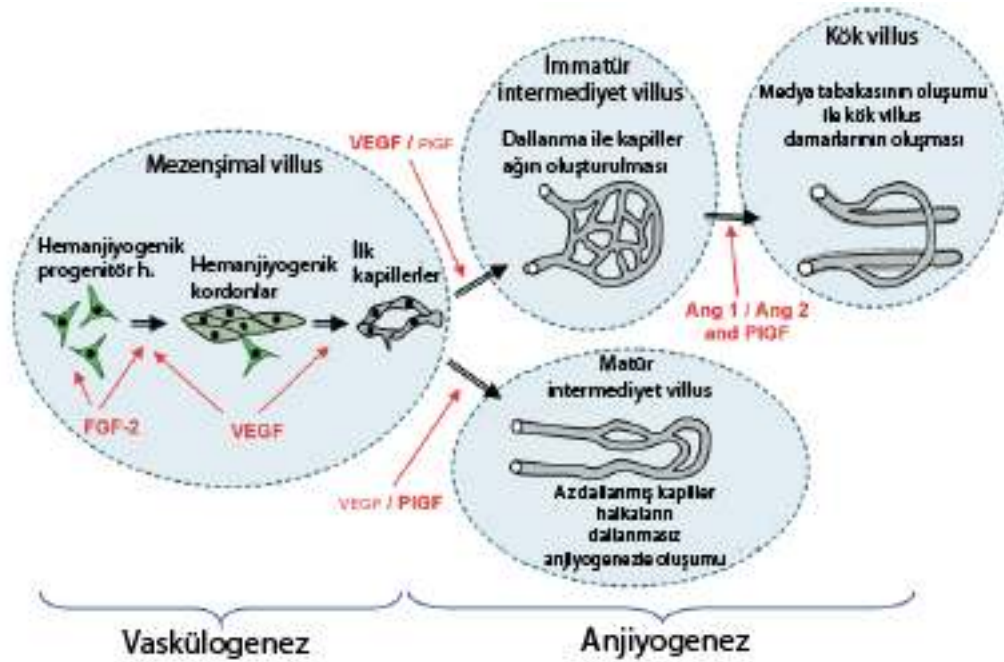
4) Dolaşımdaki endotelial progenitör hücreler yoluyla anjiyogenez: dolaşımdaki mononükleer hücrelerin küçük bir oranının, büyüyen bazı damarlara inkorpore olabilen (dahil olabilen) endotelial hücre progenitörleri oldukları belirlenmiştir (93).



Şekil 2.5.2.1. Anjiyogenez tiplerini gösteren şekil.

2.6. Plasental Villöz Damarların Gelişimi ve Yapısı

Plasental kan damarları, farklılaşmamış öncül (prekürsör) hücrelerin (hemanjiyoblast) daha sonra damar ağını oluşturmak üzere düzenlenecek endotel hücrelerine in situ olarak farklılanması ile karakterize bir işlem olan “Vaskülogenez” yoluyla oluşturulmaya başlanır (92). Plasentasyon boyunca vaskülogenez, sekonder villustan tersiyer villusa geçiş sırasında ilk villöz damarların oluşumunda (Gebeliğin 18-35. günleri arası) ve ilerleyen gebelikte immatür intermediyet villuslardan mezenşimal villusların oluşumu sırasında görülür (37) (Şekil 2.6.1.1). Vaskülogenezle oluşturulmuş primitif kapiller ağı genişletilmesi ise “Anjiyogenez” ile sağlanır. Plasentasyon sırasında, immatür intermediyet villus, kök villus, matür intermediyet villus ve terminal villusların damar ağı bu şekilde oluşturulur (Şekil 2.6.1.1).



Şekil 2.6.1.1. Plasental villus tiplerinde vaskülogenez ve anjiyogenez (37).

2.6.1. Vaskülogenez 1: Hemanjiyoblastik Hücrelerin Kökeni (15-21. günler)

Hemanjiyoblastik hücreler, fetal kökenli mezenşimal hücrelerden köken alırlar ve her iki hücre yapısal olarak benzerdir. Bu progenitör hücrelerin fetal kan hücrelerinden köken almaktansa, direkt olarak fetal mezenşimal hücrelerden köken aldıkları bilinmektedir (8).

Endotelial ve hematopoietik hücreler, ortak bir progenitörü (hemanjiyoblast) paylaşırlar. Vitellus kesesinde hemanjiyoblastlar, içindeki hücrelerin hematopoietik prekürsörlere, dıştaki hücre popülasyonunun ise endotelial hücrelere farklılaşacağı agregatlar (kümeler) oluştururlar. Anjiyoblastlar, in situ farklılaşma ve ağ oluşumu

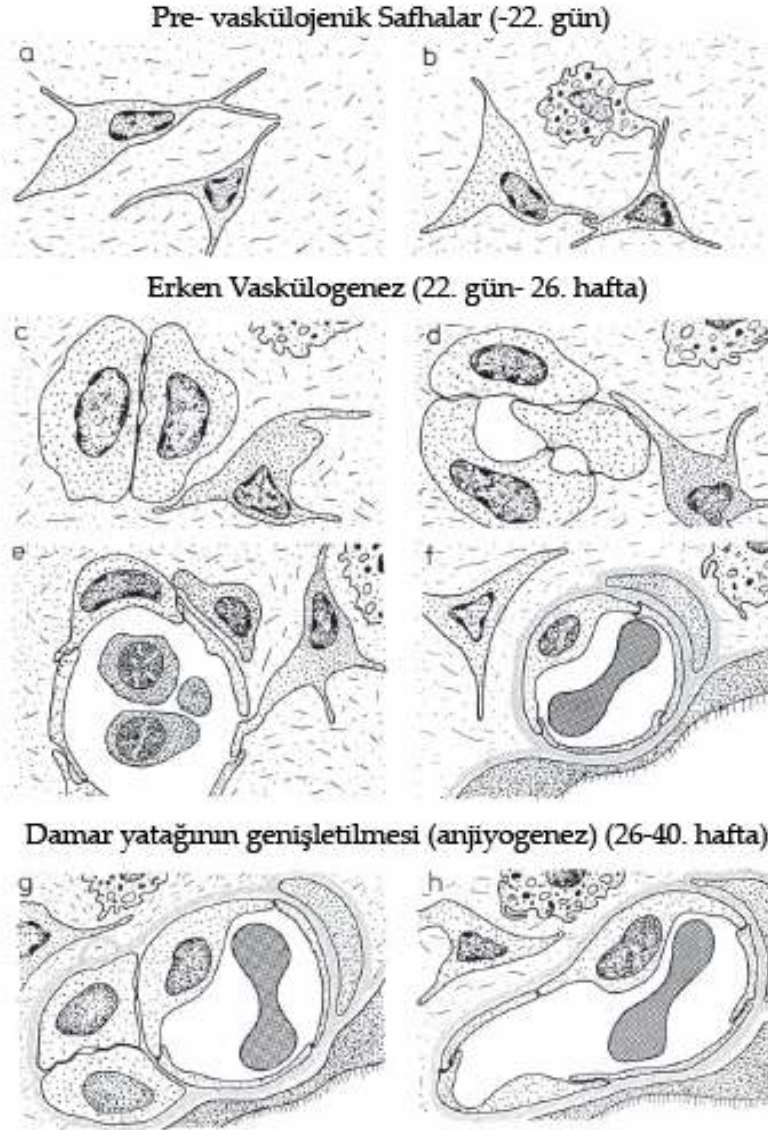
gerçekleşmeden önce, oldukça fazla bir şekilde göç edebilirler. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), VEGF Reseptörü-2 (VEGFR- 2, Flk-1) ve bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF), anjiyoplast farklılaşmasını artırırken (94), VEGF Reseptörü-1 (VEGFR-1, Flt-1) hemanjiyoplastları baskılar (95). Matriks makromolekülleri, fibronektin, matriks reseptörleri ($\alpha 5$ -integrin) ve endotelial hücreler arasındaki etkileşimleri sağlayan moleküller de vaskülogenezde önemli roller üstlenirler.

Endotelial hücre prekürsörleri, embriyonik yaşamın haricinde, yetişkin kemik iliğinde ve periferik kanında da tespit edilmiştir. VEGF, Granülosit-Monosit Koloni Stimüle Edici Faktör (GM-CSF), bFGF ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)-1 bu hücrelerin farklılaşmasını ve mobilizasyonunu stimüle etmektedir (96, 97). Bu tarz prekürsörler, yetişkinde anjiyogenik alanlar ve vasküler protezler oluşturabilir ve terapötik acıdan çok önem taşımaktadırlar.

2.6.2. Vaskülogenez 2: Primitif Endotelial Tüplerin Oluşumu (21-32. günler)

İnsan plasental damarlanma, plasental villuslarda pluripotent mezenşimal öncü hücrelerden kapillerlerin ilk kez oluşturulmasıyla gerçekleşir. Plasentalın damarlanması embriyo daha 4 somitliken, 21. p.c. günde başlar (8, 98). Mezenşimal hücreler, basamak-basamak endotel hücrelerine dönüşürler (8). Bu safhada, sekonder villusların özünde, hemanjiyogenik hücrelerin progenitörleri ilk damarların oluşumundan önce farklılaşarak hemanjiyogenik hücre kordonları oluştururlar. Bu hücreler desmozomlar ve primitif sıkı bağlantılarla birbirlerine tutunurlar (Şekil 2.6.2.1.a, b, c). Hücrelerarası yarıkların genişlemesi primitif kapiller lümenini oluşturur (Şekil 2.6.2.1.d). Bu primitif lümenin oluşması, başka organlarda görüldüğü gibi hücre içi vakuollerin birleşmesiyle gerçekleşmez (99). Davidoff ve Schiebler (1970) kobay plasentasında mezenşimal hücrelerin apozisyonu ve ardından dağınık halde bulunan hücre içi dilatasyonlarının genişlemesi ile ilkel kapiller lümeninin oluştuğunu öne sürmüşlerdir (100). Bu tanım, lümen oluşumunun endotel-arası aralıkların birleşmesiyle oluştuğunu öne süren diğer gözlemlere ters düşmektedir (99). Diğer memelilerin plasentalarında olduğu gibi, insanda da hemanjiyoplastik kordonlar arasında bağlantılarla belirlenen ekstrasellüler aralıkların birleşmesiyle oluşur [kobay:(100); maymun:(9); insan: (8)]. 6 somitlik embriyonun plasental villuslarında hemanjiyoplastik hücre kordonları ve kan hücreleri içermeyen primitif kapiller oluşumları gözlenir. Primitif kapiller lümeni oluşur oluşmaz ilk hematopoietik hücreler erken lümen içinde belirir (Şekil 2.6.2.1.e). 28. p.c. günde, oldukça yassılaşmış endotel hücreleri ile döşenmiş poligonal kapiller lümenlerinde, gelişmekte olan kan hücreleri izlenir ama fetal villöz dolaşımın oluşmasını sağlayan düzenli bir damar sistemi ve göbek kordonundan embriyoya ulaşan bir dolaşım bulunmaz. 32-35. günlerde villöz kapillerlerin birbirleri ve daha büyük allantoyik damarlarla birleşir. Allantoyiste de vaskülogenez başlamasıyla birlikte ta ki embriyo içi ile plasental yataklar arası bağlantı sağlanana kadar hem embriyonik hem de plasental yönlerde vaskülogenez devam eder.

Bu arada, kapiller çevresindeki diğer mezenşimal hücreler, uzantılarıyla hem mezenşimal ağ hem de endotelyal tüplerle ilişkidir (Şekil 2.6.2.1.e). Endotelyal hücrelere ablüminal taraftan bağlı olan bu juksta-hemanjiyogenik hücreler perisitlerin karakteristik özelliklerini kazanırlar (Şekil 2.6.2.1.f ve e) (9, 101). Bu hücreler Dempsey (1972) tarafından fötal kan damarlarının ana öncülleri (progenitörleri) olarak yorumlanmıştır (101). Dempsey (1972) sadece perisitlerin mitotik aktivite gösterdiğini ve endotelyal döşemenin büyümesine destek olduklarını öne sürmüştür. King (1987) ve Demir (1989) 'in bulguları bu olasılığı saf dışı bırakmamakla beraber, bu yolun tek farklılaşma yolu olduğundan şüphe duymuşlardır çünkü Castellucci (1987) immatür villuslarda endotelyal mitozdan bahsetmiştir (8, 9, 27). Bütün bunlara ek olarak Holmgren (1991), trombosit kökenli büyüme faktörü B (PDGF-B) ve buna ait beta reseptörünün (PDGF- β reseptör) plasental anjiyogenezdeki önemine dikkat çekmiştir (102). PDGF-B ve reseptörünün çoğu mikrovasküler endotelyal hücrelerde bulunup, reseptör mRNA'sının makrovasküler endotelyal hücrelerde bulunmayışı, kapiller endotelyal hücrelerinin hücre çoğalmasını ve anjiyogenezini ilerlettiğini öne sürmektedir.



Şekil 2.6.2.1. Plasental villusta vaskülogenez ve anjiyogenez mekanizmaları (8).

2.6.3. Anjiyogenez 1: Dallanıcı Anjiyogenez (32. gün-25. hafta)

Yaklaşık 32. pc. günde birçok villöz damar (Şekil 2.6.3.1, II. safha) ve göbek kordonu taslağında fetal allantoyik damarlar oluşmuştur. Artık ilkel bir fötoplasental dolaşım başlamıştır. Bu andan itibaren mezenseşimal öncüllerden vaskülojenik kapiller oluşumu sadece dallanan mezenseşimal villus uçlarında olur. Diğer tüm villöz vasküler ağın genişletilmesi anjiyogenezle sağlanır.

32. günden başlayarak terme kadar devam eden anjiyogenez, birbirleriyle kısmen çakışan 3 safhadan oluşur:

I. Kapiller ağın 32. günden 25. haftaya kadar dallanan anjiyogenezle oluşması (Şekil 2.6.3.1, III. safha)

II. Periferik kapiller ağın gerilemesi ve santral kök damarların 15-32. haftalar arası oluşturulması (Şekil 2.6.3.1, IV. safha).

III. Terminal kapiller halkaların dallanmayan anjiyogenezle oluşturulması (25. hafta-Term) (Şekil 2.6.3.1, V. safha)

32. pc. günden ilk trimesterin sonuna kadar, vaskülogenezle oluşturulmuş endotelial tüp segmentleri, iki mekanizmanın etkileşimi ile primitif kapiller ağına dönüştürülür: 1) Var olan damarların dallanmayan anjiyogenez ile uzaması, 2) bu tüplerin, lateral filizlenme (filizlenen anjiyogenez, (103)) ve muhtemelen damar lümeninde içe doğru bir endotelial sütun oluşturarak “intussusceptive” büyüme ile çatallanması (104).

Küçük çaptaki villusların ilk neslinde (mezenşimal villus), dallanan anjiyogenez çok görülmez ve oluşan kapiller ağ çok gelişmemiştir (Şekil 2.6.3.1, II. safha). Mezenşimal villustan farklılaşan daha büyük çaptaki immatür intermediyet villuslarda dallanıcı anjiyogenez tetiklenir ve villöz yüzeyin hemen altında, yoğun, iki-boyutlu bir ağ oluşur (Şekil 2.6.3.1, III. safha). Bu arada, kapillerler etrafında farklılaşma başlar. Endotelial tüpler perisit tabakasına ihtiyaç duyarlar. 6. haftada endotelial tüplerin ve perisitlerin etrafında ilk bazal lamina materyali birikir. Kapillerlerin bazal lamina ile tamamen kaplanması gebeliğin sadece son 10 haftasında gözlenir (Şekil 2.6.2.1.h) (8).

2.6.4. Anjiyogenez 2: Kök Damarların Oluşumu ve Kök Villustaki Kapillerlerin Gerilemesi (15.-32. hafta)

Gebeliğin 3. ayında immatür intermediyet villuslardan kök villus oluşumu başlar; immatür intermediyet villusların merkezi yerleşimli endotelial tüplerinden bazıları 100µm’den büyük çapa ulaşırlar. Çok kısa bir zaman içerisinde de α - ve γ - düz kas aktini ekspresye eden kasılabilir hücreler ile sarılırlar. Çevredeki stroma da, bu damarlar etrafında konsantrik (dairesel) bir yerleşim gösterir. Bu damarlar, villöz arter ve venlerin öncülleridir. Daha büyük immatür intermediyet villuslarda arter ve venlerin adventisya tabakaları birleşerek villus içinde fibröz bir stromal öz oluşturur. İmmatür intermediyet villusun retiküler stromasının %50’sinden fazlası fibröz stroma haline dönüştüğü andan itibaren, bu villus “Kök villus” adını alır.

Damar duvarının dış kısımlarının gelişiminin Tie-2 reseptörü ile etkileşen Anjiyopoietin-1 (Ang-1) ve Anjiyopoietin-2 (Ang-2) arasındaki denge ile kontrol edildiği öne sürülmüştür (105). Kök villuslara farklılaşmanın olduğu immatür intermediyet villusların perivasküler (damar çevresi) hücrelerinde Ang-1, Ang-2 ve mRNA’ları belirlenmiştir (106).

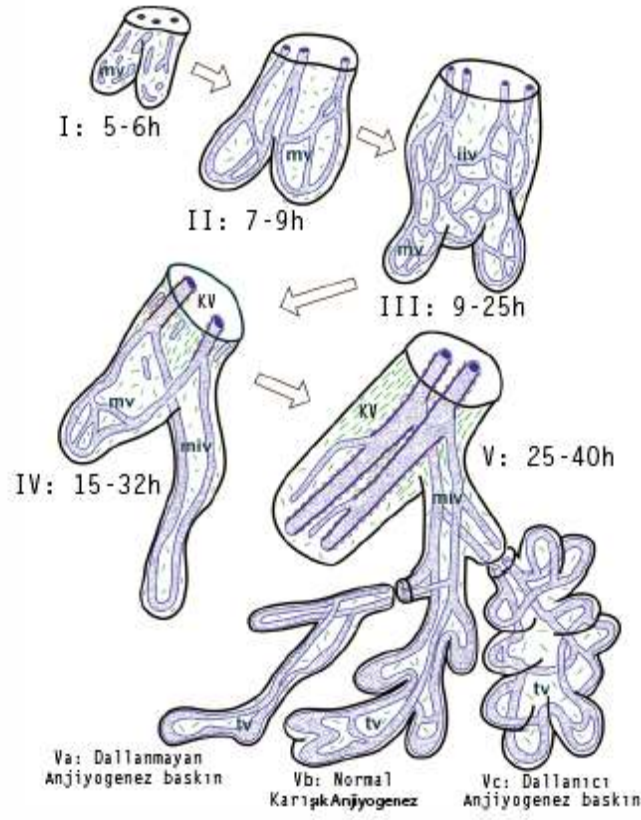
Gebelik ilerledikçe, trofoblast tabakasının altındaki kapiller ağ geriler ve birkaç, büyük, dallanmamış paravasküler kapiller olarak kalır (107). Kök villuslarda kapiller gerilemenin mekanizmaları halen bilinmemektedir. Bir görüşe göre, VEGF-A'nın eksikliği, plasental büyüme faktörü (PIGF) 'nün artışı bu kapiller gerilemeye neden olabilir, çünkü PIGF, VEGF-A'nın etkisini baskılayarak anjiyogenezi baskılayabilir (108, 109). İlginç olarak, gelişen kök villuslardaki kapillerin ağın gerilemesi olayına villöz yüzeydeki trofoblast kaybı ve fibröz yapı kazanan stromadaki makrofaj (Hofbauer hücresi) kaybı eşlik eder (110).

2.6.5. Anjiyogenez 3: Dallanmasız Anjiyogenez (25. hafta- Term)

25. Haftadan terme kadar mezenşimal villuslar artık immatür intermediyet villuslara değil, yeni bir villus tip olan matür intermediyet villuslara dönüşürler. Bunlar ince (80-120µm), uzun (>1000µm) villuslardır. Mezenşimal villuslardan bu yeni tip villusun oluşması, villöz vasküler büyümenin dallanıcı anjiyogenezden (immatür intermediyet villus oluşumuna neden olur) dallanmayan anjiyogeneze geçişi ile mümkün olmaktadır (111).

Bu evrede yapılan hücre çoğalma belirteçleri analizleri, trofoblast çoğalmasında azalma, matür intermediyet villus boyunca endotelial çoğalmada artış olduğunu göstermiştir. Bu şekilde, dallanma olmaksızın, sadece çoğalarak uzama yoluyla anjiyogenez oluşur. Kapiller uzamanın bir diğer yolu da interkalasyon adını alan mekanizmadır (112). Bu anjiyogenez mekanizmasında dolaşımdaki endotelial progenitör hücreler kapiller duvarına çağırılırlar ve endotel hücrelerine farklılaşarak kapiller duvarına dahil olurlar (93).

Gelişen perifer kapiller düğümlerin boyu 4000µm'yi geçer (113). Daha da önemlisi, matür intermediyet villusların boyunun uzamasından daha hızlı uzadıklarından büküm büküm olurlar (Şekil 2.6.3.1, III. safha). Yumak oluşturan bu kapillerler trofoblastik yüzeye doğru itilirler ve böylece terminal villuslar oluşur.



Şekil 2.6.3.1. Fötal damar gelişime bağlı villöz gelişim. mv: mezenşimal villus; iiv: immatür intermediyet villus; kv: kök villus; tv: terminal villus; miv: matür intermediyet villus (37).

2.7. Vaskülojenik ve Anjiyogenik Faktörler

Anjiyogenez ve vaskülogenezde birçok faktör görev alır. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), Anjiyopoietinler, Anjiyogenin, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Netrin, Inter Lökin (IL) –8, Prostaglandin E1 ve E2, Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF- α) ve Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör (G-CSF), Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) gibi çeşitli proteinlerin EH büyümesini ve hareketini aktive ettikleri bilinmektedir (114). Bunlara ek olarak çeşitli transkripsiyon faktörlerinden Notch aile üyesine kadar daha birçok gen ürünü yeni damar oluşumu için gereklidir (114).

2.7.1. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF, en iyi karakterize edilmiş anjiyogenik faktörler arasındadır (114) ve damar oluşumunda kritik rol oynayan en potent anjiyogenik faktörlerden biridir.

VEGF, büyük ölçüde korunmuş, 30-46 kDa' luk, salgısal, heparin bağlayıcı homodimerik bir glikoproteindir (Smith, 1998). VEGF gen ailesi, 6 üyeden oluşur:

VEGF-A, -B, -C, -D, -E ve Plasental Büyüme Faktörü (PlGF). İnsan VEGF genine ait protein kodlayıcı bölgeler 8 ekzon halinde düzenlenmiş olup kromozom 6p21.3' te lokalizedir (115). Tek bir VEGF geninin alternatif kırılması (splicing) sonucunda her biri 121, 145, 165, 183, 189 ve 206 amino asit uzunluğunda 6 farklı VEGF-A izoformu (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189, VEGF206) oluşur (116-119). İlginç olarak, her ne kadar bütün izoformlar benzer biyolojik aktivite gösterebilir de, VEGF121 ve VEGF165 ekstrasellüler alana salgılanırken, VEGF189, VEGF206 ve az miktarda da VEGF165 heparan sülfatlara afinitelerinden dolayı hücre- veya matriks- ilişkili kalırlar (120). VEGF genini eksprese eden hücrelerin birçoğunda VEGF121 ve VEGF165 baskın olarak bulunmakla birlikte (116, 118) VEGF145 en az rastlanan izoformdur.

VEGF gen promotörü, tek bir transkripsiyon başlama bölgesi, bir küme SP-1 faktör bağlama bölgesi, AP-1 ve AP-2 transkripsiyon faktörleri için bağlama bölgeleri (Hipoksi ile düzenlenen bölge) (116) içerir. En iyi tanımlanmış VEGF reseptörleri VEGFR-1 (flt-1) ve VEGFR-2 (KDR/flk-1)'dir. Diğer VEGF reseptörlerinden nöropilinler, ana reseptörlere bağlanmayı yönlendiren aksesuar reseptörler olarak tanımlanmışlardır (121).

VEGF-A, Tip III tirozin kinaz aile reseptörlerinden, c-fms-benzeri tirozin kinaz (VEGFR-1, flt-1) (122) ve kinaz domeyn inserti içeren reseptör (VEGFR-2, KDR/flk-1) (Matthews ve ark., 1991)'e bağlanarak endotelial hücre çoğalması, geçirgenliği, göçü ve kapiller tüpleri oluşturmalarına neden olur (123-125). Flk-1 (fetal liver kinase, fetal karaciğer kinazi), KDR'nin kemiricilerdeki homologudur ve insan KDR'si ile %85 homoloji gösterir. Bu reseptörler, "7 Ig" veya "flt" gen ailesine aittir ve 7 tane ekstrasellüler Ig -benzeri domeyn, bir transmembran domeyn ve iyi korunmuş bir tirozin kinaz domeyni içerirler (126, 127). VEGF, fms-benzeri tirozin kinaz-1 (Flt-1 veya VEGFR-1) ve kinaz insert domeyn-içeren reseptör (Flk-1/KDR veya VEGFR-2)

VEGF, vasküler endotelial hücreler üzerinde çeşitli etkiler gösterir (85). VEGF, ilkin vasküler geçirgenliği (permeabiliteyi) ve vasküler endotelial hücre çoğalmasını uyarıcı etkisiyle karakterize edilmiştir (128, 129). Bu önemli molekül, arterler, venler ve lenfatiklerden köken alan mikro ve makro-vasküler endotelial hücreler için potent bir mitojendir ve diğer hücreler için herhangi bir mitojenik etki göstermez (130-132). Bu nedenden dolayı VEGF' in çok sınırlı bir hedef hücre özgünlüğü (spesifitesi) (132, 133) vardır. VEGF, üç boyutlu in vitro modellerde konfluent (birbirine karışan) mikrovasküler endotelial hücrelerin kollajen jellere invazyonlarını ve kapiller benzeri yapılar oluşturmalarını uyarak anjiyogenik etki gösterir (132). Bu çalışmalar aynı zamanda VEGF ve bFGF'nin bu indüksiyonda sinerjik etki gösterdiklerini ortaya koymuştur (132).

Farklı nakavt (knock-out) çalışmalar, VEGF'nin önemini vurgulamıştır. Farelerde, VEGF allellerinden birinin ortadan kaldırılması (haraplanması), ölümcül

vasküler anomalilerle sonuçlanmıştır. Yine farelerde, her iki allelin birden nakavt edilmesi, damar sisteminin hemen hemen tamamının ortadan kalkmasına yol açmıştır (134-136).

Hipoksinin hem tümör hücrelerinde hem de normal hücrelerde VEGF ekspresyonunu stimüle ettiği düşünülmektedir (137, 138). Ayrıca, VEGF ekspresyonu, PDGF, EGF, TNF- α , TGF- β 1 ve IL-1 gibi büyüme faktörleri ve sitokinler ile indüklenebilmektedir (123, 139).

VEGF ve bFGF, Bcl-2 gibi antiapoptotik moleküllerin ekspresyonunu indüklediklerinden dolayı yeni oluşturulan damarlar için antiapoptotik faktörler olarak ta görev yaparlar (140).

2.7.2. Anjiyopoietinler (Ang-1 ve Ang-2)

Anjiyopoietin-1 (Ang-1) ve Anjiyopoietin-2 (Ang-2), 1996 yılında Yancopoulos ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (141). Vakülogenez ve anjiyogenezin düzenlenmesine ilişkin yapılan araştırmaların çoğu VEGF üzerine odaklanmış olsa da anjiyopoietin ailesinin önemini gösteren çalışmaların sayısı artmaktadır. Anjiyopoietinler de VEGF gibi tirozin kinaz reseptörleri üzerinden etkilerini gösterirler. Anjiyopoietinler, Tie-1 (tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains) ve Tie-2 (Tunica internal endothelial cell kinase) reseptörleri üzerinden etki gösterirler (142). Her ne kadar Tie-1'in ligandı henüz belirlenememişse de, Yuan ve ark. (143) Ang-1'in Tie-1'i Tie-2'ye bağlı yoldan aktive ettiğini göstermiştir.

Hem Ang-1 hem de Ang-2, Tie-2 için birer ligandır (144). Ang-1'in Tie-2'ye bağlanması Tie-2 fosforilasyonuna ve dolayısıyla çeşitli alt sinyal yollarının aktivasyonuna neden olurken, Ang-2, Ang-1/Tie-2 reseptör sinyalizasyonunu antagonize eder (125, 143). Tie-1'in Ang-1 aracılı fosforilasyonu: (1) Akt treonin kinaz ve p42/44 MAPK (Mitojen aktive protein kinaz) aracılı hücre canlılığını (143); (2) endotelial hücrelerin yeniden düzenlenmesi; (3) perisitlerin ve vasküler düz kas hücrelerinin çağırılması ve yeni oluşan damar duvarının olgunlaştırılması ve sabitleştirilmesi (stabilizasyonu) için damar duvarına eklenmesi (125) gibi olaylara neden olur. Bunlara zıt olarak, Ang-2, Ang-1 aracılı Tie-2 aktivasyonunun antagonistidir. Ang-2, damarları destabilize eder, damar duvarlarını gevşetir ve endotelial hücrelerin peri-endotelial mural hücrelerle ilişkilerini baskılayarak, endotelial hücreleri VEGF'in etkilerine açık hale getirirerek vaskülogenez ve anjiyogenezin ilerlemesine neden olur (145-148). Kısacası, VEGF vaskülogenez ve anjiyogenez kontrol ederken, anjiyopoietinler vaskülogenez ve anjiyogenez esnasında vasküler modellenmeyi kontrol ederler (149, 150).

2.7.3. Netrin-1

Netrin-1 ilkin, nöronal gelişim için önemli akson-rehberi moleküllerden biri olarak belirlenmiştir (151). Reseptörü olan Neogenin üzerinden aktivasyon gösterdiğinde, Netrin-1 aksonal büyümeye neden olur.

Damar ağının oluşturulması ve nöronal ağın oluşturulması birçok benzerlik göstermektedir (152). VEGF gibi sayısız faktör endotel hücre göçü ve çoğalmasını düzenlemektedir. İlginç olarak, Netrin-1, bu endotelial mitojenlerle yapısal homolojiler göstermektedir (153). Yapılan bir çalışma, Netrin-1'in HUVEC hücreleri ve damar düz kas hücrelerinin çoğalması ve göçüne, ayrıca endotel hücrelerinin adhezyonuna neden olduğunu göstermiş ve bu etkinin VEGF'le kıyaslanabilir düzeyde olduğunu bildirmiştir (154). Bu nedenden dolayı Netrin-1, anjiyogenik bir faktör olarak ele alınmaktadır (154).

2.8. Plasentada Vaskülojenik ve Anjiyogenik Faktörler

Vaskülogenez ve anjiyogeneizde birçok faktör rol alır. Bunlardan bazik FGF (bFGF, FGF-2) ve reseptörünün hemanjiyogenik progenitör hücrelerin vaskülogenezin gerçekleşeceği alana çağırılmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. FGF'nin plasentada ekspresyonu, çeşitli araştırmacılar (155, 156) tarafından gösterilmiştir. Hemanjiyogenik progenitör hücrelerin diğer organlarda, a) ortama çağırılması, b) büyümesi ve c) kümeler oluşturmaktan sorumlu olan VEGF-A ve reseptörü Flk-1, erken plasental örneklerde oldukça yüksek ekspresyona sahiptir (157-159). In situ hibridizasyon ve immünohistokimyasal çalışmalar villöz trofoblastlar ve Hofbauer hücrelerinin bu sitokinin ana kaynağı olduğunu göstermiştir (159, 160). İnsan trofoblastlarının VEGF salgıladıkları ayrıca Shore ve ark. (158) tarafından belirlenmiştir. Hofbauer hücreleri ve bunlara ait sitokinlerin kapiller oluşumun ilk basamaklarında rol aldıkları hipotezi, makrofajların hemanjiyogenik hücre kordonların oluşumundan daha önce, villöz stromada lokal olarak farklılaşabilmeleri bulgusu ile uyumludur (8). Farelerde yapılan Flk-1 nakavt çalışmaları, feto-plasental kapillerlerin hemanjiyoblastik öncüllerinin belirlenmesi ve farklılaşması için ne kadar önemli olduğunu göstermiştir (161). Flt-1'in villöz vasküler endotelde eksprese olduğu, immünohistokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir (159, 162). Flt-1'in nakavt edildiği modeller, Flt-1'in endotelial prekürsör hücreler üzerinde VEGF-A'nın etkisini göstermesinden sorumlu olduğunu öne sürmektedir (163). İlginç olarak, Flt-1 geninin hücre içi domeynini kodlayan tirozin kinazın ortadan kaldırılmasının vasküler yapıları bozmadığı, bu nedenden dolayı, Flt-1'in ekstrasellüler domeyninin plasental vasküler gelişim için gerekli olduğu öne sürülmüştür.

Demir ve ark. (2004, 2007) erken insan plasentasında vaskülogenez ve anjiyogenezin basamaklarını alansal ve zamansal olarak tarif etmiştir (159, 164). VEGF-A ve Flk-2'nin ekspresyonu, gebeliğin en erken döneminde en yüksektir (164). Tersine, PlGF ve Flt-1'in çözünür formu, dallanıci anjiyogenezin dallanmasız anjiyogenezele yer

değiştirmeye başladığı zamana doğru artar (165). Gebeliğin en erken döneminde trofoblastlarda yoğun olarak eksprese olan VEGF, gebelik ilerledikçe stromaya, özellikle Hofbauer hücrelerine ve hemanjiyogenik hücre kordonlarına kayar (159). Flk-1 özellikle hemanjiyogenik hücre kordonlarında, Flt-1 ise stromal hücrelerde, hemanjiyogenik hücre kordonlarında ve endotelde eksprese olur (159).

Plasentada anjiyopoietinler ve reseptörleri hakkındaki çalışmaların sayısı, VEGF ve reseptörleri hakkındaki çalışmalardan çok azdır. Mevcut çalışmalardaki bilgiler de birbirleri ile çelişmektedir. Örneğin Dunk ve ark. (166) 1. trimester plasental dokularda, Ang-1 mRNA hibridizasyon sinyalinin hem sitotrofoblastlarda hem de sinsiyotrofoblastlarda olduğunu, Ang-2 mRNA hibridizasyon sinyalinin ise sitotrofoblastlarla sınırlı olduğunu bulmuşlardır. Babischkin ve ark. (167) ise, Ang-1 ve Ang-2 ekspresyonunun, yoğun olarak sinsiyotrofoblastlar, sitotrofoblastlar ve villus özünün vasküler olmayan hücrelerinde bulunduğu bildirmiştir. Kendi yaptığımız çalışmada ise, Ang-1'in sadece sitotrofoblastlarda ve Ang-2'nin de, baskın olarak sinsiyotrofoblastlarda bulunduğunu gösterdik (168).

2.9. Hipotez

Hofbauer hücrelerinin hemanjiyogenik hücre kordonları ile ilişkisi, bu hücre topluluklarına katılıp katılmadıkları, ilkel damar tüpü oluşumuna katılıp katılmadıkları henüz tarif edilmemiştir. Anjiyogenik hücre büyümesi ve fonksiyonunun bu hücrelerden köken alan faktörler tarafından düzenlendiğine dair ikna edici veri bulunmamaktadır. Daha ötesi, şimdiye kadar ki hiçbir çalışma, Hofbauer hücrelerinin plasental villuslardaki vaskülogenez ve anjiyogeneze katıldıklarını öne sürmemiştir.

Hofbauer hücreleri hakkında henüz bilinmeyen bu özelliklerin test edilmesi için şu hipotezi kurduk: Hofbauer hücreleri plasental vaskülogenez ve anjiyogeneze hem yapısal hem de fonksiyonel olarak katılırlar. Bu bağlamda amacımız; makrofaj özelliği de olan Hofbauer hücrelerinin, vaskülogenez ve anjiyogenezdaki rollerini belirlemek ve bu süreçlere doğrudan katılıp katılmadıklarını göstermektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Dokuların Alınması ve Hazırlanması

Gebeliğin birinci trimesterine ait küretaj dokuları (n=33), gebeliğin yasal olarak tıbbi veya psikososyal, fakat plasental yapı ve fonksiyonu etkilemesi olası olmayan nedenlerden dolayı sonlandırılmış gebeliklerden elde edildi. Dokular, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Atatürk Devlet Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği ile bazı özel kliniklerin desteği ile sağlandı. Plasental dokuların hepsi hormon almamış normal gebeliklere aitti. Hastalardan aydınlatılmış onam alındı ve Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı. Gebelik haftasının belirlenmesi için hastanın son menstruasyon tarihi, ultrasondan elde edilen veriler ve Carnegie'nin gelişimsel sınıflandırması rehber olarak kullanılarak hesaplandı.

Konseptusun vakumla aspirasyonundan hemen sonra dokular steril koşullarda Hank'in dengeli tuz solüsyonu (HBSS) içinde laboratuvara getirildi. Steril kabin içinde HBSS içindeki örneklerde desidua ve plasenta ayrıştırılarak, plasental doku örnekleri aşağıda belirtilen işlemler için ayrıldı:

- 1) İmmünohistokimya ve immünofluoresan yöntemler için parafine;
- 2) Elektron mikroskop incelemeleri için dokular uygun işlemlerden sonra araldit-epoksi rezin içine gömüldü.
- 3) Hücre kültürü çalışmaları için taze dokular steril biyolojik kabin içinde Hofbauer hücre izolasyonu işlemlerine tabi tutuldu.

Ayrıca, insan göbek kordonu venöz endotelyal hücrelerin (HUVEC) izolasyonu yapıldı. Bu aşamada sezeryan ile doğum yapmış sağlıklı annelere ait term plasentalar kullanıldı. Doğumdan hemen sonra göbek kordonu klemplenerek alınan plasentalar (n=4), olabildiğince steril şekilde hücre kültürü laboratuvarına getirildi ve HUVEC izolasyonu için işleme tabi tutuldu.

3.1.1. Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi

Alınan insan küretaj materyalinden plasenta dikkatlice ayrıldıktan sonra fosfat tamponlu tuz çözeltisinde (PBS) iyice yıkanarak kandan arındırıldı. Daha sonra doku %10'luk nötral Formalin (%4'lük Formaldehid) fiksatifine alınarak 12 saat tespit (fiske) edildi. Tespitten sonra, 4 saat akan çeşme suyu ile yıkandı. Ardından, dokular sırasıyla %70, %80, %90 ve %100 şeklinde artan derecelerdeki etil alkol serilerinden

geçirildi. Daha sonra parafin doku blokları elde etmek için daha önce belirtilen rutin takip yöntemi kullanıldı (169).

3.1.2. Elektron Mikroskop İncelemeleri İçin Doku Takibi

Alınan plasental örnekler 0.1 M Sörensen Fosfat Tamponunda hazırlanmış %4'lük Gluteraldehit içinde +4 °C de 2 saat tutuldu. Ardından %6.5'luk Sakaroz çözeltisinde, 3 kere onar dakika yıkandı. %1'lik OsO₄ fiksativ ile 2 saat muamele edildi. Yeniden sakaroz çözeltisi ile yıkandı ve +4 °C'de sırasıyla %30, %50 ve %70'lik alkol serilerinden 3 kere onar dakika geçirilerek dehidrate edildi. Sonra dokular %75'lik etanol ile hazırlanmış %1'lik uranil-asetat solüsyonunda +4 °C'de 1 saat tutuldu. Daha sonra sırasıyla %80, %90, %96 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı. Dehidratasyondan sonra, önce propilen oksitte 2 kere onar dakika, ardından I.Araldit-Propilen Oksit karışımında (1:1), oda ısısında 1 gece bırakıldı. Ertesi gün küçük kapsüller içinde Araldit ile birlikte gömüldü. Kapsüller rezinin polimerizasyonu için 60 °C'de 48 saat bırakıldı. 48 saat sonunda elde edilen bloklardan ultramikrotomla kalın kesitler alınıp toluidin mavisi ile boyandı. İncelenecek alan belirlendikten sonra ince kesitleri alındı ve kontrastlama sonrasında Zeiss Leo-906E geçirimli elektron mikroskopunda değerlendirildi.

3.2. İmmunohistokimya Yöntemi

Plasental dokularda Hofbauer hücrelerinin ve salgıladıkları proteinlerin varlığını göstermek amacıyla kullanıldı.

Kullanılan Solüsyonlar:

- **PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat tamponlu tuz) Solüsyonu:**

7.2 gr Na₂HP0₄.12H₂O (Merck)

0.8 gr KH₂P0₄ (Merck)

16 gr NaCl (Merck)

Yukarıdaki kimyasallar 2 litre bidistile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2 N NaOH ile pH=7.4 olacak şekilde ayarlandı.

- **Sitrik Asit Tamponu:**

2.1 gr sitrik asit (C₆H₈O₇.H₂O) (Merck) 900 ml bidistile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2 N NaOH ile pH=6.0 olacak şekilde ayarlandı.

- **%3'lük H₂O₂ Solüsyonu:**

63 ml PBS ve 7 ml %30 H₂O₂ (Merck) ilave edilerek şale içerisinde hazırlandı.

- **Bloklama Solüsyonu:** Ultra V Block (#TA-125-UB; LabVision)

- **Antikor Dilüent Solüsyonu:** Large Volume UltrAb Diluent (#TA-125-UD; LabVision)
- **Streptavidin Peroksidaz Kompleksi:** UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Ready-To-Use) Kit (#TP-060-HL; LabVision)
- **Kromojen:** 3, 3' diaminobenzidine (DAB, #K3466; Dako)
- **Mayer'in Hematoksileni:** Mayer's Hematoxylin (#S3309; Dako)
- **Kapatma Solüsyonu:** Permount (#SP15-100; Fisher Chemicals)

Gözlem:

- **Işık Mikroskobu:** Zeiss Axioplan

İmmunohistokimya boyaması için kesitler 5 µm kalınlığında superfrost-manyetik olarak statik olan lamalar üzerine alındı. Bu kesitler 54 °C'lik etüvde gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesitler 2 defa yirmişer dakika ksilolden geçirilerek parafinden kurtarıldı. Daha sonra kesitler beşer dakika azalan alkol serilerinden (%100, %90, %80, %70) geçirilerek rehidrate edildi. Sonra, PBS ile 2 defa yıkandı ve taze hazırlanan 250 ml sitrik asit (pH: 6.0) tamponunda ilki 7 dakika, ikincisi ve üçüncüsü beşer dakika olmak üzere 700 Watt'lık mikrodalga ışınlamaya maruz bırakılarak antijenik epitoplara açığa çıkması sağlandı. Kesitler mikrodalga uygulaması sonrasında oda ısısında 20 dakika soğutulduktan sonra, PBS ile üç kere beşer dakika oda ısısında yıkandı. Daha sonra, dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini doyurmak için, kesitler %3'lük H₂O₂ solüsyonu içinde oda ısısında 20 dakika bekletildi. Kesitler üç kere beşer dakika PBS ile yıkandıktan sonra, özgül olmayan bağlanmaları engellemek (bloke etmek) için bloklama solüsyonu ile oda ısısında 7 dakika bekletildi. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak, örnekler üzerine primer antikorlar eklendi ve gece boyu +4 °C'de nemli ortamda inkübe edildi. Negatif kontrol olarak, primer antikorlar ile aynı yoğunlukta (konsantrasyonda) olmak üzere, uygun izotip kontrol antikorları veya bunları içeren serum kullanıldı. Primer antikor inkübasyonundan sonra kesitler, 3 defa beşer dakikalık yıkama işlemlerini takiben, biotin ile işaretlenmiş sekonder antikorlar ile 45 dakika oda ısısında inkübe edildi. Primer antikorlar (VEGF, Flt-1, Flk-1, Ang-1, Ang-2, Tie-1, Tie-2, ve Netrin-1), negatif kontrol ve sekonder antikorlar ve bunlara ait dilüsyon oranları Çizelge 3.2.1'de verilmiştir.

Sekonder antikor aşamasından sonra, doku örnekleri üzerine streptavidin-peroksidaz kompleksi (LabVision) eklendi ve 30 dakika oda ısısında bekletildi. PBS ile yıkama aşamalarını takiben, Diamino benzidin (DAB) solüsyonu damlatılarak antijen-antikor kompleksleri görünür hale getirildi ve suda yıkandıktan sonra Mayer'in hematoksileni ile boyandı. Örnekler daha sonra artan alkol serilerinden geçirilerek

dehidrate (sudan kurtarma) edildi, ksilolden geçirilerek şeffaflaştırıldı ve kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Ortaya çıkan kromojenik reaksiyon ışık mikroskobu altında incelendi.

Çizelge 3.2.1. İmmünohistokimya deneyinde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve izotip kontroller.

PRİMER ANTİKOR	KATALOG NO	DENEY	DİLÜSYON	SEKONDER ANTİKOR	İZOTİP KONTROL
VEGF	#sc-7269 Santa Cruz Biotechnology Inc.	İmmünohistokimya	1/100	#BA-9200 Vector Laboratories	Fare IgG
Flt-1	#sc-316 Santa Cruz Biotechnology Inc.	İmmünohistokimya	1/200	#BA-1000 Vector Laboratories	Normal Tavşan Serumu
Flk-1	#sc-6251 Santa Cruz Biotechnology Inc.	İmmünohistokimya	1/200	#BA-9200 Vector Laboratories	Fare IgG
Ang-1	#MAB923 R&D Systems	İmmünohistokimya	1/100	#BA-9200 Vector Laboratories	Fare IgG
Ang-2	#MAB0983 R&D Systems	İmmünohistokimya	1/250	#BA-9200 Vector Laboratories	Fare IgG
Tie-1	#sc-342 Santa Cruz Biotechnology Inc.	İmmünohistokimya	1/300	#BA-1000 Vector Laboratories	Normal Tavşan Serumu
Tie-2	#sc-324 Santa Cruz Biotechnology Inc.	İmmünohistokimya	1/450	#BA-1000 Vector Laboratories	Normal Tavşan Serumu
Netrin-1	#sc-20786 Santa Cruz Biotechnology Inc.	İmmünohistokimya	1/200	#TP-060-HL LabVision HRP kit	Normal Tavşan Serumu

3.3. Çiftli İmmünohistokimya Yöntemi

Bu yöntemde aynı kesit üzerinde iki farklı antijenin iki farklı immünohistokimyasal sistem [Peroksidaz (HRP) ve Alkalen Fosfataz (AP) sistemleri] kullanılarak farklı iki renkte görünür hale getirilmesi sağlandı. Bu yöntemle Hofbauer hücrelerini belirlemek için CD68, damar yapılarını belirlemek için CD31 kullanıldı. Ayrıca, CD68 ile VEGF antikorları da çiftli immünohistokimya için kullanıldı.

Kullanılan Solüsyonlar:

- **PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat tamponlu tuz) Solüsyonu:**

- 7.2 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- 0.8 gr KH_2PO_4 (Merck)
- 16 gr NaCl (Merck)

Yukarıdaki kimyasallar 2 litre bidistile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2 N NaOH ile pH=7.4 olacak şekilde ayarlandı.

- **Sitrik Asit Tamponu:**

2.1 gr sitrik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Merck) 900 ml bidistile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2 N NaOH ile pH=6.0 olacak şekilde ayarlandı.

- **%3'lük H_2O_2 Solüsyonu:**

63 ml Methanol (Merck) ve 7 ml %30 H_2O_2 (Merck) ilave edilerek şale içerisinde hazırlandı.

- **Bloklama Solüsyonu:** Ultra V Block (#TA-125-UB; LabVision)

- **Antikor Dilüent Solüsyonu:** Large Volume UltrAb Diluent (#TA-125-UD; LabVision)

- **Streptavidin Peroksidaz Kiti:** UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Ready-To-Use) Kit (#TP-060-HL; LabVision)

- **Alkalen Fosfataz Kiti:** DakoCytomation LSAB2 System-AP (#K0676; Dako)

- **HRP sistemi için Kromojen:** 3, 3' diaminobenzidine (DAB, #K3466; Dako)

- **AP sistemi için Kromojen:** Fast Red Substrate System (#K0699; Dako)

- **Mayer'in Hematoksileni:** Mayer's Hematoxylin (#S3309; Dako)

- **Kapatma Solüsyonu:** Gliserol Jelatin; Kaiser's Glycerol Gelatine (#1.04095; Merck)

Gözlem:

- **Işık Mikroskobu:** Zeiss Axioplan

Çiftli immünohistokimyasal boyamada aynen normal tekli immünohistokimya gibi 5 μm kalınlığında kesitler kullanıldı. Bu kesitler 54 °C'lik etüvde gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesitler ksilolden geçirilerek parafin uzaklaştırıldı. Daha

sonra kesitler azalan alkol serilerinden (%100, %90, %80, %70) geçirilerek rehidrate edildi. Sonra, PBS ile 2 defa yıkandı ve 250 ml sitrik asit (pH: 6.0) tamponunda mikrodalga ile önce 7, sonra ikişer kere beşer dakika ısıtılarak (700 Watt) antijenik epitoplara açığa çıkması sağlandı. Kesitler 20 dakika soğutulduktan sonra, tekrar PBS ile yıkandı. Daha sonra, dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini %3'lük H₂O₂ ile ortadan kaldırıldı. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra, bloklama solüsyonu ile oda ısısında 7 dakika inkübe edildi. Bloklamadan sonra örnekler üzerine birinci primer antikolar eklendi ve +4 °C'de nemli ortamda gece boyu inkübe edildi. PBS 'le yıkama işleminden sonra biyotinlenmiş birinci sekonder antikorla (LabVision) oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. PBS'le yıkandıktan sonra streptavidin-peroksidaz (HRP) ile 15 dakika muamele edildi. Yıkama işlemlerinden sonra kesitlerin üzerine peroksidazın süstratı olan DAB kromojeni damlatılarak oluşan reaksiyon görünür hale getirildi. DAB kromojeni ile antijenin bulunduğu yapılar kahverengi olarak izlendi. Kesitler yıkandıktan sonra hemen alkalen fosfataz (AP) sisteminin kullanıldığı ikinci immünohistokimyasal boyamaya geçildi.

Kesitler, bloklama yapmadan ikinci primer antikor ile gece boyu +4 °C'de inkübe edildi. Yıkamaların ardından biyotinlenmiş ikinci sekonder antikor ile 20 dakika oda ısısında inkübe edildi. Yıkama işlemlerinden sonra streptavidin-Alkalen fosfataz (AP) ile 20 dakika oda ısısında tutuldu. Tekrar yıkanan kesitlerdeki reaksiyon, alkalen fosfatazın süstratı olan Fast Red kromojeni ile geliştirildi. Fast Red kromojeni reaksiyon alanlarında pembe renk oluşumuna neden oldu. Fast red kromojeni alkolde çözündüğü için kesitler dehidrate edilmeden gliserol jelatin ile kapatıldı.

Primer antikolar, negatif kontrol ve sekonder antikolar ve bunlara ait dilüsyon oranları Çizelge 3.3.1'de verilmiştir. CD68 ve CD31'in her ikisi de hem DAB'la, hem de Fast Red ile boyamaya tabi tutuldu. Bunun yanı sıra CD68 ile VEGF te çiftli boyamaya tabi tutuldu.

CD68 ile boyanan Hofbauer hücrelerinin lokalizasyonları, bulunma sıklıkları ve damarlanma ile ilişkileri villus tipi göz önünde bulundurularak incelendi ve fotoğraflandırıldı.

Çizelge 3.3.1. Çiftli immünohistokimya deneyinde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve izotip kontroller.

PRİMER ANTİKOR	KATALOG NO	DENEY	DİLÜSYON	SEKONDER ANTİKOR	İZOTİP KONTROL
CD68	#M0814 Dako	Çiftli immünohistokimya	1/200	#TP-060-HL LabVision HRP kit	Fare IgG
				#K0676 Dako AP Kit	
CD31	#MS-1873-R7 NeoMarkers	Çiftli immünohistokimya	Kullanıma hazır	#TP-060-HL LabVision HRP kit	Fare IgG
				#K0676 Dako AP Kit	
VEGF	#sc-152 Santa Cruz Biotechnology Inc.	Çiftli immünohistokimya	1/100	#K0676 Dako AP Kit	Normal Tavşan Serum

3.3.1. Hofbauer Hücre ve Damar Sayımı

Hofbauer hücrelerinin vaskülogenez ve anjiyogenez ile alansal olarak ilişkili olup olmadığını incelemek için, İMİV kesitlerinde hemanjiyogenik hücre kordonları ve damar yapılarının yanı sıra, bu yapılara yakın/bitişik yerleşen Hofbauer hücreleri sayıldı. Her gebelik haftasından (4., 5. ve 6. haftalar) 3 rastgele örnek seçilerek (n=9) CD68-pozitif Hofbauer hücre sayısı ve CD31-pozitif damar yapılarının sayısı açısından değerlendirildi.

3.4. Çiftli İmmunofloresan Boyama Yöntemi ve Konfokal Mikroskop İncelemeleri

Kullanılan Solüsyonlar:

- **PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat tamponlu tuz) Solüsyonu:**

- 7.2 gr $\text{Na}_2\text{HP0}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- 0.8 gr $\text{KH}_2\text{P0}_4$ (Merck)
- 16 gr NaCl (Merck)

Yukarıdaki kimyasallar 2 litre bidistile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2 N NaOH ile pH=7.4 olacak şekilde ayarlandı.

- **Sitrik Asit Tamponu:**

2.1 gr sitrik asit ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (Merck) 900 ml bidistile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2 N NaOH ile pH=6.0 olacak şekilde ayarlandı.

- **Permeabilizasyon (Geçirgenlik) Solüsyonu:** %1 Triton X-100 (#T8787; Sigma) içeren PBS

- **Bloklama Solüsyonu:** Ultra V Block (#TA-125-UB; LabVision)

- **Antikor Dilüent Solüsyonu:** Large Volume UltrAb Diluent (#TA-125-UD; LabVision)

- **Kapatma Solüsyonu:** DAPI'li kapatma solüsyonu, VECTASHIELD® HardSet™ Mounting Medium with DAPI (#H-1500; Vector Labs)

Gözlem:

- **Fluoresan Mikroskobu:** Olympus BX61

- **Konfokal Mikroskop:** Zeiss LSM 510 Meta Lazer taramalı konfokal mikroskop

Normal immüno floresan incelemeler için 5 µm kalınlığında kesitler alınırken, konfokal mikroskop incelemeleri için 10 µm kalınlığında kesitler alındı ve ksilolden geçirilerek deparafinize edildi. Bu kesitler 54 °C'lik etüvde gece boyu inkübe edildi. İmmünohistokimya yönteminde olduğu gibi yine Sitrik asit kullanılarak fiksatifin oluşturduğu sıkı aldehit bağları ısı yardımıyla kopartıldı. Lamalar, önce 5 dakika PBS ile yıkandı ve zar geçirgenliğinin sağlanması için 5 dakika %1 Triton X-100 içeren PBS içinde inkübe edildi ve ardından tekrar 5 dakika PBS ile yıkandı. Yıkamaların ardından UV blok kullanılarak, non-spesifik reaksiyonlar baskınladı. Üç kere PBS ile yıkandıktan sonra floresan işaretli birinci sekonder antikor ile 37 °C'de 90 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkamadan sonra bu sefer ikinci primer antikor ile 37 °C'de 90 dakika inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkandı ve ikinci sekonder antikorla yine 37 °C'de 90 dakika inkübe edildi. Bağlanmayan fazla antikorun uzaklaştırılması için kesitler tekrar PBS'le yıkandı ve kesitlerin üstü DAPI içeren ve floresan ışımının solmasını engelleyen kapatma solüsyonu (Vector Labs) ile kapatıldı. İnce kesitler floresan mikroskobunda değerlendirilirken konfokal değerlendirme için alınan daha kalın kesitler, Ankara Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Konfokal Mikroskobu ve Görüntü İşleme Laboratuvarındaki konfokal mikroskop ile incelenmiştir.

Primer antikorlar, negatif kontrol ve sekonder antikorlar ve bunlara ait dilüsyon oranları Çizelge 3.4.1'de verilmiştir. CD68 ve CD31'in her ikisi de hem kırmızı, hem de yeşil floresanla boyamaya tabi tutuldu.

Çizelge 3.4.1. Çiftli immünofluoresan deneyinde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve izotip kontroller.

PRİMER ANTİKOR	KATALOG NO	DENEY	DİLÜSYON	SEKONDER ANTİKOR	İZOTİP KONTROL
CD68	#M0814 Dako	Çiftli immünofluoresan	1/100	Alexa555 #A31571 Invitrogen	Fare IgG
				FITC #FI-2000 Vector Labs	
CD31	#ab-28364- 100 AbCam	Çiftli immünofluoresan	1/50	Alexa488 #A21206 Invitrogen	Normal Tavşan Serumu
				Texas Red # TI-1000 Vector Labs	

3.5. Hücre Kültürü İncelemeleri

Hofbauer hücrelerinin plasentanın diğer hücrelerinden ayrıştırılarak, bu hücrelerde fonksiyonel çalışmalara yapabilmek için kültür çalışmaları yapıldı. Ayrıca, Hofbauer hücrelerinin salgıladıkları faktörlerin damarlanmayı etkileyip etkilemediği de insan umbilikal kordon veninden izole edilen endotel hücreleri (HUVEC) ile yapılan anjiyogenez deneyi ile gösterildi.

Kullanılan Solüsyonlar:

- **Hofbauer Hücreleri İçin Uygun Olan M199 Besiyeri: “Hofbauer-Besiyeri “**
 - Earle tuzları
 - L-Glutamine
 - 2.2 gr/l Sodium Bicarbonate
 - 25 mM HEPES içeren M199 besiyeri (#12340-030; GIBCO)
- Bu besiyerine aşağıdaki kimyasallar belirtilen oranları oluşturacak şekilde eklendi:
 - %10 Fötal Sığır Serum (FBS-Fetal Bovine Serum) (#10082-147; GIBCO)
 - %1 penisilin/streptomisin (#A5955; Sigma)
 - %1 Na-Heparin (#H4484-250mg, Sigma)

Besiyerine gereken malzemeler eklendikten sonra 0.22µm aralıklı filtreye sahip çift rezervuarlı bir filtre sisteminden geçirilerek sterilize edildi. Besiyerini içeren şişenin ağzı parafilmle sıkıca sarıldıktan sonra +4 °C’de buzdolabında saklandı.

- **Serumsuz Hofbauer-Besiyeri:** Hofbauer-Besiyeri ile serum içermemesi dışında birebir aynı olan besiyeri.
- **Endotelial Büyüme Besiyeri:** Endothelial Growth Media, EGM-2 (#CC-3162; Clonetics) içeriğinde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), bazik Fibroblast Büyüme Faktörü, İnsülin benzeri Büyüme Faktörü, Epidermal Büyüme Faktörü, Hidrokortizon, Askorbik asit, heparin, gentamisin, amfoterisin ve %2 oranında FBS
- **Hank'in Dengeli Tuz Solüsyonu: Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)**
 - Kalsiyum Klorid, Magnezyum Klorid ve Magnezyum Sülfat içermeyen HBSS (#14170-120; GIBCO)
- **Dokunun Parçalanmasını Sağlayan Enzim Solüsyonu: "Hof-Digest"**
 - 0.1 gr Dispaz (#17105-041; GIBCO) 10 ml PBS içinde çözüldü.
 - Üzerine 79 ml PBS, 5.3 µl DNaz (#18047-019; Invitrogen) ve 900 µl 100X penisilin/streptomisin (#A5955; Sigma) eklendi.
 - Solüsyon 0.22 µm aralıklı filtreye sahip çift rezervuarlı bir filtre sisteminden geçirilerek sterilize edildi ve +4 °C'de buzdolabında saklandı.
- **Histopak 1077:** Histopaque 1077 (#10771-100ml; Sigma-Aldrich)
- **Perkol:** Percoll (Cell Culture Tested) (#P4937; Sigma)
- **Accuspin-Histopak 1077 sistemi:** Accuspin-System-Histopaque-1077 (#A6929; Sigma)
- **Dulbecco'nun Mg^{+2} ve Ca^{+2} içermeyen steril PBS'si:** Dulbecco's PBS without Ca^{+2} and Mg^{+2} (#14190-250; Invitrogen)
- **Tripan Mavisi Solüsyonu:** Trypan Blue Solution (%0.4) (#T8154; Sigma)
- **Trypsin-EDTA solüsyonu:** %0.05 Trypsin-EDTA (1X) (#25300-054; GIBCO)
- **In vitro Anjiyogenez Deneyi İçin Ekstrasellüler Matriks:** In vitro Angiogenesis Assay (#ECM625; Chemicon)

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:

- **Soğutmalı Santrifüj:** Universal refrigerated table top centrifuge (#2-16K, Sigma)
- **Biyolojik Kabin:** Class II Saftey Cabinet (Metisafe)
- **İnkübatör:** Hera Cell 150 Incubator (Hera)

- **Spektrofotometre:** μ Quant BioTek Spectrophotometer
- **Vakumlu Filtrasyon Sistemi:** Vacuum Filtration System, PES membrane 0.22 μ m, 250 ml (#99250; TPP) ve 500 ml (#99500; TPP)
- **Hemasitometre:** Hemacytometer (#1483; Hausser Scientific)
- **Hücre Ayırıcı Metal Elek:** Cell Dissociation Sieve-Tissue Grinder Kit 70 μ m mesh (#CD-1; Sigma)

Gözlem:

- **Faz kontrast mikroskobu:** Olympus IX71

3.5.1. Hofbauer Hücre İzolasyonu

İstemli sonlandırılmış insan küretaj materyali HBSS içeren 50 ml'lik falkon tüplerine alınarak steril koşullarda hücre kültür laboratuvarına getirildi. Biyolojik kabin içinde HBSS ile iki kere çalkalanarak fazla kan uzaklaştırıldı ve alınan materyal 100 mm'lik kültür kabına aktarıldı. Otoklavlanmış, steril penset yardımıyla plasenta ayrıldı ve yine HBSS içeren falkon tüpünde iki kere yıkandı. Bu aşamadan sonra hem mekanik, hem de enzimatik olarak dokunun parçalanması ve içerisindeki hücrelerin serbestleştirilmesi hedeflendi. Bu amaçla, 100 mm'lik kültür kabına alınan plasenta, burada steril bistüri ile zarlarından ayrıldı ve koryonik villuslar bistüri yardımıyla mümkün olduğunca küçük parçalara kesildi. Üzerine 1ml HBSS eklenerek parçalama işlemine devam edildi. Parçalara ayrılmış plasenta 50 ml'lik falkon tüpüne aktarıldıktan sonra, 100 mm'lik kültür kabı 4 ml Hof-Digest enzim solüsyonu ile yıkanarak plasentaya ait kalan parçalar toplandı ve HBSS içindeki parçalanmış plasentanın üstüne eklendi. Böylece 50 ml'lik falkon tüpünde plasenta içeren 5ml enzim solüsyonu olmuş oldu. Bu tüp, 37 °C' deki su banyosunda 15 dakikada bir vortekslenerek 1 saat 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, üstüne 5 ml Hofbauer- Besiyeri eklenerek enzimin etkisi ortadan kaldırılmış oldu ve +4 °C'de 1600 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan çökelti (pellet) korunarak, üstte kalan sıvı (süpernatant) vakumlu emici ile emilerek atıldı. Bu aşamadan sonra 4 farklı yöntem izlendi.

3.5.1.1. Yapışma ile Hücre Ayırıştırma Deneyi (Attachment Assay)

Hofbauer hücrelerinin ayırıştırılmasını hedefleyen bu yöntem; farklı hücrelerin plastik yüzeye yapışma, bağlanma özelliklerinin ve sürelerinin farklı olması esasına dayanan bir hücre ayırıştırma yöntemidir.

Plasental hücrelerin enzimatik olarak açığa çıkarılmalarının ardından santrifüj edilerek çöktürülen hücreler, 1 ml Serumsuz Hofbauer-Besiyeri ile resüspansiye edildi.

Üzerine 1ml daha aynı besiyerinden eklenerek hücrelerin agregat oluşturması önlenildi. 2 ml'lik hücre süspansiyonu, altına 100 mm'lik kültür kabı konmuş, 70 µm'lik demir elekten geçirildi ve bu boyuttan daha büyük hücreler eleğe takılı kalarak aşağıya geçen hücre süspansiyonundan elenmiş oldu. Eleğin üstü, ek olarak 1 ml daha Serumsuz Hofbauer-Besiyeriyle yıkandı ve bu şekilde üstte takılı kalmış, ama geçmesi gereken hücreler aşağıdaki kültür kabına geçti. 100 mm'lik kültür kabındaki 3 ml'lik hücre süspansiyonu iyice karıştırılarak ve fazla bekletmeden (kültür kabına hücrelerin yapışmasının önlenmesi için), kuyucuk başına 500 µl olacak şekilde, 24-kuyucuklu kültür kabının 6 kuyucuğuna ekildi ve 37 °C'de %5'lik CO₂'li inkübatörde 2 veya 24 saat inkübe edildi. Serumsuz Hofbauer-Besiyeri, diğer plasental hücrelerin kültür kabına yapışmasını önlemek amacıyla kullanıldı. 2 saat inkübasyonun sonunda canlı olmayan ve kültür kabına tutunmamış hücreler 2 kere PBS ile yıkanarak kültür ortamından uzaklaştırıldı. Kültür kabına yapışık kalan Hofbauer hücreleri üzerine serum içeren Hofbauer-Besiyeri eklendikten sonra hücreler, 2 günde bir besiyerleri tazelenmek suretiyle 37 °C'de %5'lik CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.

Bir diğer yaklaşımda, yapışmayan hücreler pipetle çekilip 24 kuyucuklu kültür kabinin boş kalan diğer kuyucuklarına alınarak bu hücrelerin hangi hücreler olduğunun belirlenmesi için kullanıldı.

3.5.1.2. Fikol ile Yoğunluğa Bağlı Gradient Santrifügasyonu ve Ardından Yapışma Deneyi

Bu deneyde hücrelerin bir gradient içinde santrifüjlenerek, boyutları ve ağırlıklarına göre ayrıştırılmaları hedeflendi.

Plasental hücrelerin enzimatik olarak açığa çıkarılmalarının ardından santrifüj edilerek çöktürülen hücreler, 1 ml Hofbauer-Besiyeri ile resüspansiyeye edildi. Üzerine 1 ml daha aynı besiyerinden eklenerek hücrelerin agregat oluşturması önlenildi. 2 ml'lik hücre süspansiyonu, altına 100 mm'lik kültür kabı konmuş, 70 µm'lik demir elekten geçirildi ve bu boyuttan daha büyük hücreler eleğe takılı kalarak aşağıya geçen hücre süspansiyonundan elenmiş oldu. Eleğin üstü, ek olarak 3 ml daha Hofbauer-Besiyeriyle yıkandı ve bu şekilde üstte takılı kalmış, ama geçmesi gereken hücreler aşağıdaki kültür kabına geçti. 15 ml'lik falkon tüpüne 4 ml Fikol-Histopak konduktan sonra, çok yavaş ve dikkatli bir şekilde 5 ml'lik hücre süspansiyonu Fikol-Histopak'a karıştırılmadan üste eklendi. Tüpün ağzı kapadıldıktan sonra +4 °C'de 800 g'de 30 dakika fren kullanılmadan santrifüj edildi. Fikol-Histopakla gradient santrifüjü sonunda en altta eritrositler ve ölü hücrelerin bulunduğu bir faz, makrofajların bulunduğu opak bir ara faz ve en üstte diğer hücrelerin bulunduğu bir üst faz oluştu. Ortada oluşan opak interfaz pipet yardımıyla çekilip 50 ml'lik temiz bir falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine eşit miktarda PBS eklenerek +4 °C'de 700 g'de 15 dakika fren kullanılmadan santrifüj edilerek yıkandı ve Fikol-Histopak kalıntıları uzaklaştırıldı. Üstte kalan süpernatant atıldıktan sonra PBS ile yıkama işlemi ikinci kere tekrarlandı ve süpernatant atıldıktan sonra pelleti oluşturan hücreler yapışma işlemi için 2 ml serumsuz Hofbauer-Besiyeriyle resüspansiyeye edildi ve

kuyucuk başına 500 µl olacak şekilde, 24-kuyucuklu kültür kabının 4 kuyucuğuna ekilerek 37 °C’de %5’lik CO₂’li inkübatörde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür kabına tutunmamış hücreler 2 kere PBS ile yıkanarak kültür ortamından uzaklaştırıldı. Kültür kabına yapışık kalan Hofbauer hücreleri üzerine serum içeren Hofbauer besiyeri eklendikten sonra hücreler, 2 günde bir besiyerileri tazelenmek suretiyle inkübe edildi.

3.5.1.3. Önce Fikol Ardından Perkol ile Yoğunluğa Bağlı Gradient Santrifügasyonu Deneyi

Plasental hücrelerin enzimatik olarak açığa çıkarılmalarının ardından santrifüj edilerek çöktürülen hücreler resüspansiyeye edildi, metal elekten geçirildi ve yukarıda anlatılan şekilde Fikol-Histopak ile gradient santrifüjüne tabi tutuldu. Ara fazdaki makrofajlar toplandıktan sonra 2 kere PBS ile yıkandı ve en son santrifüjden sonra çöktürülen hücreler 2 ml %100 Perkol ile resüspansiyeye edildi. Bu arada %30, %40, %50 ve %60’lık Perkol gradientleri Hofbauer-Besiyeri ile Perkolün seyreltilmesi ile oluşturuldu. Daha sonra 50 ml’lik Falkon tüpünün en altına hücreleri içeren %100’lük 2 ml Perkol kondu. Üstüne de sırasıyla azalan yüzdelerdeki perkol solüsyonları (2ml) en üstte %30’luk perkol olacak şekilde yavaşça kondu. +4 °C’de 1500 g’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan 4 faz dikkatlice toplandı ve 2 kere PBS ile santrifüjlenerek yıkandı. Üstte kalan süpernatant atıldıktan sonra pelleti oluşturan hücreler yapışma işlemi için 2 ml Serumsuz Hofbauer-Besiyeriyle resüspansiyeye edildi ve kuyucuk başına 500 µl olacak şekilde, 24-kuyucuklu kültür kabının 4 kuyucuğuna ekilerek 37 °C’de %5’lik CO₂’li inkübatörde inkübe edildi. Hücreler, Hofbauer besiyeri içinde, 2 günde bir besiyerileri tazelenmek suretiyle inkübe edildi.

3.5.1.4. “Accuspin Histopak” Sistemi ile Santrifügasyon Deneyi

“Accuspin Histopak” sistemi, üreticinin tavsiyesi doğrultusunda, önce karanlık ortamda oda ısısına getirildi ve aynı Fikol-Histopak yöntemindeki gibi, hazırlanan hücre süspansiyonu bu sefer “Accuspin Histopak” filtresinin üzerine yavaşça eklendi. Tüpün ağzı kapadıldıktan sonra +4 °C’de 800 g’de 30 dakika fren kullanılmadan santrifüj edildi. Santifügasyon sonunda filtrenin üstünde kalan kısım yeni bir falkon tüpüne aktarılarak 2 kere PBS ile yıkandı ve kültüre edildi.

3.5.2. Hücre Karakterizasyonunun Yapılması

Hücre karakterizasyonu ve hücre sayımı için, izole edilen hücreler 24 kuyucuklu kültür kaplarında iki günde bir besiyeri değiştirilmek suretiyle en fazla 1 hafta kültüre edildi. Hücreler ilk ekildikten 2 gün ve 7 gün sonra tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu. Hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri aspire edildi ve kuyucuklar steril PBS’le 2 kere yıkanarak hücre atıkları ve ölü hücreler uzaklaştırıldı. Daha sonra kültür kabının içine %0.05 Trypsin-EDTA eklenip 10-15 dakika 37 °C’lik CO₂’li inkübatör içerisinde hücrelerin kalkması beklendi. Sonrasında kalkan tüm hücreler bir falkon tüpünde toplandı ve üzerine Hofbauer-Besiyerinden eşit miktar eklendikten sonra 1600 rpm’de

10 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyon sonunda hücrelerin oluşturduğu pellete dokunmadan, üstteki süpernatant atıldı. Pelletin üzerine taze Hofbauer-Besiyerinden 2 ml eklendikten sonra pipetle hücrelerin homojenize olması sağlandı. Daha sonra bu karışımdan 10 µl alınarak eşit hacimde tripan mavisi ile karıştırıldı ve hemasitometrede karanlık alan mikroskobu altında canlı hücreler sayıldı. Sayım işleminden sonra hücre süspansiyonu 8 kuyucuklu cam lamlara (chamberslide) eşit miktarlarda ekildi. Hücreler bu lamlara tutunmaları için 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün hücrelerin besiyeri değiştirildi ve bir sonraki gün ise kuyucukların içerisindeki besiyeri aspire edildi, 2 kere PBS ile yıkandı ve Metanol-Aseton karışımı ile aşağıda tarif edilen şekilde fiks edilerek immünositokimya ve immünofluoresan için hücre içeren lamalar hazırlandı.

İzole edilen hücrelerin karakterlerine göre ayrımının yapılması için, immünositokimya tekniklerine paralel olarak elektron mikroskop tekniği ile ince yapı (ultrastrüktürel) düzeyinde de hücrelerin karakterizasyonu yapıldı.

3.5.2.1. İmmünositokimya Yöntemi

Hücre kültüründe izole edilen hücreler 8 kuyucuklu chamberslide adı verilen özel lamlara alındı. Ardından hücrelerin kökeninin belirlenmesi ve Hofbauer hücre izolasyonunun başarısını ölçmek için hücreler CD68, CD14 (Hofbauer hücre belirteçleri), Sitokeratin-7 (CK-7; trofoblast belirteci) ve CD34 (endotelial hücre belirteci) ile immünofluoresan olarak işaretlendi.

Kullanılan Malzemeler:

- **Fiksatif:** 1:1 (hacimce), Metanol (Merck)-Aseton (Merck) karışımı
- **Permeabilizasyon (Geçirgenlik) Solüsyonu:** %1 Triton X-100 (#T8787; Sigma) içeren PBS
- **PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat tamponlu tuz) Solüsyonu:**
7.2 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
0.8 gr KH_2PO_4 (Merck)
16 gr NaCl (Merck)
Yukarıdaki kimyasallar 2 litre bidistile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2 N NaOH ile pH=7.4 olacak şekilde ayarlandı.
- **Bloklama Solüsyonu:** Ultra V Block (#TA-125-UB; LabVision)
- **Antikor Dilüent Solüsyonu:** Large Volume UltraAb Diluent (#TA-125-UD; LabVision)

- **Kapatma Solüsyonu:** DAPI'li kapatma solüsyonu, VECTASHIELD® HardSet™ Mounting Medium with DAPI (#H-1500; Vector Labs)

Gözlem:

- **Fluoresan Mikroskobu:** Olympus BX61

Hücreleri içeren lamaların kuyucukları içindeki besi yeri çekilerek kuyucuklar iki kere PBS ile yıkandı. Ardından kuyucuklar lamdan özel bir aygıt ile ayrıldı ve hücreleri içeren lamalar, önceden soğutulmuş ve bire bir oranında hazırlanmış metanol-aseton fiksatifine konularak 5 dakika +4 °C'de tespit edildi. Lamalar, önce 5 dakika PBS ile yıkandı ve zar geçirgenliğinin sağlanması için 5 dakika %1 Triton X-100 içeren PBS içinde inkübe edildi ve ardından tekrar 5 dakika PBS ile yıkandı. Sonra, özgül olmayan bağlanmaları bloke etmek için bloklama solüsyonu ile oda ısısında 10 dakika bekletildi. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak, örnekler üzerine primer antikorlar eklendi ve oda ısısında 2 saat nemli ortamda inkübe edildi. Negatif kontrol olarak, primer antikorlar ile aynı konsantrasyonda olmak üzere, uygun izotip kontrol antikorları veya bunları içeren serum kullanıldı. İnkübasyon süresi sonunda, PBS ile 3 defa 5'er dakikalık yıkamaların ardından lamalar üzerindeki örnekler floresan işaretli sekonder antikor (eşek-anti fare Alekxa 555 sekonder antikor; İnvitrogen) ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Takip eden PBS yıkamalarından sonra kesitlerin üzeri DAPI'li kapatma solüsyonu damlatılarak kapatıldı ve floresan mikroskobunda boyanmalar değerlendirildi.

Primer antikorlar, negatif kontrol ve sekonder antikorlar ve bunlara ait dilüsyon oranları Çizelge 3.5.2.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.5.2.1. İmmünofluoresan deneyinde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve izotip kontroller.

PRİMER ANTİKOR	KATALOG NO	DENEY	DİLÜSYON	SEKONDER ANTİKOR	İZOTİP KONTROL
CD68	#M0814 Dako	İmmünositokimya (immünofluoresan)	1/50	FITC #FI-2000 Vector Labs	Fare IgG
CD34	#M7168 Dako	İmmünositokimya (immünofluoresan)	1/25	FITC #FI-2000 Vector Labs	Fare IgG
CK-7	#MS-1352- P1 NeoMarkers	İmmünositokimya (immünofluoresan)	1/100	FITC #FI-2000 Vector Labs	Fare IgG
CD14	#M0825 Dako	İmmünositokimya (immünofluoresan)	1/25	FITC #FI-2000 Vector Labs	Fare IgG

3.5.2.2. İzole Edilen Hücrelerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile İncelenmesi

Kullanılan Solüsyonlar ve Malzemeler:

- **0.2M Kakodilat Tamponu (pH=7.4):**
 - 21.4 gr Sodyum Kakodilat ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2 \text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (# K39245056838; Merck)
 - 100 ml distile suda eritildi.
 - pH=7.4 oluncaya kadar 0.2 N HCl katıldı.
 - Toplam hacim 400 ml oluncaya kadar distile su ile tamamlandı.
- **0.1M Kakodilat Tamponu (pH= 7.4):**
 - 100 ml 0.2 M Kakodilat tamponuna eşit miktarda distile su katıldı.
 - pH, 0.2 N HCl ile ayarlandı.
- **%2.5'lik Glutaraldehid solüsyonu (0.1M Kakodilat tamponu içinde):**
 - 50 ml 0.1 M Kakodilat tamponu
 - 5 ml %25'lik Glutaraldehid (#G003;TAAB)
- **%1'lik Ozmiyum Tetroksit (OsO_4)**
 - 10 ml 0.2 M Kakodilat tamponu
 - 0.1 gr OsO_4 (#O017; TAAB)
- **%2 Agar (BIOS)**
 - 0.1 gr Agar
 - 5 ml distile su
- **%1'lik Uranil Asetat**
 - 100 ml %75 Etanol
 - 1 gr Uranil Asetat (Merck)
- **Propilen Oksit (#P201; TAAB)**
- **Araldit Ana Karışımı:**
 - 91 ml Araldit CY 212 (R1040; Agar Scientific)
 - 84 ml DDSA (Dodecenyl Succinic Anhydride, #13170; Electron Microscopy Sciences)
- **Araldit Rezin:**
 - 50 ml Araldit Ana Karışımı
 - 1 ml BDMA (Benzylidimethylamine, #11400; Electron Microscopy Sciences)

- **%1’lik Toluidin Mavisi**
 - 1 gr Toluidin Mavisi (Merck)
 - 1 gr Boraks (Merck)
- **Ultramikrotom:** UCT125 Leica Ultramicrotome

Gözlem:

- **Geçirimli Elektron Mikroskobu:** Zeiss Leo-906E TEM

Hücreler hem izole edilir edilmez, hem de kültüre edilip tripsinizasyon ile kaldırıldıktan sonra TEM incelemeleri için takip edildi.

Hofbauer besiyeri içindeki hücre süspansiyonu 1000 rpm’de oda ısısında 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant pipetlenerek atıldı, pellet 1 ml 0.1 M Kakodilat tamponu içinde resüspansiyeye edildikten sonra 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, pellet bu sefer %2.5’luk glutaraldehid içinde resüspansiyeye edildi ve hücreler oda ısısında 20 dakika tespit (fiksasyon) için bırakıldı. Fiksasyonu süresi dolunca hücreler tekrar santrifüj edildi ve süpernatant atılarak hücreler 2 kere santrifüjlenerek 0.1 M Kakodilat tamponu ile yıkandı. Oluşan pellet %1’lik OsO₄ içinde oda ısısında 1 saat post-fiksasyona bırakıldı. Post-fiksasyon sonunda hücreler tekrar santrifüjlendi ve pellet 0.2 M Kakodilat tamponu ile 2 kere yıkandı. Son yıkamanın ardından çöktürülen hücreler %2’lik agar içinde resüspansiyeye edildi ve ardından santrifügasyona tabi tutuldu. Agar donduktan sonra ependorf tüpünden hücreler zarar görmeyecek şekilde çıkartıldı ve hücreleri içeren agarın uç kısmı TEM’de takip edilmek üzere küçük parçalara ayrıldı. Bu parçalar daha sonra, artan %30, %50, %70’lik etanol serilerinden 2 kere 10’ar dakika geçirildi ve agar parçaları %70’lik etanol içerisinde +4 °C’de gece boyu bırakıldı. Hücreleri içeren agar parçaları ertesi gün %70’lik alkolden çıkarılarak %1’lik uranil asetat solüsyonu içinde yarım saat oda ısısında bekletildi. Bu aşamadan sonra hücre barındıran agar parçaları, %85, %95, %100’lük etanol serilerinden 2 kere 10’ar dakika geçirildi ve ardından propilen oksit içinde 10 dakika tutuldu. Daha sonra inklüzyon aşamasına geçildi ve agar parçaları sırasıyla, 2:1, 1:1 ve 1:2 oranındaki ”propilen oksit: Araldit rezin” karışımlarında 1 saat bekletildi. En son karışımda yine +4 °C’de gece boyu bırakıldı. Ertesi gün karışımdan çıkarılan parçalar 2 kere 1’er saat araldit rezin içinde bekletildi ve küçük kapsüller içine bu rezinle birlikte gömüldü. Kapsüller rezinin polimerizasyonu için 60 °C’de 48 saat bırakıldı. 48 saat sonunda elde edilen bloklar ultramikrotomda hücrelere ulaşıncaya kadar 300 nm’lik kalın kesitleri alınıp toluidin mavisi ile boyandı. Hücreler belirlendikten sonra ince kesitleri alındı ve kontrastlama sonrasında Zeiss Leo-906E geçirimli elektron mikroskobunda değerlendirildi.

3.5.3. İzole Edilen Hücrelerin Kültürü ve ELISA ile Anjiyogenez Deneyi İçin Yönlendirilmiş Besiyerinin Toplanması

İzolasyonu takiben, hücreler ertesi güne kadar 37 °C’de %5’lik CO₂’li inkübatörde kültüre edildi. Ertesi gün, besiyeri aspire edilerek yapışmayan diğer hücreler de temizlendi. Kuyucuklara 500 µl serumlu veya serumsuz Hofbauer-Besiyeri eklendi ve hücreler ELISA deneyleri için 12, 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda Hofbauer hücrelerinin salgıladıkları faktörleri içeren ”yönlendirilmiş besiyeri” 1,5 ml’lik steril ependorf tüplerine toplanarak +4 °C’de 5000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyonun sonunda oluşan süpernatant yeni steril ependorf tüplerine alındı ve -80 °C’de ELISA ve anjiyogenez deneyinde kullanılmak üzere saklandı.

3.5.4. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

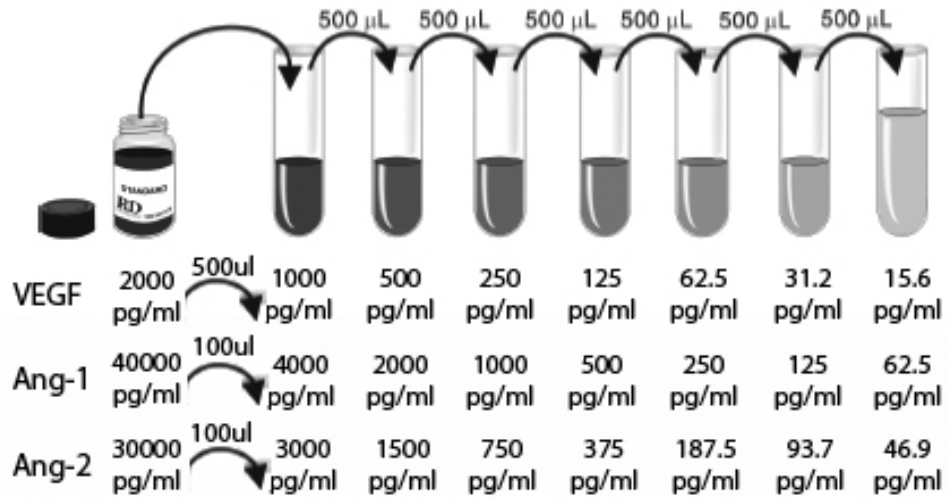
Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:

- **VEGF ELISA kiti (#DVE00; R&D Systems. Inc.)**
- **Ang-1 ELISA kiti (#DANG10; R&D Systems. Inc.)**
- **Ang-2 ELISA kiti (#DANG20; R&D Systems. Inc.)**
 - Kit içindekiler:
 - Monoklonal yakalayıcı (capture) antikorla (VEGF, Ang-1 veya Ang-2) kaplı 96 kuyucuklu test kabı
 - Konjugat = Peroksidazla (HRP) bağlı tespit edici (detection) monoklonal antikor (VEGF, Ang-1 veya Ang-2)
 - Rekombinant insan VEGF, Ang-1 ve Ang-2 standardı (toz)
 - Dilüent
 - Yıkama solüsyonu
 - Renk ajanı A: Hidrojen peroksit
 - Renk ajanı B: kromojen (tetramethylbenzidine)
 - Reaksiyon durdurma solüsyonu: 6 ml, 2 N sülfirik asit
- **µQuant BioTek Spektrofotometre**

İzole edilen Hofbauer hücreleri belirli süreler ile serumlu veya serumsuz Hofbauer-Besiyeriyle inkübe edildi ve hücrelerin salgıladıkları faktörleri içeren ”yönlendirilmiş besiyeri”, bu faktörlerden bazılarının belirlenmesi için ELISA yöntemi ile test edildi. Her bir anjiyogenik faktör için ELISA testi, karışıklığın önlenmesi ve

işlemin uzun sürmesi nedeniyle ayrı ayrı günlerde yapıldı. Her bir faktör için test edilen yönlendirilmiş besiyeri aynı gün, aynı şartlarda test edildi.

Örnekler -80 °C'deki derin dondurucudan çıkarıldı ve buz üstünde erimeleri beklendi. VEGF, Ang-1 ve Ang-2 ELISA kitleri üreticinin tavsiyesi doğrultusunda oda ısısına getirildi. Konsantre halde gelen yıkama solüsyonu ve dilüent, sırasıyla 1/25 ve 1/5 oranında sulandırıldı. Sonrasında VEGF, Ang-1 ve Ang-2 standartları hazırlandı. Toz halindeki standartlar 1000 µl distile su ile çözüldü. Yedi ayrı ependorf tübünden ilkinde 900 µl, diğerlerine 500 µl dilüent kondu. Ang-1 ve Ang-2 standardından 100 µl alınarak ilk ependorf tüpüne eklendi. VEGF için ilk tüpe de diğerleri gibi 500 µl kondu ve VEGF standardından 500 µl alınarak ilk ependorf tüpüne eklendi. Böylece standartlar ilk ependorf tüpünde 1/10 oranında seyreltilmiş oldu. Daha sonra bu seyreltilen standard solüsyonundan 500 µl alınarak içinde 500 µl dilüent olan ikinci ependorf tüpüne kondu. Böylece standard 1/2 oranında seyreltilmiş oldu. Standard bundan sonra son tüpe kadar bu şekilde 1/2 oranında seyreltilti. Böylece her tüpte bir öncekinin yarısı oranında standard konsantrasyonu oluştu (Şekil 3.5.4.1). Her kuyucuğa hangi örneğin ve hangi standardın konacağı önceden belirlendi ve kayıt edildi. Her örnek ve standard ikiyeşli olarak çalışıldı.



Şekil 3.5.4.1. ELISA standartlarının hazırlanması (R&D Systems VEGF, Ang-1 ve Ang-2 kataloğundan modifiye edildi).

Standardlar, örnekler, dilüent ve yıkama solüsyonu hazırlandıktan sonra ELISA testi için aşağıdaki basamaklar uygulandı:

1. ELISA kabındaki her kuyucuğa VEGF ELISA için 50 µl, Ang-1 ve Ang-2 ELISA için 100 µl dilüent kondu.

2. Standardlar ve örneklerden (Hofbauer yönlendirilmiş besiyeri) VEGF ELISA için 200 µl, Ang-1 ve Ang-2 ELISA için 50 µl, önceden planlanan yerlerine konuldu. Negatif kontrol kuyucuklarına sadece dilüent konuldu.
3. 2 saat oda ısısında inkübe edildi. Bu aşamada eğer Hofbauer hücreleri bulundukları besiyerlerine VEGF, Ang-1 veya Ang-2 salgıladılarsa, yani yönlendirilmiş besiyerinde bu faktörler varsa, kuyucuklar içinde kendilerine ait yakalayıcı antikorlara yapıştılar.
4. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki sıvı döküldü ve yıkama solüsyonundan her seferinde 400 µl koymak ve ardından dökmek suretiyle 3 kere yıkandı. Son yıkamadan sonra havlu kağıdına ters çevirip vurarak kuyucuklarda yıkama solüsyonu kalmamasına özen gösterildi.
5. Kuyucukların kurumasına izin vermeden bu sefer tüm kuyucuklara 200 µl konjugat (HRP bağlı belirleyici antikor) eklendi ve 2 saat oda ısısında inkübe edildi. Konjugat, VEGF, Ang-1 veya Ang-2'yi yakalayıcı antikorun bu faktörlere bağlandığı epitoptan farklı bir epitopuna bağlanabildiği için, faktörler iki antikor arasında tutulmuş oldu.
6. İnkübasyon sonunda yine yıkama solüsyonu ile kuyucuklar 3 kere yıkandı. Son yıkama sırasında, kuyucuklarda yıkama solüsyonu varken, renk ajanı A ve B karıştırılarak taze "sübrat solüsyonu" hazırlandı. Son yıkamadan sonra kuyucuklar boşaltıldı.
7. Tüm kuyucuklara 200 µl sübrat solüsyonu eklendi. Oda ısısında ve karanlıkta VEGF ELISA için 20 dakika, Ang-1 ve Ang-2 ELISA için 30 dakika inkübe edildi. Sübrat solüsyonu, konjugata bağlı HRP enziminin sübratı olduğundan, bu aşamada mavi bir renk oluşumu gözlemlendi.
8. İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltılmadan üzerilerine 50 µl reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi ve kuyucuklar içinde sarı renk oluştu. Kuyucuklar iyice karıştırılarak 30 dakika içinde µQuant BioTek Spektrofotometre cihazında 450 nm dalga boyunda, 540 nm referans dalga boyunda okutuldu.

3.5.5. HUVEC İzolasyonu ve Kültürü

Göbek kordonundan klemplenerek gelen term plasenta biyolojik kabin içine alındı ve göbek kordonu kesildi. İnce bir kanül yardımıyla göbek kordonunun venine girildi ve kanülün kaymasını önlemek amacıyla göbek kordonunun ucunun yaklaşık 1cm altından bağlandı. Kanülden içeriye %1 oranında antibiyotik içeren HBSS verilerek, kordonun içindeki kan, bağlı olmayan diğer uçtan akıtıldı. Yıkama işleminden sonra endotel hücreleri ayrıştıracak olan enzim solüsyonu kanül içinden verildi. Enzim solüsyonu alttaki bağlı olmayan uçtan gelmeye başlayınca, göbek kordonunun alt ucu da sıkıca bağlandı. Alt uç ta bağlandıktan sonra kanül ile damarın içine yaklaşık 15-20 ml (aldığı kadar) enzim enjekte edildi. Göbek kordonu uçlarından tutularak 15 dakika, 37 °C'deki su banyosunda enzim ile muamele edildi. 15 dakika sonunda, damarın bağlı olan kanülsüz alt ucundaki ip kesilerek hücreleri içeren enzim solüsyonu steril bir falkon tüpünde toplandı. Üzerine 10-15 ml endotelial hücre büyüme besiyeri eklendikten sonra, 800 rpm de, 20 °C'de 7 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı, hücreler

endotelyal hücre büyüme besiyerinde resüspansiye edildi ve 25 cm²'lik yüzeye sahip kültür kaplarında 37 °C'de %5'lik CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.

3.5.6. Anjiyogenez Deneyi

Anjiyogenez deneyi için, ilkin izole edilen HUVEC hücreleri ve endotelyal büyüme besiyeri ile damar oluşumu için gerekli hücre sayısının bulunması amacıyla “hücre sayısı konsantrasyonu” deneyleri yapıldı. Yeterli HUVEC hücre sayısı belirlendikten sonra “Hofbauer hücresi-yönlendirilmiş besiyeri” ile HUVEC hücreleri ekstrasellüler matriks içinde kültüre edilerek damar oluşumları değerlendirildi (Şekil 3.5.6.1).



Şekil 3.5.6.1. Anjiyogenez testinin prensibi.

3.5.6.1. Anjiyogenez Deneyi için Uygun HUVEC Hücre Sayısının Belirlenmesi

Anjiyogenez deneyinde üç boyutlu damar oluşumunu sağlayacak ekstrasellüler matriks (ESM; laminin, kollajen tip IV, heparan sülfat proteoglikanları, entaktin ve nidojen içermektedir) buz üstünde eritilerek üretici firmanın protokolü doğrultusunda hazırlandı. Daha sonra bu ESM, soğutulmuş 96 kuyucuklu kültür kabının 16 kuyucuğuna 50'şer µl, 6 kuyucuğuna ise 30'ar µl olmak üzere yavaşça ve köpürmeden konuldu. Kültür kabının kapağı kapatıldı ve 37 °C'lik %5'lik CO₂'li inkübatör içerisinde 1 saat bekletilerek ESM'nin yoğunlaşması sağlandı. Bu bir saatlik süre içinde HUVEC hücreleri aşağıda anlatılan şekilde ekilmeye hazır hale getirildi.

HUVEC hücreleri kültür kabını %90 oranında kaplar hale geldiğinde hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri aspire edildi ve kuyucuklar steril PBS'le 2 kere yıkanarak hücre atıkları ve ölü hücreler uzaklaştırıldı. Daha sonra kültür kabının içine %0.25 Trypsin-EDTA eklenip 3 dakika 37 °C'lik %5'lik CO₂'li inkübatör içerisinde hücrelerin kalkması beklendi. Sonrasında kalkan tüm hücreler bir falkon tüpünde toplandı ve üzerine endotelyal büyüme besiyerinden eşit miktar eklendikten sonra 1600 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyon sonunda hücrelerin oluşturduğu pellete dokunmadan, üstteki süpernatant atıldı. Pelletin üzerine taze endotelyal büyüme

besiyerinden 2 ml eklendikten sonra pipetle hücrelerin homojenize olması sağlandı. Daha sonra bu karışımdan 10 µl alınarak eşit hacimde tripan mavisini ile karıştırıldı ve hemasitometrede canlı hücreler sayıldı. Sayım işleminden sonra hücre süspansiyonundaki hücre miktarı belirlendi. Hücreler endotelyal büyüme besiyeri ile sırasıyla kuyucuk başına 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 7500 ve 10000 hücre olacak şekilde seyreltilti. Her kuyucuğa bu çeşitli konsantrasyonlarda hücre içeren hücre süspansiyonundan 150 µl konuldu ve hücreler damar oluşumu için 37 °C'lik %5'lik CO₂'li inkübatör içerisinde saatte bir faz-kontrast mikroskobunda damar oluşumu açısından incelendi. Hücrelerin oluşturduğu yapılar aşağıdaki puanlama sistemine göre puanlandırıldı (Çizelge 3.5.6.1).

Çizelge 3.5.6.1. Damar tüp oluşumu paterninin değerlendirilmesi (Chemicon In Vitro Angiogenesis Kit kullanım kılavuzundan alıntıdır.).

Hücre Paterni	Puan
Dağınık ve bireysel hücreler	0
Hücreler göç etmeye ve sıraya girmeye başlamış	1
Kapiller tüpler belirgin. Tomurcuklanma yok	2
Yeni kapiller tomurcuklanma mevcut	3
Kapalı poligonlar oluşmuş	4
Kompleks ağısı yapı oluşmuş	5

3.5.6.2. Hofbauer Hücresi -Yönlendirilmiş Besiyeri ile Anjiyogenez Deneyi

HUVEC hücreleri ile yapılan anjiyogenez deneyinde belirlenen en uygun HUVEC hücre sayısı Hofbauer-yönlendirilmiş besiyeri ile anjiyogenez deneyine tabi tutuldu.

Daha önce de anlatıldığı gibi, üç boyutlu damar oluşumunu sağlayacak ESM, 96 kuyucuklu kültür kabına konuldu. Kültür kabı 37 °C'lik %5'lik CO₂'li inkübatör içerisinde 1 saat bekletilerek ESM'nin yoğunlaşması sağlandı. Bu bir saatlik süre içinde HUVEC hücreleri kuyucuk başına 4000 ve 5000 hücre olacak şekilde hazırlandı. Hücreler Hofbauer hücresi-yönlendirilmiş besiyeri içinde (200 µl) kuyucuklara eklendi. Kontrol olarak ise, endotelyal büyüme besiyeri, Hofbauer-Besiyeri, endotelyal bazal besiyeri kullanıldı. Hücreler saatte bir faz kontrast mikroskobunda damar oluşumu açısından incelenerek 24 saate kadar 37 °C'lik %5'lik CO₂'li inkübatörde kültüre edildi. Hücrelerin oluşturduğu yapılar puanlandırıldı (Çizelge 3.5.6.1).

3.6. İstatistiksel Analiz

Çiftli immünohistokimya deneylerinde damar yapıları ve Hofbauer hücrelerine ait sayımlardan elde edilen veriler Pearson'un korelasyon testi ile değerlendirildi. Hücre

izolasyonunun sonunda yapılan CD68 pozitif hücrelerin sayımından elde edilen veriler Kolmogorov–Smirnov testine göre normal dağılıma uyduğundan tek yönlü ANOVA (one way ANOVA) veya Student’s t Testi ile değerlendirildi. ELISA deneylerinden elde edilen veriler ise normal dağılıma uymadığından parametrik olmayan ANOVA testinin (Kruskal–Wallis test) ardından Student–Newman–Keuls testi kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel hesaplamalar Windows için SigmaStat sürüm 3.0 (Jandel Scientific Corp. San Rafael, CA) kullanılarak yapıldı. $p < 0.05$; istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

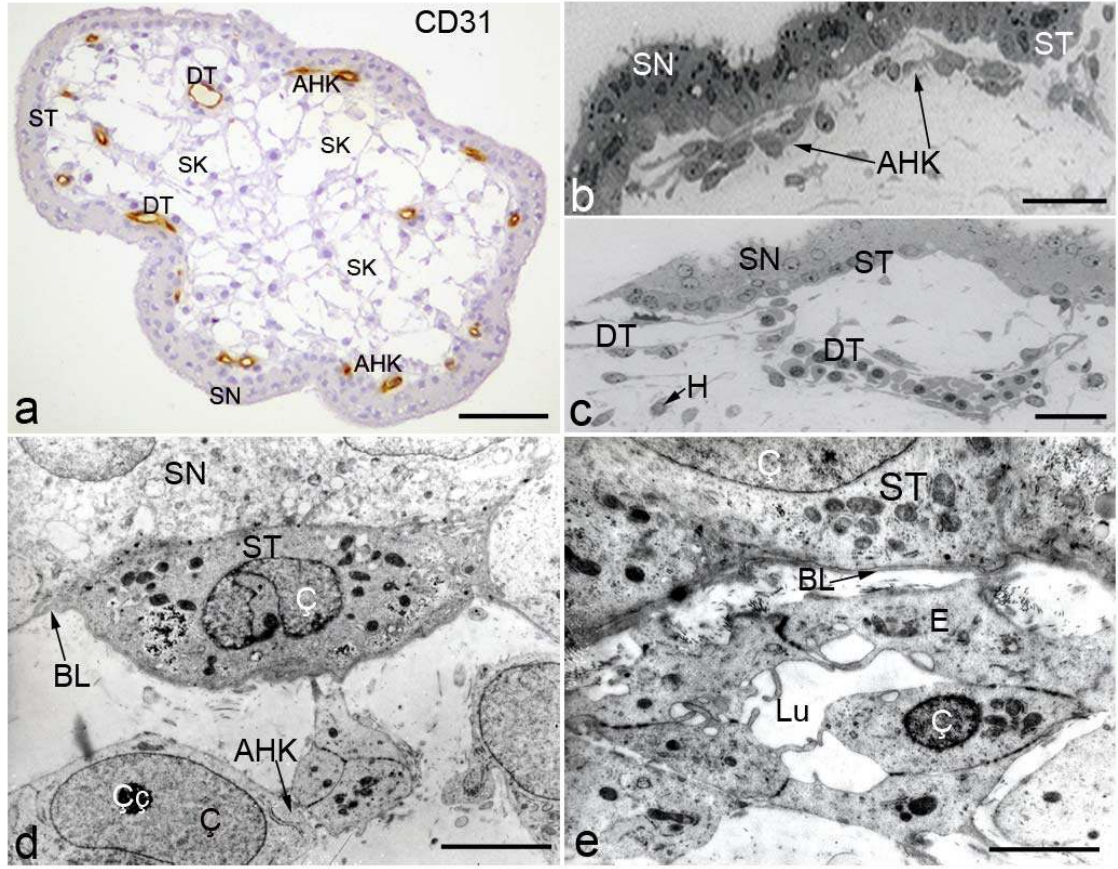
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Atatürk Devlet Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği ile bazı özel kliniklerden alınan plasenta doku örnekleri, immünohistokimya ve elektron mikroskop tekniğiyle incelendi. Plasentalardan Hofbauer hücreleri izole edilerek, muhtemel anjiyogenik özellikleri araştırıldı.

4.1. Erken Plasenta Örneklerinde Hofbauer Hücrelerinin Damar Yapıları ile İlişkisi

Hofbauer hücrelerinin plasental villus özünde (stromasında) damar yapıları olan anjiyogenik hücre kordonları (AHK) ve damar tüpleri (DT) ile ilişkilerini göstermek için CD68 ve CD31 ile çiftli immünohistokimya tekniği uygulandı.

4.1.1. CD31 ve CD68 ile Çiftli İmmünohistokimya Bulguları

İlk denemede, CD31 ile AHK ve DT'lerin yerleşimi incelendi. Mezenşimal villus (MV) ve immatür intermediyet villuslarda (İMİV) yerleşik CD31-immüno-pozitif AHK'ler ve DT'ler, stromada, hemen trofoblastik tabakanın altında ve villus eksenine paralel yerleşmekteydi (Şekil 4.1.1.a). Bu AHK'ler çeşitli şekillerde izlendi: lümen öncülü içeren veya içermeyen AHK'ler (Şekil 4.1.1.a-c), uzamış bir kutba sahip olan veya olmayan AHK'ler, ara bağlantı tüpleri içeren veya içermeyen AHK'ler. İnce yapı incelendiğinde bu AHK'lerin sitotrofoblastların bazal laminası ile ilişkili olduğu görüldü (Şekil 4.1.1.d, e)

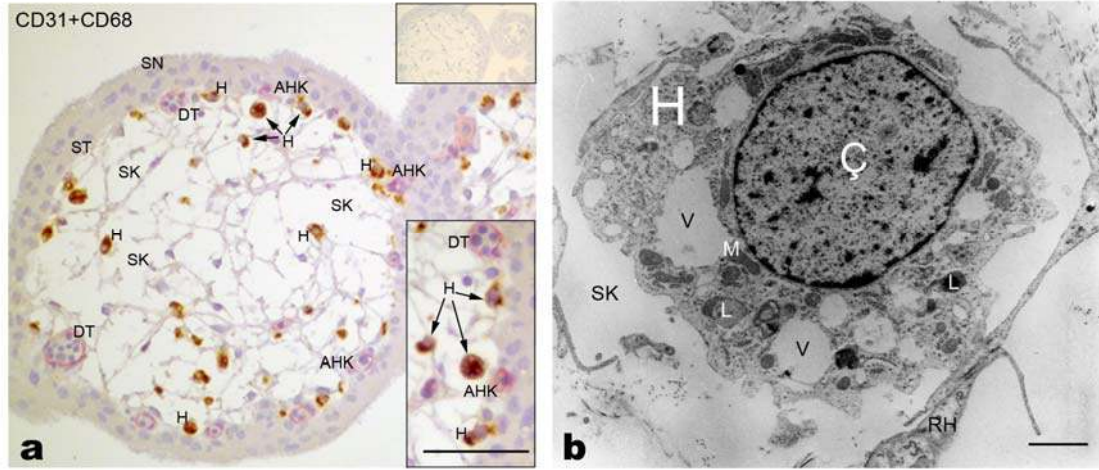


Şekil 4.1.1. IMIV kesidinde anjiyogenik hücre kordonlarının (AHK) ve damar tüplerinin (DT) yerleşimi. a) CD31 immüno-pozitif AHK ve DT'lerin daha çok, sitotrofoblastik tabakanın altında yerleştiği görüldü. b) Yarı ince kesitte sitotrofoblastik tabakanın altında yerleşen AHK'ler görülmektedir. c) Yarı ince kesitte sitotrofoblastik tabakanın altında yerleşen ve ilkel bir lümen içeren DT'ler görülmektedir. d) Elektronmikrograflarda AHK hücrelerinin sitotrofoblast bazal laminası (BL) ile yakın ilişkide olduğu görülmektedir. e) İMIV kesidine ait bu elektronmikrografta, ilkel lümen oluşumu izlenmektedir. ST: sitotrofoblast; SN: sinsisyotrofoblast; SK: stromal kanal; H: Hofbauer hücresi; BL: bazal lamina; E: endotel öncüsü; Lu: ilkel lümen; Ç: çekirdek; ÇÇ: çekirdekçik. Ölçekler: (a) 100 µm, (b, c) 50 µm, (d) 2.5 µm ve (e) 4 µm.

Çiftli immünohistokimya yapılarak incelen tüm plasenta örneklerinde, anjiyogenik hücre kordonları (AHK) ve ilkel damar tüpleri (DT) CD31 ile immüno-pozitif olarak boyanan yegane yapılarıdır. CD68, Hofbauer hücrelerinin sitoplazmalarında granüler bir boyanma şekli gösterdi (Şekil 4.1.2. iç resim a). Bu özel boyanma şeklinin nedeni; CD68 antikorunun, Hofbauer hücrelerinin lizozomal granülleri ile etkileşmesindendir.

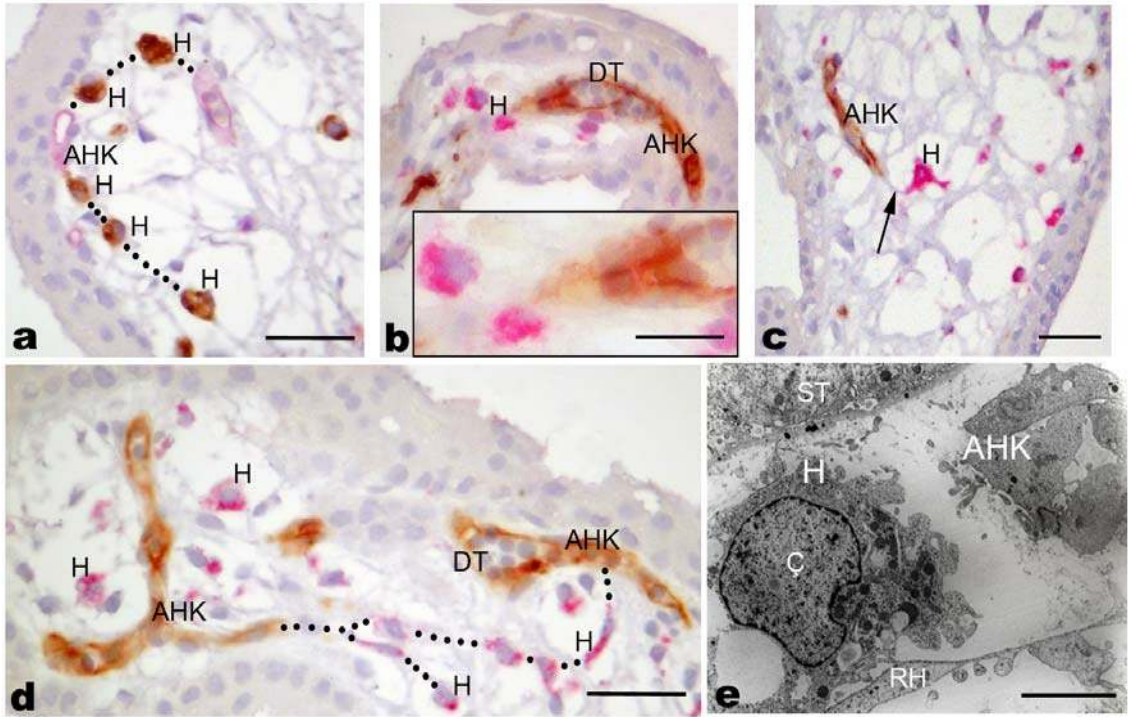
Çiftli immünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre; CD68-immünopozitif Hofbauer hücreleri plasental villus özünde, retikulum hücreleri tarafından oluşturulan

stromal kanallarda yerleşikti (Şekil 4.1.2.a). Bu plasental makrofajların özellikle yeni gelişmekte olan CD31-immüno pozitif AHK'ler ve DT'lere yakın yerleşmeleri dikkat çekiciydi (Şekil 4.1.2.a). Hofbauer hücrelerinin ince yapısına bakıldığında, bu hücrelerin sitoplazmaları farklı boyutta vakuoller içermesi nedeniyle köpüğümsü bir görüntü sergiledi (Şekil 4.1.2.b). Vakuollerin yanı sıra, sitoplazmada lizozomlar ve çubuk şekilli mitokondriyonlar izlendi.



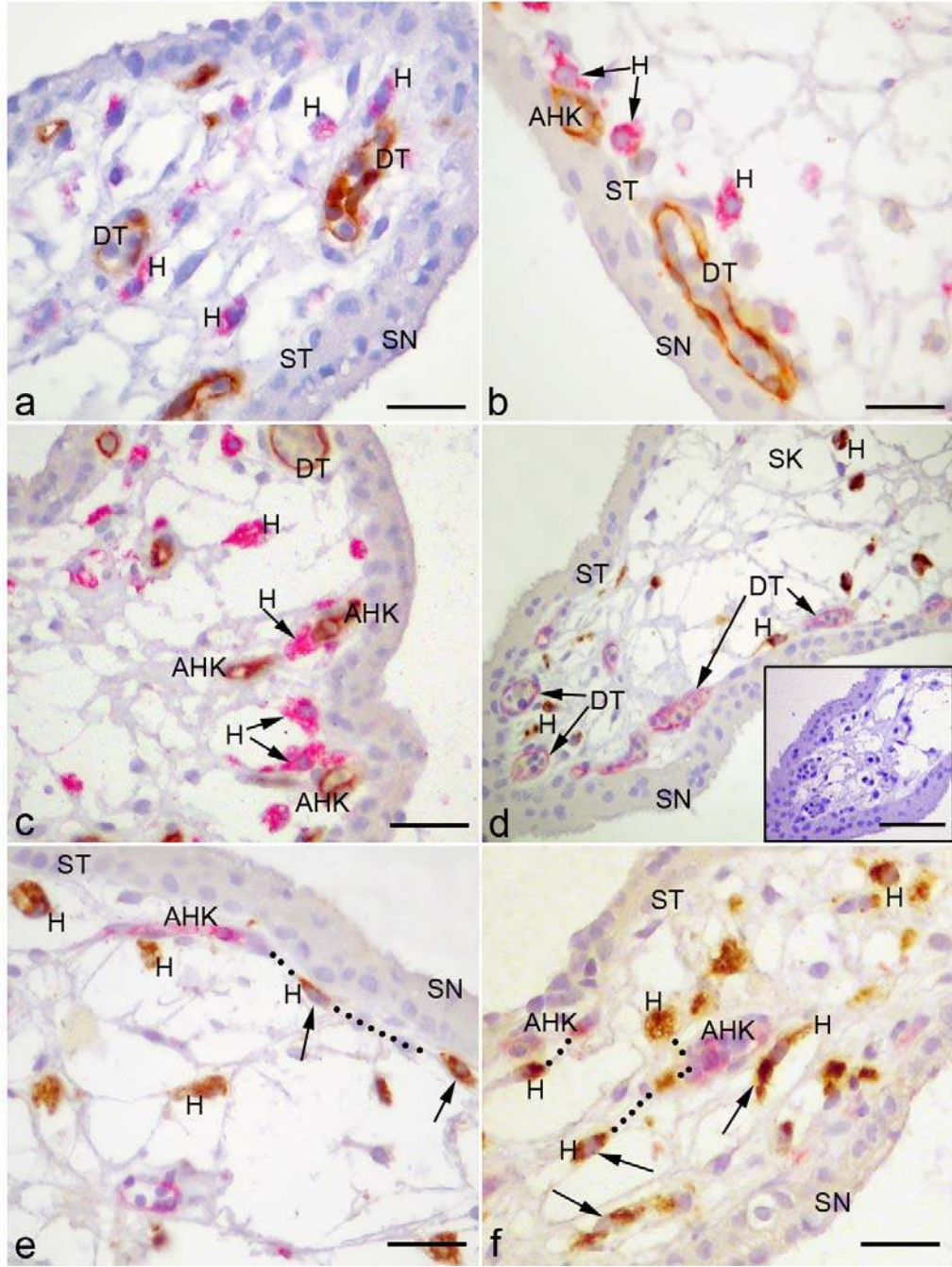
Şekil 4.1.2. CD31 ve CD68 ile yapılan çiftli immünohistokimya reaksiyonunun fotoğrafı ve Hofbauer hücrelerinin elektron mikrografı. a ve iç resim a) Hofbauer hücrelerinin (H) İMİV stromal kanalları içinde yerleştiği görülmektedir. Bu hücrelerin, özellikle trofoblastik tabakanın altında yer alan ve yeni gelişmekte olan AHK'ler ve DT'lere yakın konumlandığı izlenmektedir. b) Retikulum hücrelerinin oluşturduğu stromal kanal içine yerleşik bir Hofbauer hücrelerinin ince yapısı görülmektedir. ST: sitotrofoblast; SN: sinsiyotrofoblast; SK: stromal kanal; H: Hofbauer hücresi; RH: retikulum hücresi; V: vakuol; M: mitokondiyon; L: lizozom; Ç: çekirdek. Ölçekler: (a) 100 µm, (iç resim a) 75 µm ve (b) 4 µm.

Hofbauer hücreleri özellikle AHK'lerin uzama uçlarına (Şekil 4.1.3.a-c ve iç resim b) ve damar yapılarının dallanma noktalarına (Şekil 4.1.3.d) doğru bir yönelim sergilediler. Elektronmikroskopi incelemelerinde, ilkel bir lümen içeren AHK'ler ile Hofbauer hücrelerinin yakın ilişkide olduğu izlendi (Şekil 4.1.3.d).



Şekil 4.1.3. Hofbauer hücreleri ve damar yapıları arasındaki yakın ilişki görülmektedir. a) Hofbauer hücreleri (H), AHK'ler veya ilkel DT'lere doğru yönelerek, adeta yeni oluşacak damar yapılarına (noktacıklar) rehberlik etmektedirler. b ve iç resim b) İlkel bir lümen içeren AHK'ler ve bu yapıların uçlarına yanaşmış Hofbauer hücreleri görülmektedir. c) Bir Hofbauer hücresi (H), AHK ile sitoplazmik uzantısı aracılığıyla kontakt (ok) kurmaktadır. d) Hofbauer hücreleri (H) aynı zamanda yeni bir damar ağının kurulacağı dallanma/çatallanma alanlarına yakın (noktacıklarla gösterilmiş) yerleşmekteydiler. e) Hofbauer hücrelerinin AHK'lerle yakın ilişkisi ince yapı (ultrastrüktürel) düzeyinde de gözlemlendi. (a) şeklinde CD68-kahverengi, CD31-pembe; (b-d) şekillerinde CD68-pembe, CD31-kahverengi izlenmektedir. H: Hofbauer hücresi; AHK: anjiyogenik hücre kordonu; DT: ilkel damar tübü; RH: retikulum hücresi; ST: sitotrofoblast; Ç: çekirdek. Ölçekler (a-d) 5 µm, (iç resim b) 30 µm ve (e) 4 µm.

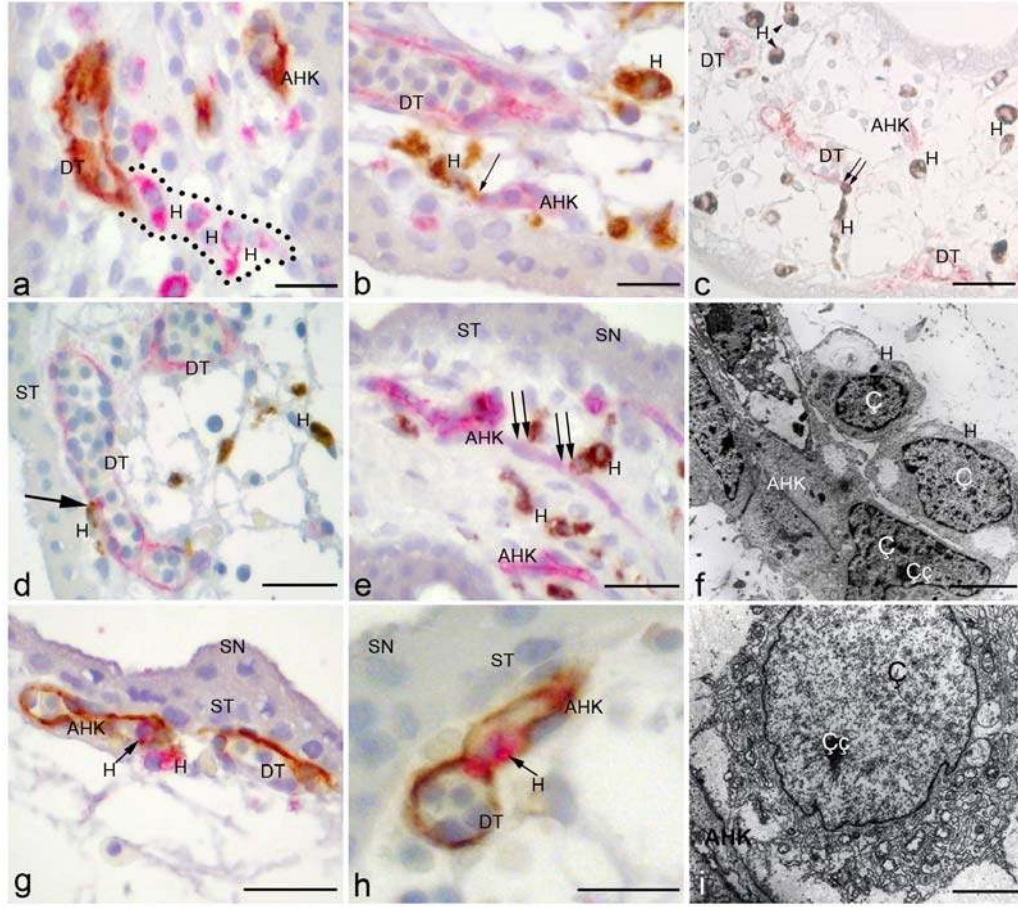
Hofbauer hücreleri AHK'lere ve ilkel DT'lere komşu yerleştikleri gibi (Şekil 4.1.4.a, b), iki damar yapısının arasında, adeta onları birbirlerine bağlar şekilde de yerleşmekteydiler (Şekil 4.1.4.c, d). Bazı Hofbauer hücreleri, damar yapılarına doğru uzanmak için klasik yuvarlak görünümünü yerine daha iğsi (fusiform) bir şekil sergilediler (Şekil 4.1.4.e, f).



Şekil 4.1.4. Hofbauer hücreleri, AHK'ler ve DT'lerle ilişkisinin şekline göre farklı özellikler ve yerleşimler sergilemektedir. a ve b) Hofbauer hücrelerinin (H) AHK'ler ve DT'lere çok yakın yerleştikleri ve c) iki AHK arasında yerleşebildikleri gibi, d) iki DT arasında da adeta onları birbirlerine bağlar şekilde yerleştikleri görülmektedir. e ve f) AHK veya DT'lere doğru yönelmiş (noktacıklar) Hofbauer hücrelerinin daha işçi şeklinde oldukları (ok) izlenmektedir. (a-c) şekillerinde CD68-pembe, CD31-kahverengi; (d-f) şekillerinde CD68-kahverengi, CD31-pembe izlenmektedir. H: Hofbauer hücresi; AHK: anjiyogenik hücre

kordonu; DT: ilkel damar tübü; SK: stromal kanal; ST: sitotrofoblast; SN: sinsisyotrofoblast. Ölçekler: (a-f) 50 µm ve (iç resim d) 100 µm.

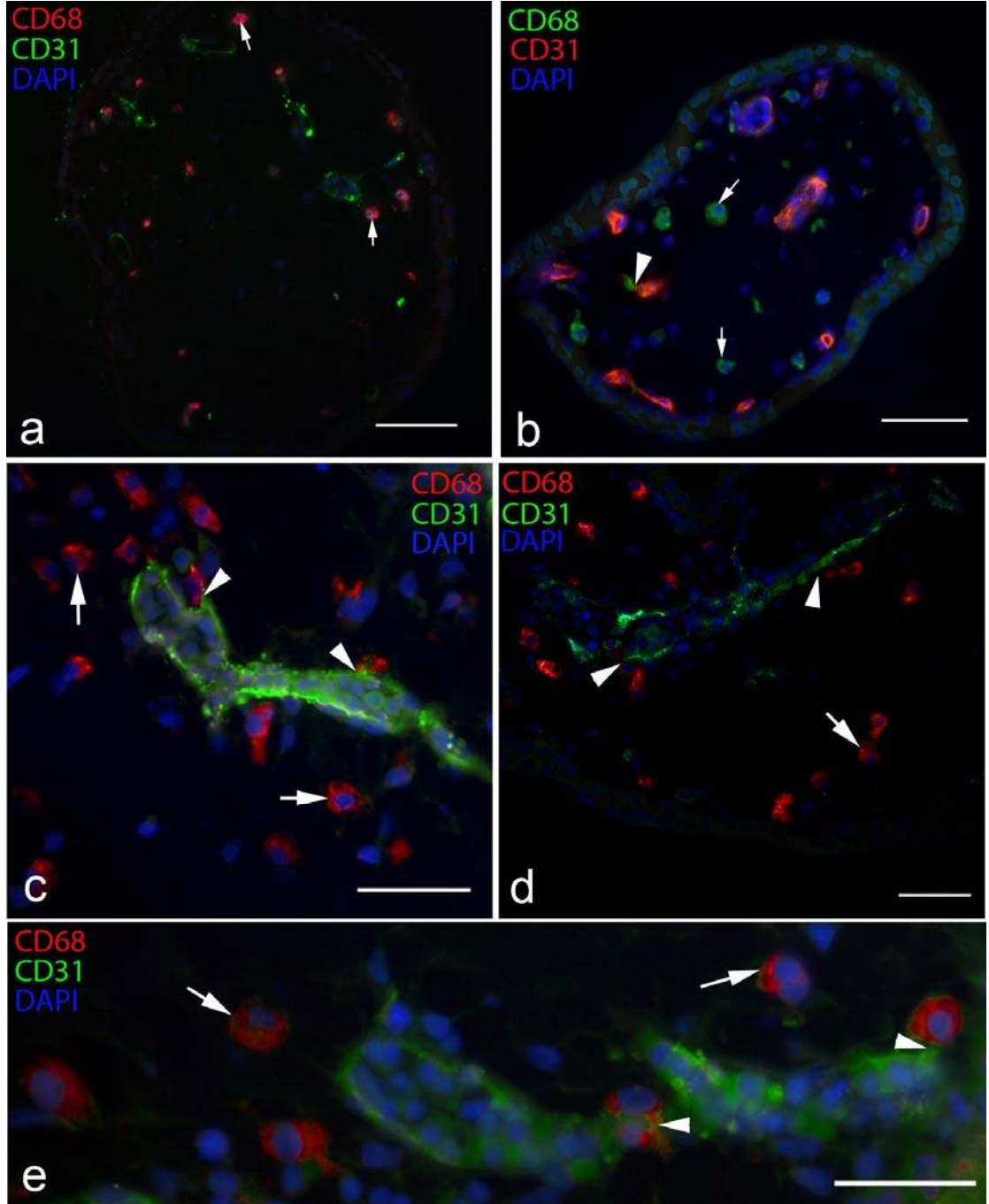
Çoğu İMİV stroma özünde Hofbauer hücrelerinin, damar yapılarının uzama yönlerine işaret eder şekilde dizildikleri (Şekil 4.1.5.a-c) ve bu şekilde dizilen Hofbauer hücrelerinin klasik yuvarlak şekilleri yerine, endotel hücreleri gibi uzamış bir şekil aldıkları gözlemlendi (Şekil 4.1.5.c-e). Hatta bazı Hofbauer hücrelerinin AHK'ler arasına girdiği ve ilkel DT oluşumuna katıldıkları gözlemlendi (Şekil 4.1.5.d-f). Bazı durumlarda Hofbauer hücrelerinin AHK'ler arasında ve hatta ilkel damar tüplerinin içine yerleştikleri gözlemlendi (Şekil 4.1.5.g-i).



Şekil 4.1.5. Hofbauer hücreleri damar oluşumuna adeta rehberlik etmektedir. a) Hofbauer hücrelerinin (H) birbirlerinin ardısına yerleşerek (noktalar), AHK'lere DT oluşumu sırasında adeta rehberlik ettikleri izlenimini vermektedirler. b) Ayrıca bu hücrelerin, AHK'lere (ok) ve c) DT'lere peşisıra takıldıkları gözlenmektedir (çift ok). d) Bu hücrelerin aynı zamanda damar duvarına (ok) ve e) AHK'ler arasında (çift ok) girdikleri de izlenmektedir. f) Elektronmikrograflarda da görüldüğü gibi bu hücreler AHK'lerle fiziksel kontaklar kurmaktadır. g-i) İlginç olarak, bu hücreler ilkel damar tübünün içinde de yer almaktadırlar. (a, g ve h) şekillerinde CD68-pembe, CD31-kahverengi; (b-e) şekillerinde CD68-kahverengi, CD31-pembe izlenmektedir. H: Hofbauer hücresi; AHK: anjiyogenik hücre kordonu; DT: ilkel damar tübü; SN: sinsisyotrofoblast; ST: sitotrofoblast; Ç: çekirdek; Çç: çekirdekçik. Ölçekler: (a, b, h) 50 µm, (c-g) 25 µm ve (f, i) 4 µm.

4.1.2. CD31 ve CD68 ile Çiftli İmmünofluoresan Bulguları

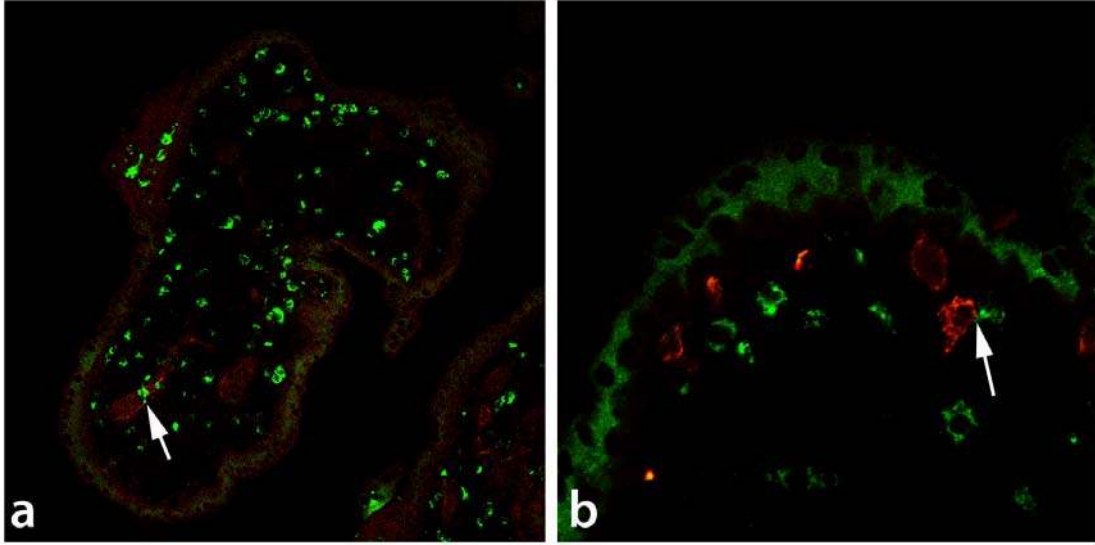
CD31 ve CD68 ile yapılan immünofluoresan boyama tekniği ile elde edilen bulgular immünohistokimya tekniğinden elde edilen bulgularımızla benzerdi (Şekil 4.1.2.1.a-e). Hofbauer hücrelerinin damar yapıları ile yakın ilişkilerine bağlı olarak İMİV özünde, merkezden ziyade trofoblastik tabakaya yakın yerleştikleri (Şekil 4.1.2.1.a), damar yapıları ile yakın temasta bulundukları (Şekil 4.1.2.1.b-d) ve hatta uzantıları ile damar duvarının içine uzandıkları (Şekil 4.1.2.1.e) görüldü.



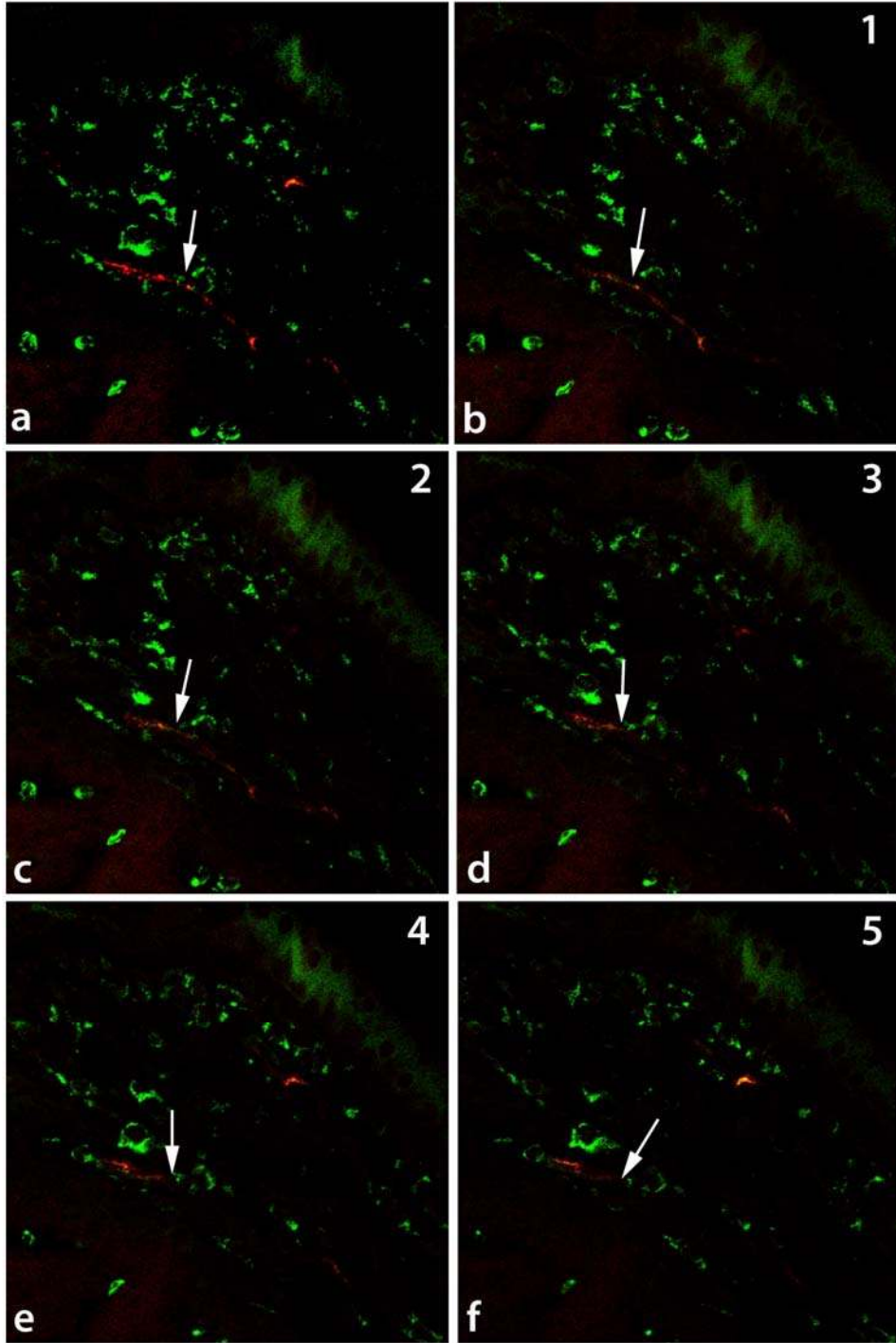
Şekil 4.1.2.1. CD68 ve CD31 İmmünofluoresan tekniği ile boyanmış İMİV kesidi. a) Hofbauer hücrelerinin (ok) İMİV içerisinde damar yapılarının daha çokça bulunduğu trofoblast tabakasının altına doğru yöneldikleri ve yerleştikleri görüldü. b, c ve d) Hofbauer hücrelerinin (ok) damar endoteli ile yakın kontaklar (ok başı) kurduğu izlendi. e) Hofbauer hücrelerinin (ok) damar endoteli arasına uzantılarıyla girdikleri (ok başı) gözlemlendi. Ölçekler: (a) 100 µm, (b-e) 50 µm.

4.1.3. Konfokal Mikroskop Bulguları

Hofbauer hücrelerinin villuslardaki yerleşimleri ve damar yapılarıyla ilişkileri üç boyutlu düzlemde incelendi. Konfokal mikroskopi bulguları da CD31 ve CD68 ile yapılan çiftli immünohistokimya bulgularımızı destekledi (Şekil 4.1.3.1 ve Şekil 4.1.3.2). Hofbauer hücrelerinin villus stroması boyunca, AHK'ler ve DT'lerle yakın ilgisini koruduğu gözlemlendi (Şekil 4.1.3.2).



Şekil 4.1.3.1. İMİV kesidinin konfokal mikroskop görüntüleri. a, b) Hofbauer hücrelerinin (yeşil) damarlarla (kırmızı) çok yakın ilişkide oldukları (ok) görülmektedir.

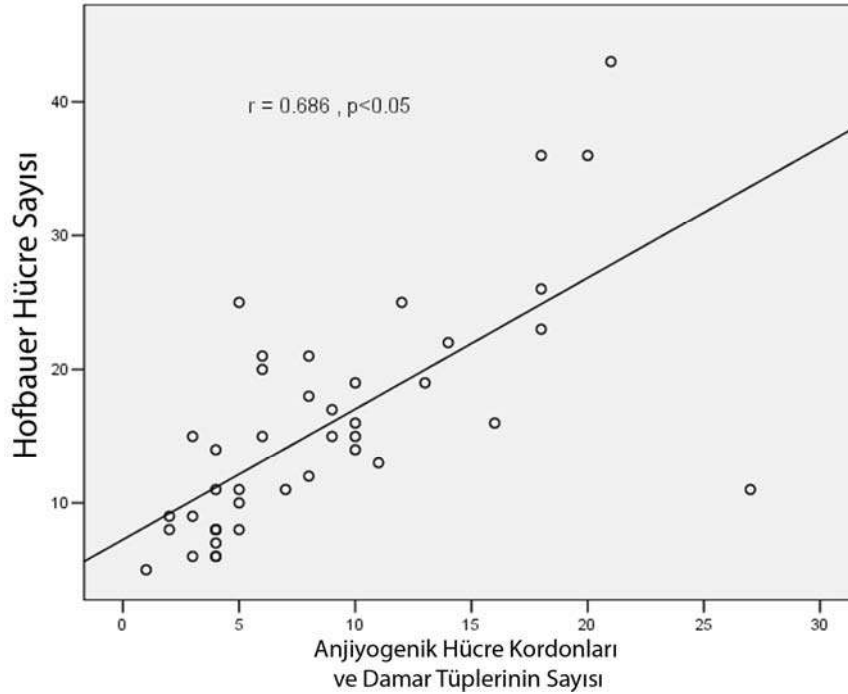


Şekil 4.1.3.2. İmmünofluoresanla boyanmış immatür intermediyet villusun (İMİV) farklı derinliklerden geçen kesitlerinin konfokal görüntüleri. a) Tüm düzlemlerin birleştirilmiş şekli. b) Konfokal mikroskobundan elde edilen ilk kesidin görüntüsü. c) 0.9 μm sonraki kesidin görüntüsü. d) 1.8 μm 'deki kesidin görüntüsü. e) 2.69 μm 'deki kesidin görüntüsü. f) 3.59 μm 'deki kesidin görüntüsü. Hofbauer hücrelerinin (yeşil), İMİV in üç boyutunda bile damar yapıları (kırmızı) ile yakın ilişkilerini (ok) sürdürdükleri görülmektedir.

4.2. İmmatür İntermediyet Villuslarda (İMİV) Hofbauer Hücre Sayıları ile Damar Yapıları Arasındaki İlişki

Hofbauer hücrelerinin vaskülogenez ve anjiyogenezle ilişkili olup olmadığını incelemek için İMİV kesitlerinde ilkel vasküler tüp içeren veya içermeyen anjiyogenik hücre kordonları ile bu yapılara yakın yerleşen Hofbauer hücreleri sayıldı. Bu amaçla, CD31 ve CD68 ile çiftli immünohistokimyaya tabi tutulmuş her gebelik haftasından (3, 4 ve 5. haftalar) 3 farklı örneğin 42 İMİV kesidinde Hofbauer hücreleri ve vasküler yapılar sayıldı. Aynı kesitlerde vasküler yapılara yakın yerleşen Hofbauer hücrelerinin yanısıra total Hofbauer hücreleri de sayıldı.

Yapılan sayımların sonucunda elde edilen bulgular Pearson'un korelasyon testi ile değerlendirildi ve İMİV kesidinde Hofbauer hücre sayıları ile anjiyogenik hücre kordonları ve damar tüplerinin (AHK ve DT) sayıları arasında anlamlı bir korelasyon ($p<0.05$, $r=0.686$) bulundu (Şekil 4.2.1). Öte yandan, damar yapılarına (AHK ve DT) yakın yerleşen Hofbauer hücrelerinin sayısı ile total Hofbauer hücrelerinin sayısı kıyaslandığında, Hofbauer hücrelerinin $\%43.1\pm4$ (ortalama $\pm$ SEM)'ünün vasküler yapılara yakın yerleştiği tespit edildi.



Şekil 4.2.1. İmmatür intermediyet villuslarda (İMİV), Hofbauer hücre sayıları ile damar yapılarının sayıları arasındaki ilişki. İMİV kesitlerinde yapılan sayımlara göre Hofbauer hücre sayıları ile damar yapılarının (AHK ve DT) sayıları arasında anlamlı bir korelasyon bulundu ($p<0.05$, $r=0.686$).

4.3. Erken Plasental Örneklerde Anjiyogenik Faktörlerin İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

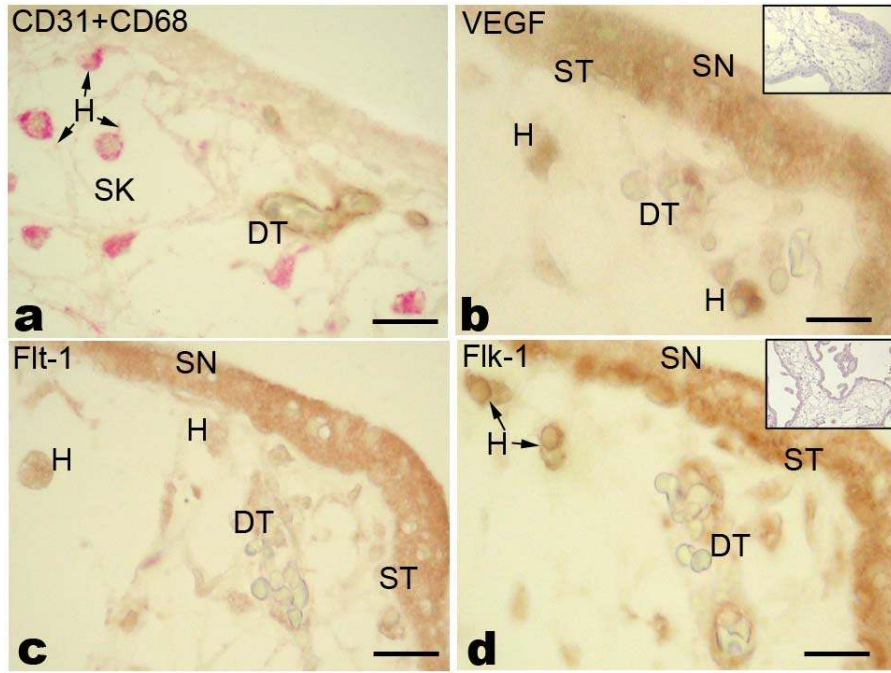
Anjiyogenik faktörlerden hangilerinin in vivo olarak Hofbauer hücrelerinde eksprese edildiklerini belirlemek için, erken plasenta örneklerinden (4., 5., 6., 7., 8. haftalar) alınan kesitler immünohistokimyasal olarak çeşitli anjiyogenik faktörler açısından incelendi. Hofbauer hücrelerindeki anjiyogenik faktör ve reseptör immüno-boyanma şiddetleri Çizelge 4.3.1’de verildi.

Çizelge 4.3.1. Antikorların Hofbauer hücrelerindeki immüno-boyanma şiddeti. (-): boyanma yok; (+) çok zayıf şiddette boyanma; (++) orta şiddette boyanma; (+++) güçlü şiddette boyanma.

ANTİKOR	İMMÜNO-BOYANMA ŞİDDETİ
VEGF	+++
Flt-1 (VEGFR-1)	++
Flk-1 (VEGFR-2)	+++
Ang-1	-
Ang-2	+++
Tie-1	++
Tie-2	+
Netrin-1	+++

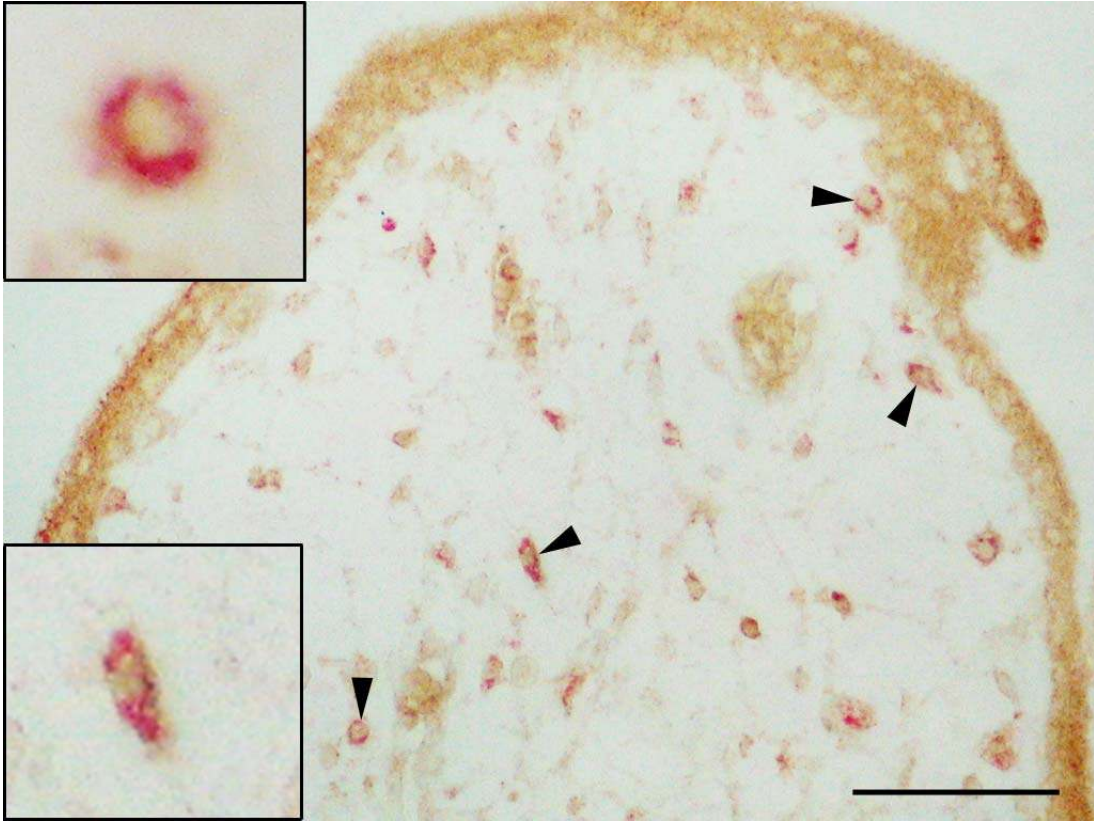
4.3.1. VEGF ve Reseptörleri Flt-1 ile Flk-1 ‘in Hofbauer Hücrelerindeki Ekspresyonu

İmmünohistokimyasal bulgulara göre VEGF, erken dönem insan plasentasında Hofbauer hücrelerinde (Şekil 4.3.1.1.a) yoğun bir immüno-boyanma gösterdi (Şekil 4.3.1.1.b). Hofbauer hücrelerinin yanı sıra, özellikle trofoblast tabakasında yoğun bir immüno-boyanma izlendi (Şekil 4.3.1.1.b). Gebeliğin ilerlemesiyle, trofoblastlardaki immüno-boyanma şiddeti azaldı. VEGF reseptörlerinden Flt-1 (VEGFR-1) (Şekil 4.3.1.1.c) ve Flk-1 (VEGFR-2) (Şekil 4.3.1.1.d) de Hofbauer hücrelerinde yoğun bir boyanma gösterdi.



Şekil 4.3.1.1. VEGF ve reseptörleri Flt-1 ile Flk-1'in erken dönem insan plasentasında immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. a) Damar yapılarının (CD31) ve Hofbauer hücrelerinin (CD68) belirlenmesi için CD31 ve CD68 ile yapılan çiftli immünohistokimya. Damar tüpleri (DT) CD31 ile pozitif reaksiyon (kahverengi) gösterdi. Hofbauer hücreleri (H) ise CD68 antikoruyla pozitif reaksiyon (pembe) gösterdi. b) VEGF, özellikle trofoblastlarda ve Hofbauer hücrelerinde net olarak izlendi. c) Flt-1 de VEGF'e benzer bir boyanma gösterdi fakat Hofbauer hücreleri VEGF'e göre Flt-1 ile daha zayıf boyandı. d) Flk-1, en yoğun olarak sitotrofoblastlar (ST) ve Hofbauer hücrelerinde, daha az yoğun olarak ise sinsiyotrofoblastlar (SN) ve damar tüplerinde (DT) gözlemlendi. İç resimler b ve d) Uygun negatif kontroller kullanıldığında (VEGF ve Flt-1 için tavşan IgG, Flk-1 için fare IgG) herhangi bir immüno-reaksiyon gözlemlenmedi. Ölçekler: (a-d) 25µm, (iç resim b) 150 µm ve (iç resim d) 500 µm.

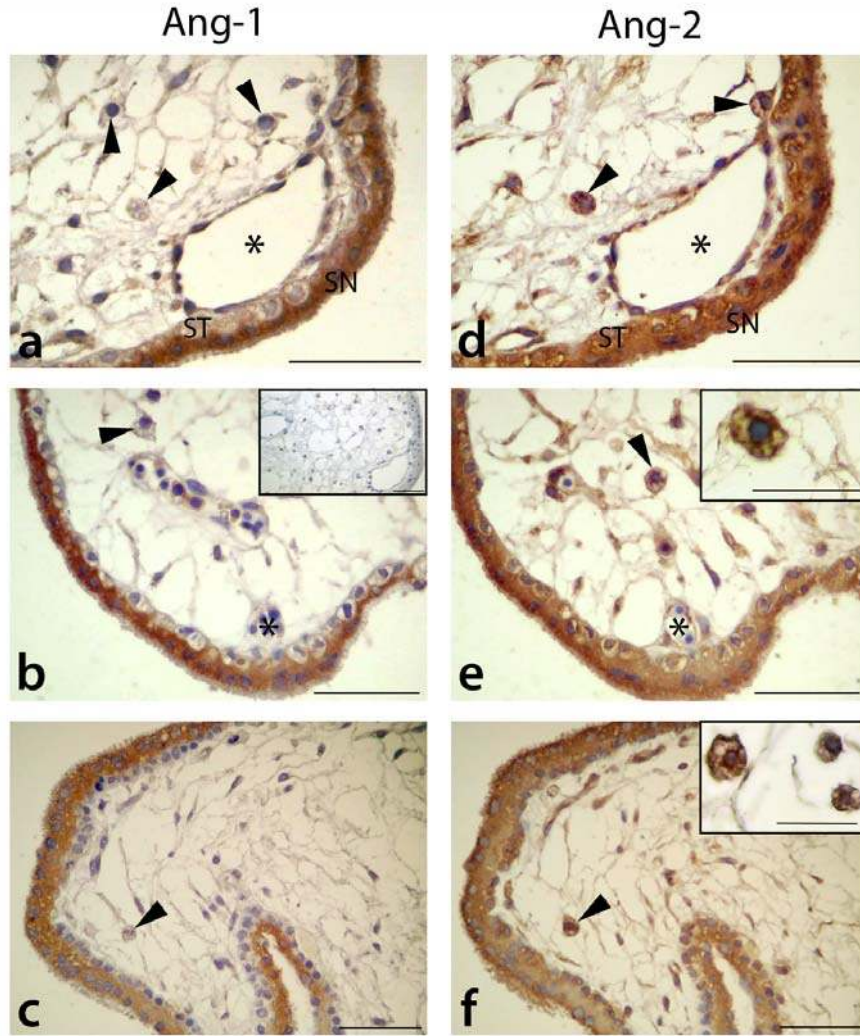
Hofbauer hücrelerinde VEGF ve CD68 ile yapılan çiftli boyamalar da, bu hücrelerde VEGF'in varlığını doğruladı (Şekil 4.3.1.2). Çiftli immünohistokimya yönteminde VEGF kahverengi, CD68 ise pembe renkte izlendi. Böylece CD68-pozitif Hofbauer hücrelerinde VEGF'in varlığı doğrulanmış oldu (Şekil 4.3.1.2).



Şekil 4.3.1.2. VEGF ve CD68'in çiftli immünohistokimya ile Hofbauer hücrelerinde gösterilmesi. CD68 ile pembe renkte izlenen Hofbauer hücreleri (ok başı) aynı zamanda VEGF te içerdiğinden kahverengi reaksiyon da gösterdi (iç resimler). Ölçek 50 µm.

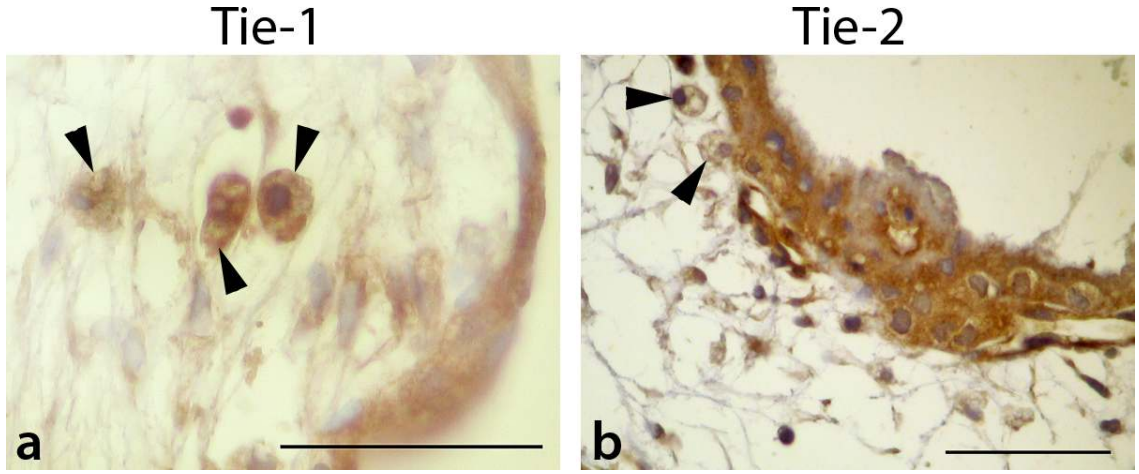
4.3.2. Anjiyopoietinler (Ang-1 ve Ang-2) ve Reseptörleri (Tie-1 ve Tie-2)'nin in Hofbauer Hücrelerindeki Ekspresyonu

Anjiyopoietinler (Ang-1 ve Ang-2) ile yapılan immünohistokimya sonuçlarına göre Hofbauer hücreleri yoğun olarak Ang-2 immüno-pozitifken (Şekil 4.3.2.1.d-f), Ang-1 ile herhangi bir immüno-boyanma göstermedi (Şekil 4.3.2.1.a-c). Ang-1, sinsiyotrofoblastlarda güçlü bir immüno-boyanma gösterirken (Şekil 4.3.2.1.a-c), Ang-2 sinsiyotrofoblastlar haricinde, sitotrofoblastlar ve damar yapılarında da güçlü bir immüno-boyanma gösterdi (Şekil 4.3.2.1.d-f).



Şekil 4.3.2.1. Ang-1 ve Ang-2'nin erken dönem insan plasentasında immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. a-c) Ang-1 özellikle sinsisyotrofoblastlarda (SN) yoğun immüno-boyanma gösterdi. Hofbauer hücreleri (ok başı), Ang-1 ile herhangi bir immüno-boyanma göstermedi. d-e) Ang-2, sinsisyotrofoblastlarda (SN), sitotrofoblastlarda (ST) ve damar (*) endotelinde güçlü bir immüno-boyanma gösterdi. İç resim e ve f) Hofbauer hücreleri (ok başı), Ang-2 ile oldukça yoğun bir şekilde boyandı. İç resim b) Uygun negatif kontrol (fare IgG) kullanıldığında herhangi bir immüno-reaksiyon gözlenmedi. Ölçekler: (a-f) 50 µm, (iç resim b) 50 µm ve (iç resimler e ve f) 25 µm.

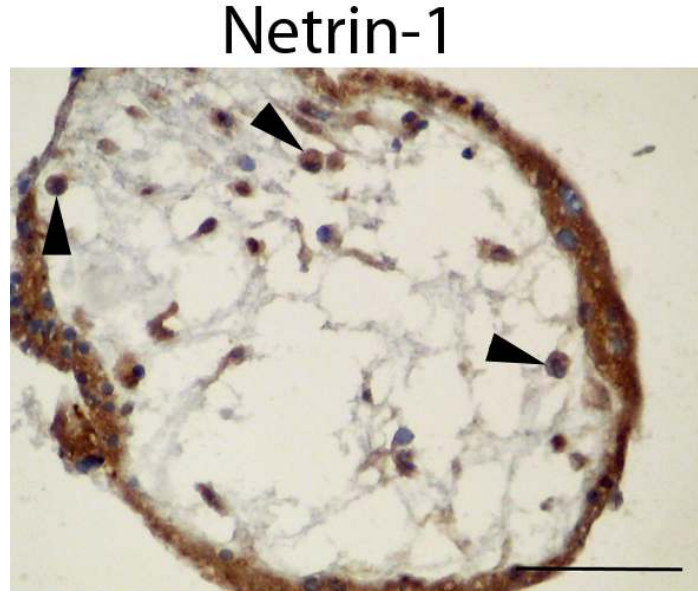
Anjiyopoietinlerin reseptörleri olan Tie-1 ve Tie-2 ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre Hofbauer hücreleri Tie-1 ile yoğun boyanırken, Tie-2 ile çok zayıf bir immüno-boyanma şiddeti gösterdi (Şekil 4.3.2.2. a ve b).



Şekil 4.3.2.2. Erken dönem insan plasentasında Tie-1 ve Tie-2 immünohistokimyası. a) Hofbauer hücrelerinde (ok başı) güçlü Tie-1 immüno-boyanması izlendi. b) Hofbauer hücrelerinde (ok başı) Tie-2 immüno-boyanması Tie-1'e göre daha zayıftı. Ölçekler: (a, b) 50 μ m.

4.3.3. Netrin-1'in Hofbauer Hücrelerindeki Ekspresyonu

Erken plasental dokuların Netrin-1 ile immünohistokimyası, Hofbauer hücrelerinin Netrin-1 ile oldukça yoğun bir şekilde boyandığını gösterdi (Şekil 4.3.3.1.a). Sitotrofoblastlar ve sinsisyotrofoblastlar da Netrin-1 ile yoğun bir immüno-boyanma gösterdi.



Şekil 4.3.3.1. Erken dönem insan plasentasında Netrin-1'in immünohistokimyası. Villus özünün stromal kanalları içine yerleşik, Netrin-1 immüno-pozitif Hofbauer hücreleri (ok başı) görülmektedir. Ölçek: 50 μ m.

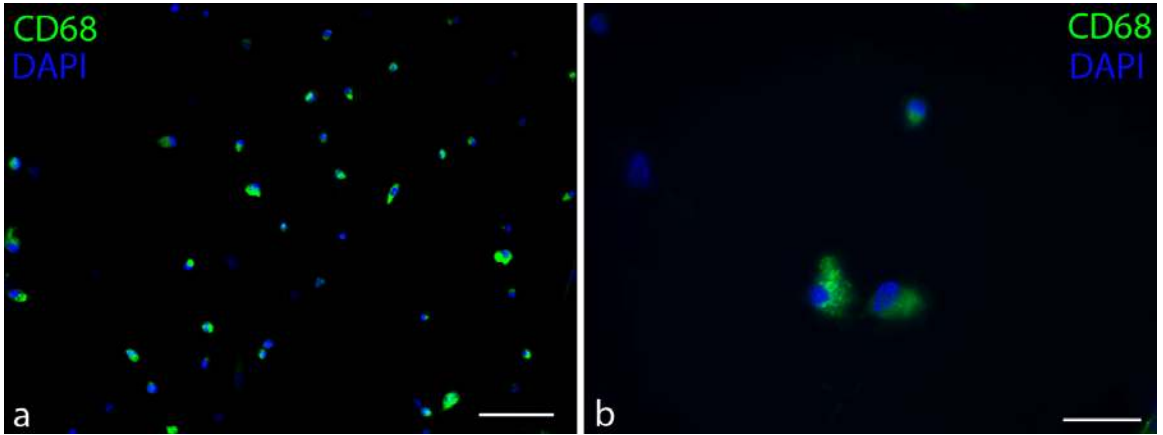
4.4. Hücre Kültürü Bulguları

4.4.1. Hofbauer Hücre İzolasyonu

Erken dönem insan plasenta örneklerinden Hofbauer hücre izolasyonu için birbirinden farklı metodlar, ayrı ayrı veya çeşitli kombinasyonlarda birleştirilerek kullanıldı. Her yöntemden elde edilen hücre popülasyonu değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak hangi yöntemin izolasyon için daha elverişli olduğu tespit edildi. Böylece hücre izolasyonu için yöntem araştırmaları da yapılmış oldu.

4.4.1.1. Yapışma ile Hücre Ayırıştırma Deneyinin (Attachment Assay) Bulguları

Yapışma deneyi ile hücreleri ayırştırmak için, hücreler ya 2 saat, ya da 1 gün süre ile inkübatörde bekletilerek yapışma deneyine tabi tutuldu. Belirtilen sürelerin sonunda yapışmayan hücreler yıkanarak uzaklaştırıldı ve böylece hücrelerin plastik yüzeye yapışma afiniteleri ve sürelerinden faydalanarak hücre ayırıştırması yapıldı. Yapışma deneyinde Hofbauer hücrelerinin çok az oranda farklı hücre (trofoblast) kontaminasyonu ile izole edildiği gösterildi (Şekil 4.4.1.1). Hücreler CD68, CD34, Sitokeratin-7 (CK-7) ile boyanarak sayıldı. Yapışma deneyi ile elde edilen hücreler CD34 ile herhangi bir boyanma göstermediler. CD68 ile boyanan hücreler çoğunlukta olmasına rağmen, yine de CK-7 pozitif hücre kontaminasyonu da gözlemlendi. Bu şekilde izole edilen hücrelerin % 68 ± 4 (ortalama $\pm$ SEM) oranında CD68 pozitif Hofbauer hücrelerinden oluştuğu hesaplandı. İki saatlik inkübasyonun, yapışma deneyi ile hücre izolasyonu için yeterli olduğu saptandı çünkü bir günlük inkübasyonda trofoblastların da kültür kabına yapıştığı izlendi.

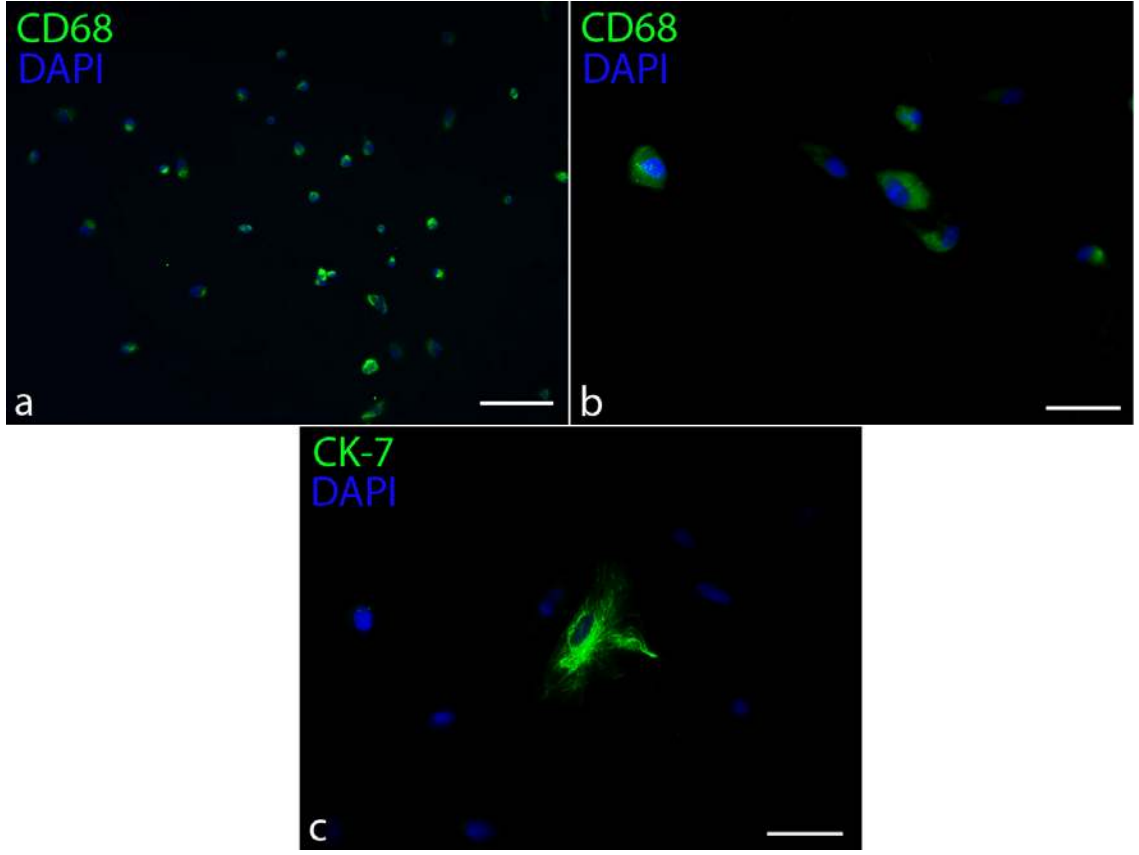


Şekil 4.4.1.1. Hücre kültüründe yapışma deneyinden elde edilen hücrelerin immünofluoresanla boyanması. a) Küçük büyütmede CD68 ile yeşil boyanan hücreler ve CD68 ile immünoreaksiyon göstermeyen hücreler izlenmektedir. b) Daha büyük büyütmede CD68 pozitif boyanan hücreler (yeşil) ve boyanmamış hücrelere ait çekirdekler DAPI ile mavi görülmektedir. Ölçekler: (a) 100 μ m ve (b) 50 μ m.

4.4.1.2. Fikol ile Yoğunluğa Bağlı Gradient Santrifügasyonu ve Ardından Yapışma Deneyinin Bulguları

Bu deneyde, yapışma deneyinden elde edilen hücrelerden daha da saf bir Hofbauer hücre popülasyonu elde etmeyi hedefledik. Bu nedenden dolayı, yapışma deneyine alacağımız hücre süspansiyonunu makrofajlar açısından zenginleştirmek için enzimle plasenta dokularından açığa çıkarılan tüm hücreleri içeren hücre süspansiyonu “Fikol” gradient santrifügasyonundan geçirildi. Bu şekilde orta fazda makrofajların oluşturduğu banttıan elde edilen hücreler, çok az hücre kontaminasyonu içermekteydi. Bu kontaminasyonu ortadan kaldırmak için gradient sonucu orta banttıan elde edilen hücre süspansiyonu yapışma deneyine alındı. Zaten hemen hemen makrofajlar haricinde farklı hücre içermeyen bu hücre süspansiyonu, yapışma deneyiyle iyice saf makrofaj popülasyonu şekline getirildi.

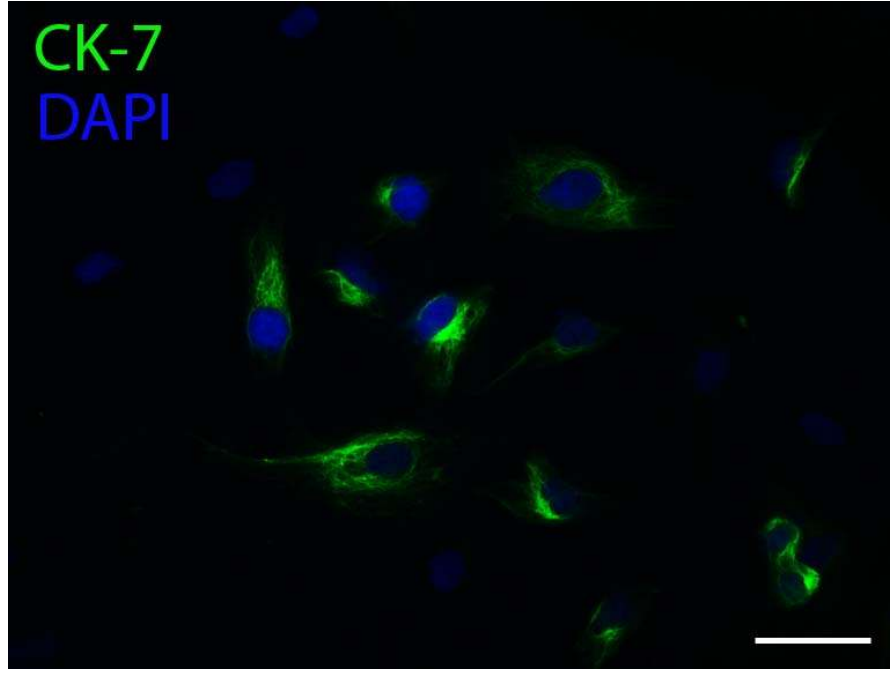
Bu iki işlemde geçirilerek elde edilen hücreler immünofluoresan yöntemi ile çeşitli hücre belirteçleri kullanılarak karakterize edildi ve deneyin başarısı ölçüldü. CD34, CD14, CD68, CK-7 antikorları ile hücreler immünofluoresan yöntemiyle boyandı. Bu boyamalardan sonra elde edilen hücreler arasında CD34-pozitif endotel hücre kontaminasyonu yoktu. Hücrelerin çok azı CK-7 pozitif olması karşın büyük çoğunluğu CD68 ve CD14 pozitif (Şekil 4.4.1.2). CK-7-pozitif hücreler, ilk pasajda uzaklaştırıldı. Böylece saf Hofbauer hücreleri elde edilmiş oldu. Bu yöntemle 94 ± 3 (ortalama $\pm$ SEM) saflığında Hofbauer hücreleri elde edildi. Bu tekniğin başarısından dolayı, Hofbauer hücre izolasyonunda bu yöntem kullanıldı.



Şekil 4.4.1.2. Fikol gradient santrifügasyonu sonrasında yapışma deneyinden elde edilen hücreler. a, b) Hücrelerin büyük çoğunluğu CD68 pozitif olmasına rağmen c) çok az sayıda CK-7 pozitif hücre olduğu da görülmektedir. Ölçekler: (a) 100 μm ve (b ve c) 25 μm .

4.4.1.3. Önce Fikol, Ardından Perkol ile Yoğunluğa Bağlı Gradient Santrifügasyonu Deneyinin Bulguları

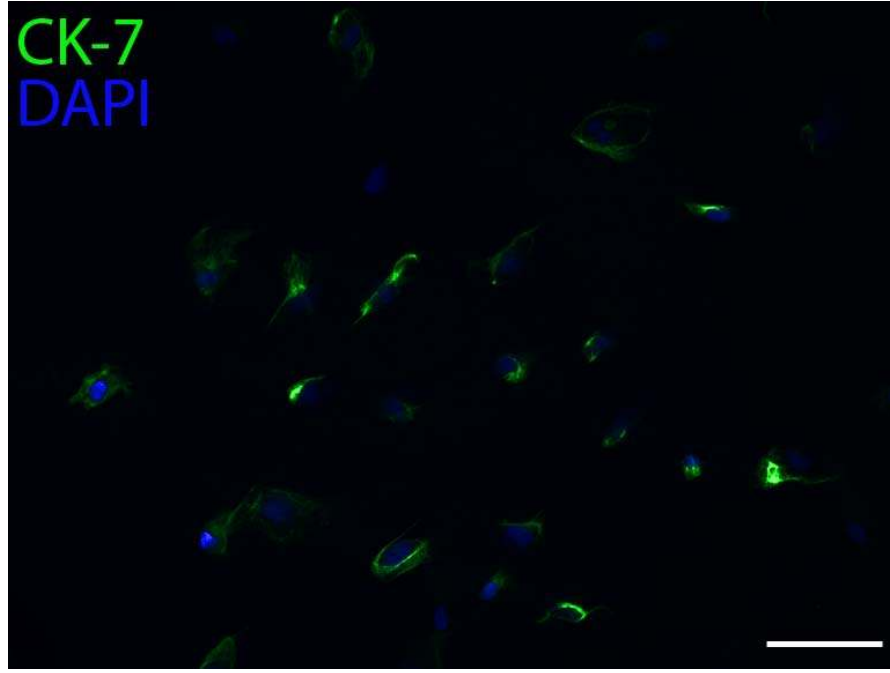
Bu deneyde Fikol ile gradient santrifüjünden sonra, “hücre süspansiyonunu bir kez de Perkol gradientinden geçirsek daha saf Hofbauer hücreleri elde eder miyiz ?” sorusuna yanıt bulmaya çalıştık. Fakat Perkol sonrasında elde edilen hücre sayısının çok az olması ve CK-7-pozitif hücre kontaminasyonunun çok olması nedeniyle bu yöntemi Hofbauer hücre izolasyonu için tercih etmedik (Şekil 4.4.1.3). Çünkü elde edilen Hofbauer hücrelerinin oranı $\%28 \pm 5$ (ortalama $\pm$ SEM) olarak hesaplandı.



Şekil 4.4.1.3. Fikol ve ardından Perkol gradient santrifügasyonu sonunda elde edilen hücreler. Bu hücrelerin çoğunun CK-7-pozitif (yeşil) olduğu görülmektedir. Boyanmamış Hofbauer hücreleri sadece mavi çekirdekler şeklinde izlenmektedir. Ölçek: 25 μ m.

4.4.1.4. “Accuspin Histopak” Sistemi ile Santrifügasyon Deneyinin Bulguları

Bu deneyde kullanılan “Accuspin Histopak” bir filtre ve altında yer alan Histopak gradientinden oluşmaktaydı. Enzimsel hücre ayrıştırması işleminden sonra elde edilen hücre süspansiyonu metal elekten geçirildi ve “Accuspin Histopak” sisteminin filtresi üstüne yavaşça dökülerek santrifüje edildi. Bu işlem sonunda beklendiği gibi bir faz ayrımı görülmedi. Eritrositlerin filtreyi geçerek tüpün en dibine çökmesi haricinde gözle görülür başka bir hücre fazı ayrımı olmadı. Yine de üstte kalan faz toplanıp kültüre edildiğinde, hücrelerin çoğunun CK-7-pozitif trofoblastlar olduğu görüldü (Şekil 4.4.1.4). Bu yöntemden elde edilen Hofbauer hücrelerinin oranı 11 ± 6 (ortalama $\pm$ SEM) olarak hesaplandı.



Şekil 4.4.1.4. “Accuspin Histopak” sistemi ile santrifügasyon sonunda elde edilen hücreler. Bu hücrelerin çoğunun CK-7-pozitif (yeşil) olduğu görülmektedir. Boyanmamış Hofbauer hücreleri sadece mavi çekirdekler şeklinde izlenmektedir. Ölçek: 50 μ m.

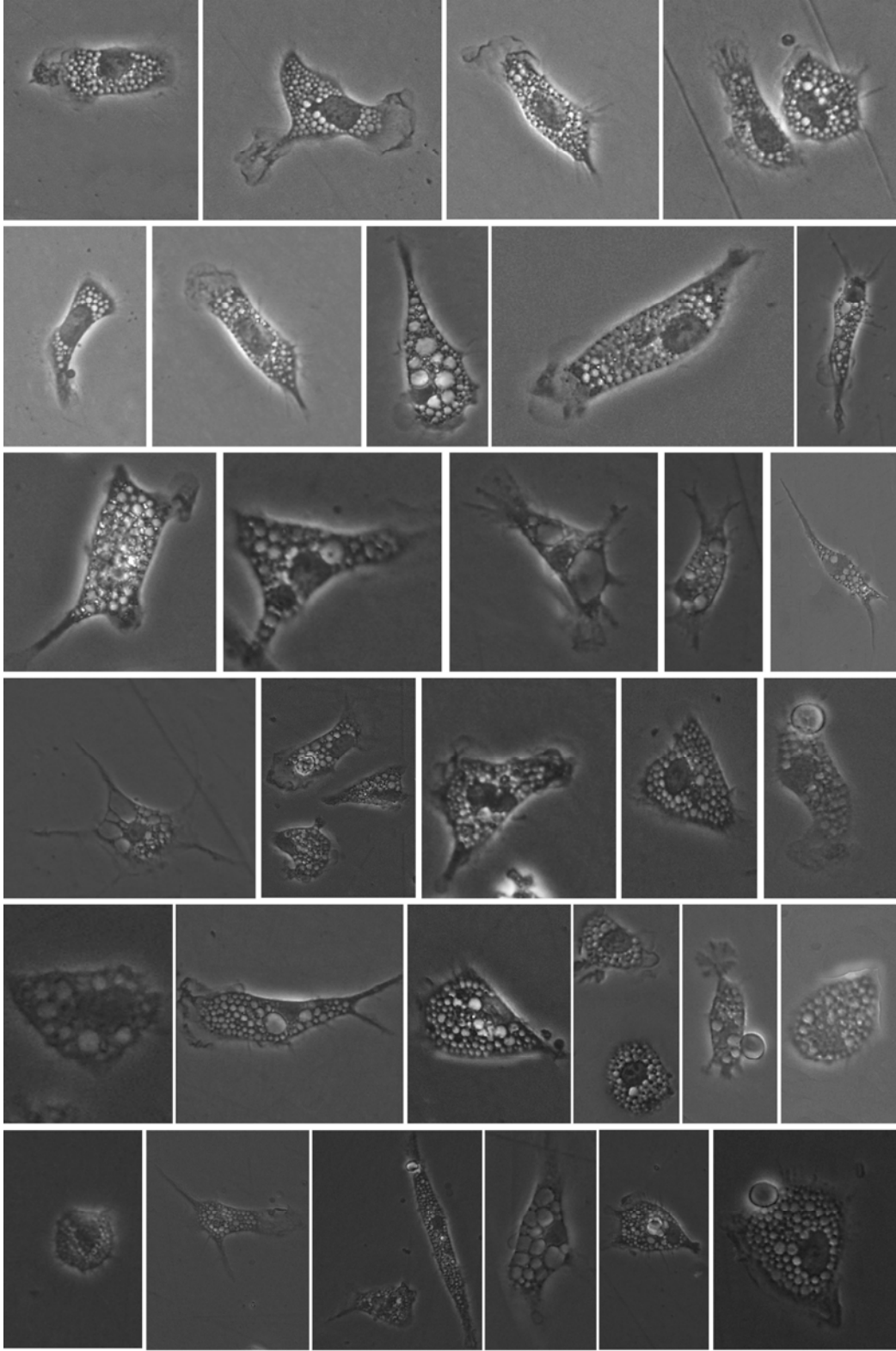
4.4.2. İzole Edilen Hücrelerin Karakterizasyonu

İzole edilen hücrelerin Hofbauer hücreleri olup olmadığını araştırmak için faz-kontrast incelemeleri, immünofluoresan boyama yöntemi ve elektron mikroskoptan yararlanıldı.

4.4.2.1. İzole Edilen Hücrelerin Faz-Kontrast Mikroskopunda Değerlendirilmesi

Hofbauer hücre izolasyonunda en etkili yöntemi tayin etmek için yararlanılan en önemli olanaklardan biri de, faz-kontrast mikroskopunda hücrelerin morfolojilerinin incelenmesi oldu.

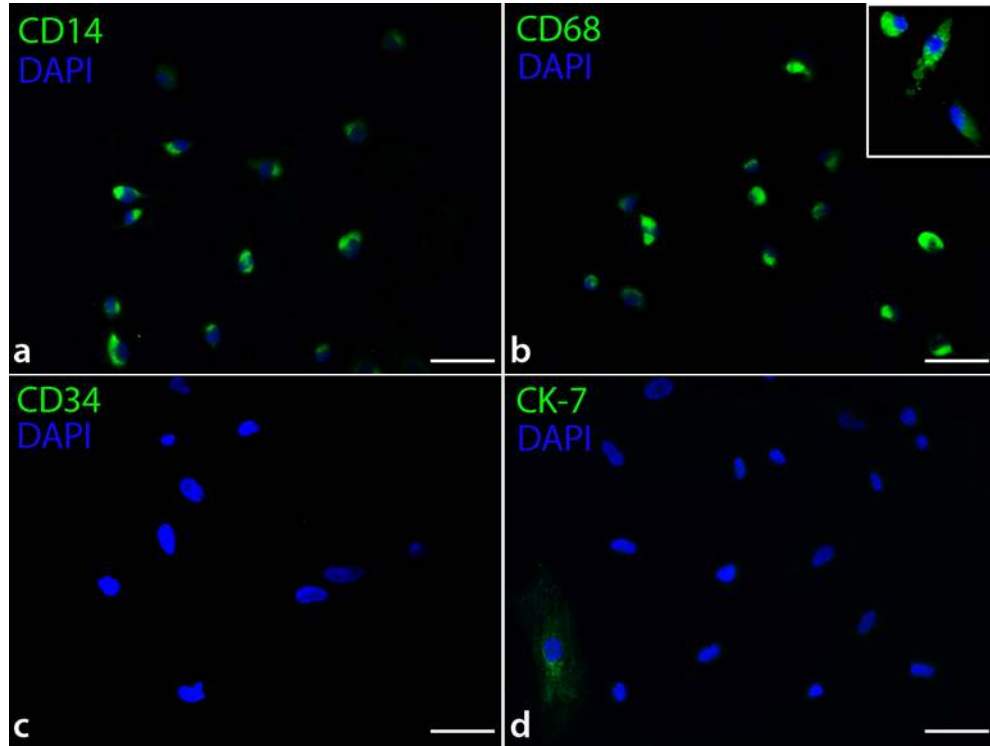
Hofbauer hücreleri, içerdikleri vakuoller nedeniyle köpüğümsü hücreler şeklinde izlendiler. Bu vakuollerin bazı hücrelerin sitoplazmalarında oldukça geniş yer kapladığı görüldü. Hofbauer hücrelerinin bazılarının, hücre yüzeyinden uzanan farklı şekilde çıkıntıları olduğu gibi, daha yuvarlak bazı hücrelerde faz-kontrast mikroskopunun büyütmesinin yetersiz kalması nedeniyle bu çıkıntılar net bir şekilde izlenemedi. Hücrelerin çok farklı şekillere sahip oldukları görüldü; kimisi, uzamış (fusiform), kimisi yuvarlak, hatta birçoğu da adeta köşeli hücreler şeklinde izlendiler (Şekil 4.4.2.1).



Şekil 4.4.2.1. İzole edilen Hofbauer hücrelerinin Faz-Kontrast mikroskoptaki görüntüleri.

4.4.2.2. İmmünofluoresan ile Hücre Tayini

Bu yöntemde, izole edilen hücreler plasentada mevcut hücreler için belirli belirteçlere ait antikörlerle boyandı. Bu antikörlerden CD34 endotel hücrelerini, CK-7 trofoblastları, CD14 ve CD68 ise Hofbauer hücrelerini belirlemek amacıyla kullanıldı. Daha önce yukarıda bahsi geçen hücre izolasyon yöntemlerinin ne denli verimli olduğunu belirlemek için her yöntemden elde edilen hücreler bu belirteçlerle boyandı. Hofbauer izolasyonu için en iyi yöntemin “Fikol ile yoğunluğa bağlı gradient santrifügasyonu ve ardından yapışma deneyi” olduğu görüldü. Bu yöntemin ardından elde edilen hücreler immünofluoresan boyama ardından incelendiğinde, CD14 ve CD68-pozitif Hofbauer hücrelerinin çoğunlukta olduğu görüldü (Şekil 4.4.2.2.a, b). CD34 ile herhangi bir immünoreaksiyon izlenmedi (Şekil 4.4.2.2.c). CK-7 ile boyanan az sayıda hücre olmasına rağmen bu hücreler pasajlama yöntemi ile uzaklaştırıldı (Şekil 4.4.2.2.d).

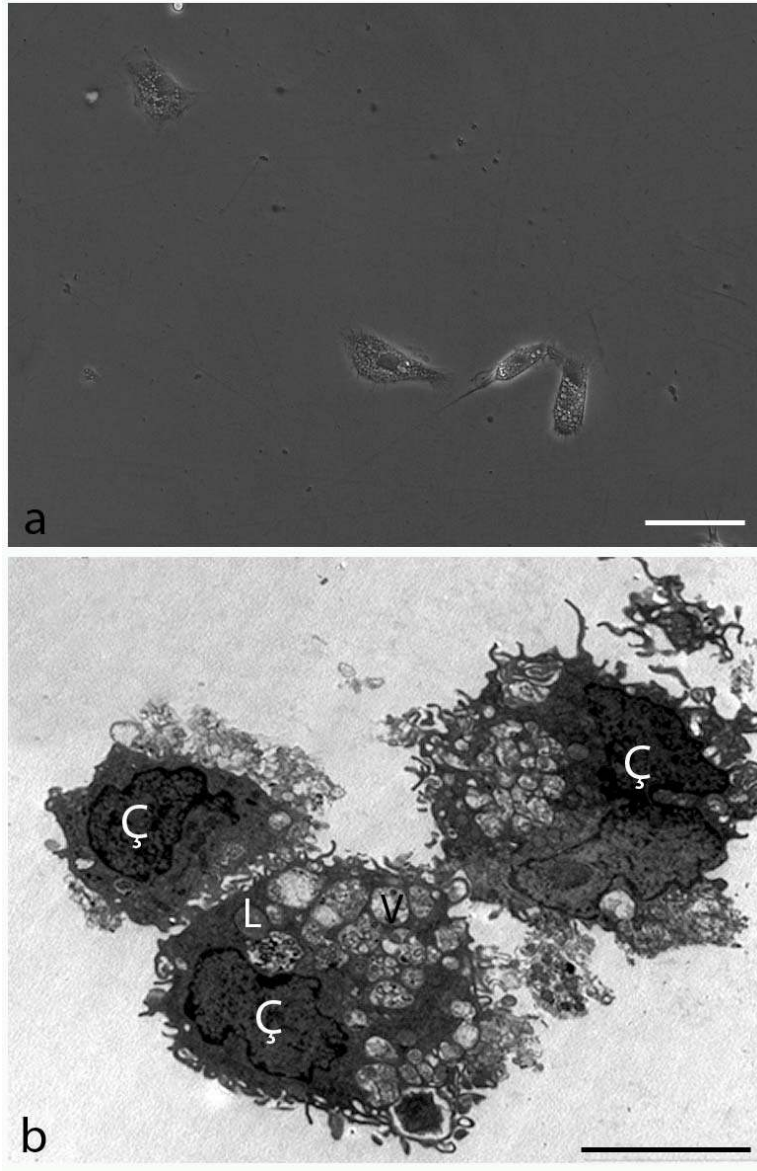


Şekil 4.4.2.2. Fikol ile yoğunluğa bağlı gradient santrifügasyonu ve ardından yapışma deneyinin sonucunda elde edilen hücrelerin karakterizasyonu. a, b) Elde edilen hücrelerin hemen hemen hepsinin CD14 ve CD68-pozitif Hofbauer hücreleri olduğu görülmektedir. c) CD34-pozitif hücre bulunmamaktadır. d) CK-7 ile pozitif hücre çok nadir bulunmaktadır. Ölçekler: (a ve b) 50 μ m ve (c ve d) 25 μ m.

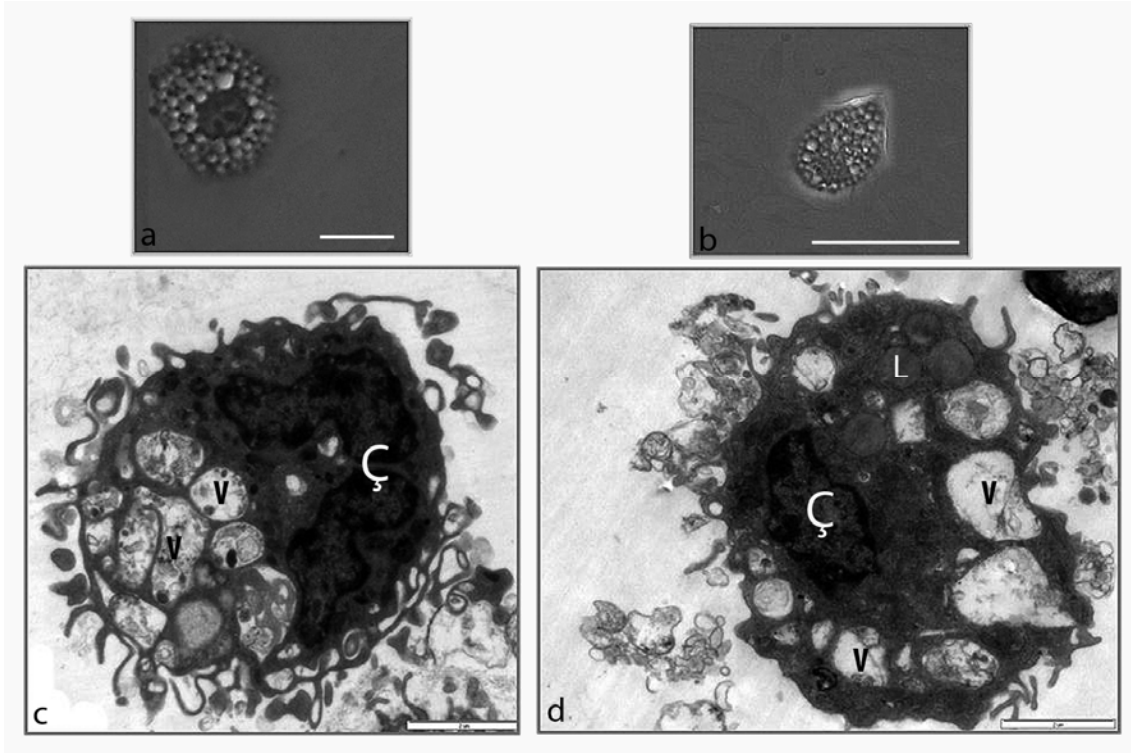
4.4.2.3. İzole Edilen Hücrelerin İnce Yapısının İncelenmesi

Fikol ile yoğunluğa bağlı gradient santrifügasyonu ve ardından yapışma deneyi ile izole edilen hücreler özel bir yöntemle, agar içinde takip edilerek Araldite gömüldü. Bir başka yaklaşımda da, hücreler fikol izolasyonundan sonra yapışma deneyine alınmadan TEM için takip edildi. Hücelere ait blokların yarı ince kesitlerinde hücrelerin yerleri belirlendi, sonra bu alanlardan ince kesitleri alınarak TEM de incelendi.

TEM incelemelerine göre elde edilen tüm hücreler tipik Hofbauer hücresi morfolojisini gösterdiler. Düzensiz yüzey, merkez dışı çekirdeği, bol sayıda vakuoller ve lizozomlar Hofbauer hücrelerinin tipik yapı özellikleriydi. Bu hücrelerin sitoplazmalarında faz-kontrast mikroskopunda bile ayırt edilebilen büyük vakuoller bulunmaktaydı (Şekil 4.4.2.3.a). Vakuollerin yanı sıra, lizozomlar ve bol miktarda sitoplazmik uzantılar içermektedirler (Şekil 4.4.2.3.b ve Şekil 4.4.2.4.c, d). Yapışma deneyine tabi tutulmayan ve sadece fikolden geçirilen hücreler incelendiğinde, bunların da büyük çoğunluğunun Hofbauer hücreleri olduğu görüldü. TEM bulguları da izolasyon yönteminin doğruluğunu ve izole edilen hücrelerin Hofbauer hücreleri olduğunu kanıtladı.



Şekil 4.4.2.3. İzole edilen hücrelerin faz-kontrast ve TEM görüntüleri. a) Faz-kontrast mikroskopunda farklı tipte şekillere sahip, bol vakuollü Hofbauer hücreleri görülmektedir. b) Faz-kontrast mikroskopunda incelenen hücelere benzer bir hücre topluluğunun TEM ile inceyapısı izlenmektedir. Ç: çekirdek; L: lizozom; V: vakuol. Ölçekler: (a) 25 μm ve (b) 5 μm .



Şekil 4.4.2.4. İzole edilen hücrelerin faz-kontrast ve TEM görüntüleri. a ve b) Faz-kontrast mikroskopunda yuvarlak şekilli, bol vakuollü Hofbauer hücreleri görülmektedir. c ve d) Faz-kontrast mikroskopunda incelenen hücrelere benzer hücrelerin TEM ile ince yapısı izlenmektedir. Hücrelerin sitoplazmik çıkıntılarının ve vakuollerinin bolluğu dikkat çekmektedir. Ç: çekirdek; L: lizozom; V: vakuol. Ölçekler: (a) 10 µm, (b) 25 µm ve (c) 2 µm.

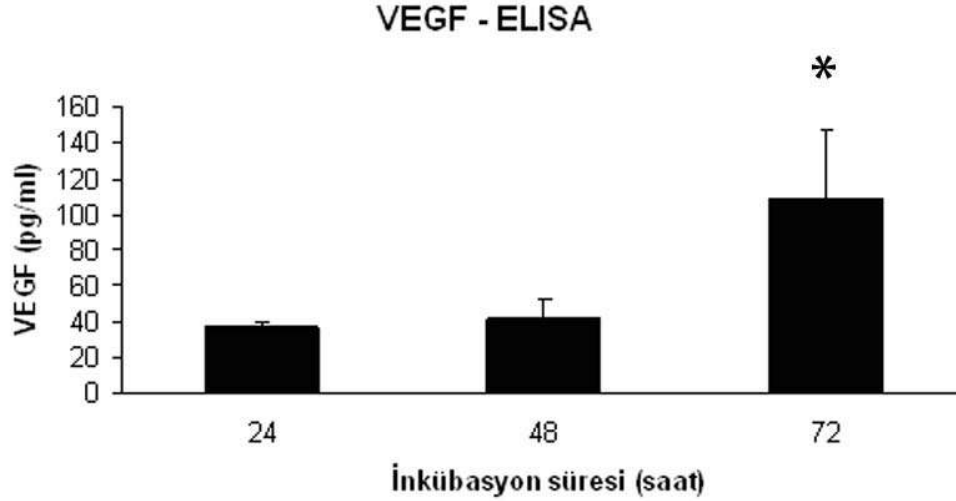
4.4.3. ELISA Deneyinin Bulguları

Hofbauer hücreleri kültür ortamında serumlu veya serum içermeyen Hofbauer-Besiyeri içinde belirli süreler ile inkübe edildi ve hücrelerin salgıladıkları faktörleri içeren "Hofbauer-yönlendirilmiş besiyeri", bu faktörlerden VEGF, Ang-1 ve Ang-2'nin belirlenmesi için ELISA yöntemi ile test edildi. Her ELISA deneyinde herhangi bir örnek veya standardın koyulmadığı boş (negatif) kuyucukların yanı sıra, kontrol olarak Hofbauer-Besiyeri ve serumsuz Hofbauer-Besiyeri bulunmaktaydı. Ang-1 ELISA için kontrol olarak insan tükürük salgısı kullanıldı. Hesap yapılırken, serum içeren Hofbauer-Besiyerinden elde edilen değerler, serum içeren yönlendirilmiş besiyerinden, serum içermeyen Hofbauer-Besiyerinden elde edilen değerler de, serum içermeyen yönlendirilmiş besiyerinden elde edilen değerlerden çıkartıldı.

4.4.3.1. VEGF-ELISA Bulguları

Toplanan Hofbauer-yönlendirilmiş besiyerleri VEGF salgısı açısından değerlendirildi. ELISA bulgularına göre, Hofbauer hücreleri bulundukları besiyerine

VEGF salgılamaktadırlar (Şekil 4.4.3.1). Ayrıca Hofbauer hücrelerinin besiyerine salgıladıkları bu VEGF'in miktarı zamanla artmış olduğu belirlendi. 72 saatlik inkübasyon sonunda salgılanan VEGF miktarı, 24 saattekine kıyasla %194 ($p<0.05$) ve 48 saattekine kıyasla %166 ($p<0.05$) oranlarında artmış durumdaydı. VEGF-ELISA bulguları, Hofbauer hücrelerinin bulundukları ortama VEGF salgıladıklarını doğrulamaktaydı.



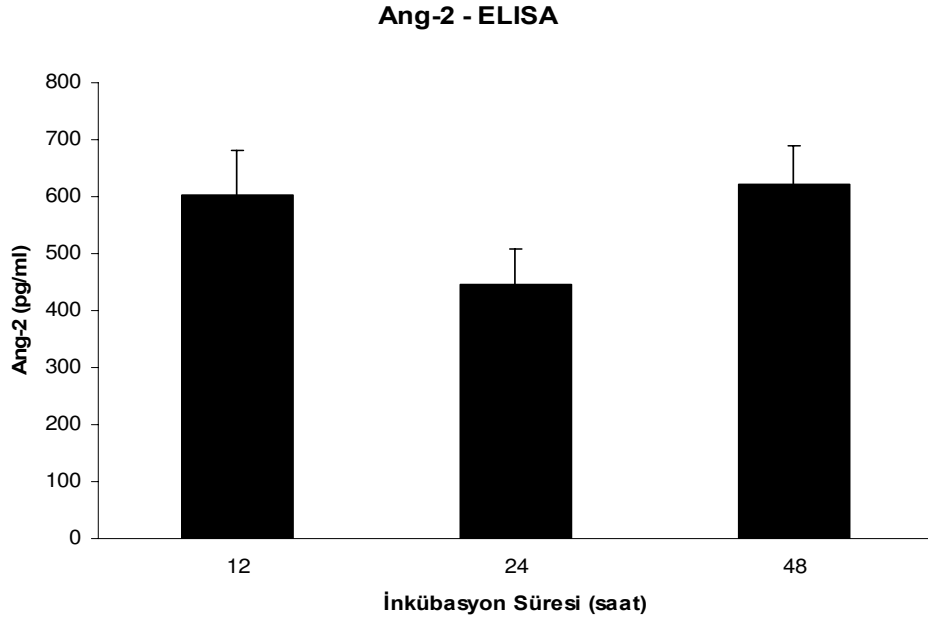
Şekil 4.4.3.1. Hofbauer-yönlendirilmiş besiyerinin VEGF protein miktarlarını gösteren grafik. Hofbauer hücrelerinin zamana bağlı olarak artan seviyelerde VEGF salgıladıkları görülmektedir. Hofbauer hücreleri 72 saatte, 24 ve 48 saatlerdekine göre anlamlı (* = $p<0.05$) olarak daha fazla VEGF üretmişlerdir.

4.4.3.2. Ang-1-ELISA Bulguları

Toplanan Hofbauer-yönlendirilmiş besiyerleri Anjiyopoietin-1 (Ang-1) salgısı açısından değerlendirildi. ELISA bulgularına göre, Hofbauer hücreleri bulundukları besiyerine tespit edilebilir düzeylerde Ang-1 salgılamadıkları görüldü. İnsan tükürüğünde yüksek miktarlarda bulunan ve Ang-1-ELISA yönteminde miktarını tayin ettiğimiz Ang-1, aynı deneyde Hofbauer yönlendirilmiş besiyerlerinde tespit edilememiştir. Bu bulgu, Ang-1 immünohistokimya bulguları ile uyumludur.

4.4.3.3. Ang-2-ELISA Bulguları

Toplanan Hofbauer-yönlendirilmiş besiyerleri Anjiyopoietin-2 (Ang-2) salgısı açısından da değerlendirildi. Ang-2'nin farklı sürelerdeki miktarları arasında anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.4.3.2). Ancak, serum içeren yönlendirilmiş besiyerlerinde, serum içermeyenlere göre biraz daha yüksek olduğu görüldü. Ang-2-ELISA bulguları, Hofbauer hücrelerinin bulundukları ortama Ang-2 salgıladıklarını doğrulamaktadır.



Şekil 4.4.3.2. Hofbauer-yönlendirilmiş besiyerinin Ang-2 protein miktarlarını gösteren grafik. Hofbauer hücrelerinin zamana bağlı olarak Ang-2 salgılarında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

4.4.4. Anjiyogenez Deneyinden Elde Edilen Bulgular / (Fonksiyon Testleri)

Anjiyogenez deneyi için, izole edilen HUVEC hücreleri kullanıldı. Bu hücreler önce deney için uygun hücre sayısının tespiti için endotelial büyüme besiyeri ile anjiyogenez testine tabi tutuldu, sonra belirlenen sayıdaki HUVEC hücreleri, “Hofbauer hücresi-yönlendirilmiş besiyeri” ile yeniden anjiyogenez testine alındı.

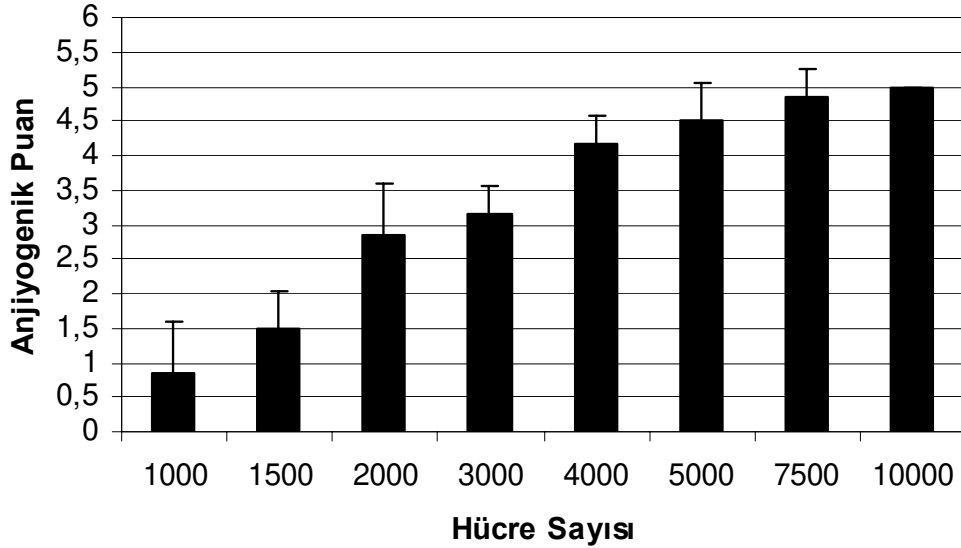
4.4.4.1. HUVEC Hücreleri ile Anjiyogenez Deneyinin Bulguları

HUVEC hücreleri belirli bir üreme yoğunluğuna gelince, bulundukları kültür kabından tripsinizasyon ile kaldırıldı ve hücreler, tripan mavisi ile boyanarak hemasitometre üstünde sayıldı. Tripan mavisi analizine göre, elde edilen hücrelerin canlılık oranı %95’ten fazlaydı. Hücreler endotelial büyüme besiyeri ile sırasıyla kuyucuk başına 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 7500 ve 10000 hücre olacak şekilde seyreltildi. Her kuyucuktaki ECM matriks üzerine, bu çeşitli yoğunluklardaki hücre süspansiyonundan 150µl konuldu ve hücreler damar oluşumu için 37 °C’lik %5’lik CO₂’li inkübatör içerisinde saatte bir faz-kontrast mikroskopunda damar oluşumu açısından incelendi. Hücrelerin oluşturduğu kapiller yapıları 3. saatte puanlandı.

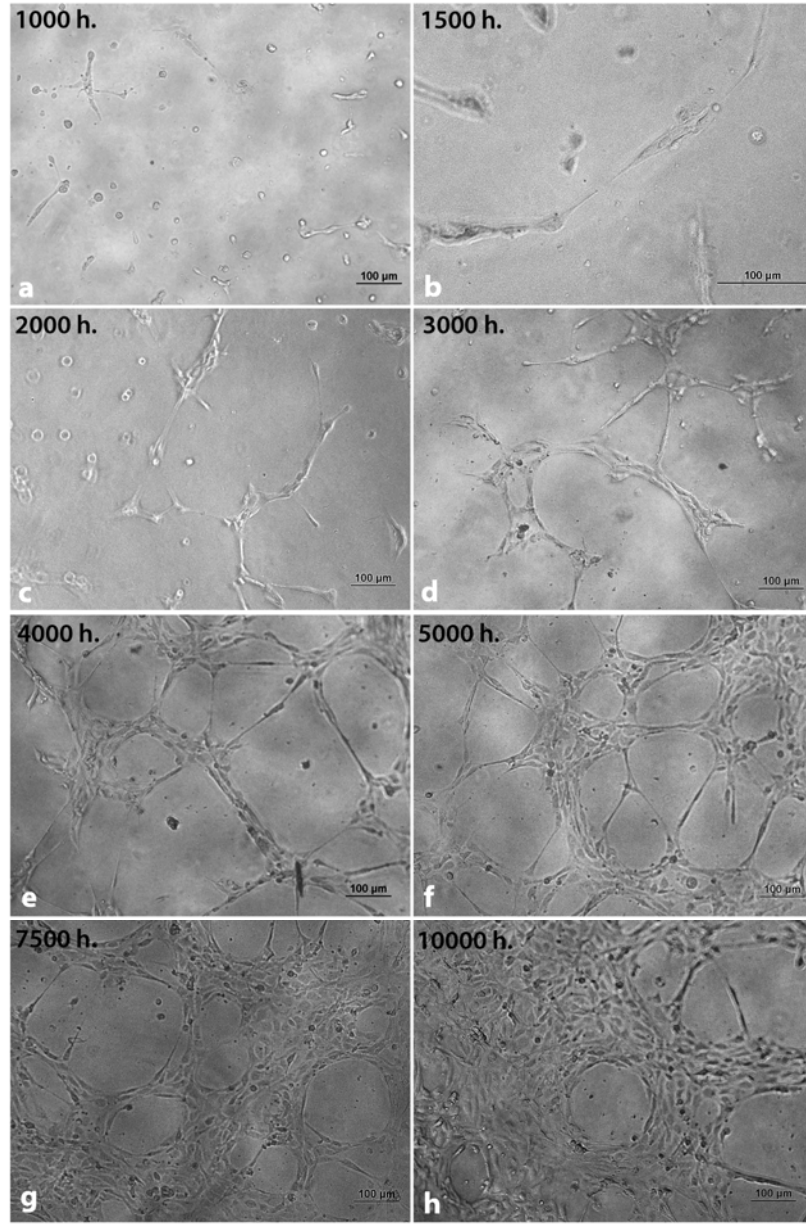
Endotelial büyüme besiyeri içindeki HUVEC hücreleri inkübasyonun 2. saatinde tüp oluşumuna başladılar. Tüp oluşumu 6. saate kadar devam etti ve 12 saatten sonra hücreler ölmeye, oluşan damar tüpleri gerilemeye başladı.

HUVEC hücrelerinin hangi hücre konsantrasyonunun “Hofbauer hücresi-yönlendirilmiş besiyeri” ile yapılacak anjiyogenez deneyinde kullanılabileceğini belirlemek için, 3. HUVEC hücrelerinin 3.saatteki anjiyogenik kapasiteleri puanlandırıldı. Bu puanlamaya göre, hücreler dağınık ve bireysel hücreler şeklinde ise “0” puan; hücreler göç etmeye ve sıraya girmeye başlamışsa “1” puan; kapiller tüpler belirgin ancak tomurcuklanma henüz yoksa “2” puan; yeni kapillerler oluşmuş ve tomurcuklanma mevcutsa “3” puan; kapillerler çokgenler oluşturmuşsa “4” puan; kompleks bir ağısı (mesh) yapı oluşmuşsa “5” puan verildi.

Bu puanlama sistemine göre, incelemeye en verimli damar yapıları 4-5 puan alan hücre konsantrasyonları oluşturdu. Çünkü 3 puanın altında incelemeye değer tüp yapılarının sayısı oldukça az, 5 puandaki damar yapıları ise çok sıkıştıktı. 4000 hücreden az hücrenin ekildiği kuyucuklardaki anjiyogenik kapasite 0 ile 3 puan arasında puanlar alırken, 4000 hücre ve fazlasının ekildiği kuyucuklar 4 ile 5 puan arasını aldılar (Şekil 4.4.4.1). En iyi puanı alan hücre konsantrasyonunun 4,5 puanla 5000 hücrelik konsantrasyon olduğunu belirledik (Şekil 4.4.4.2) ve “Hofbauer hücresi-yönlendirilmiş besiyeri” ile yapılacak anjiyogenez deneyinde bu 5000 hücrelik konsantrasyonu kullandık.

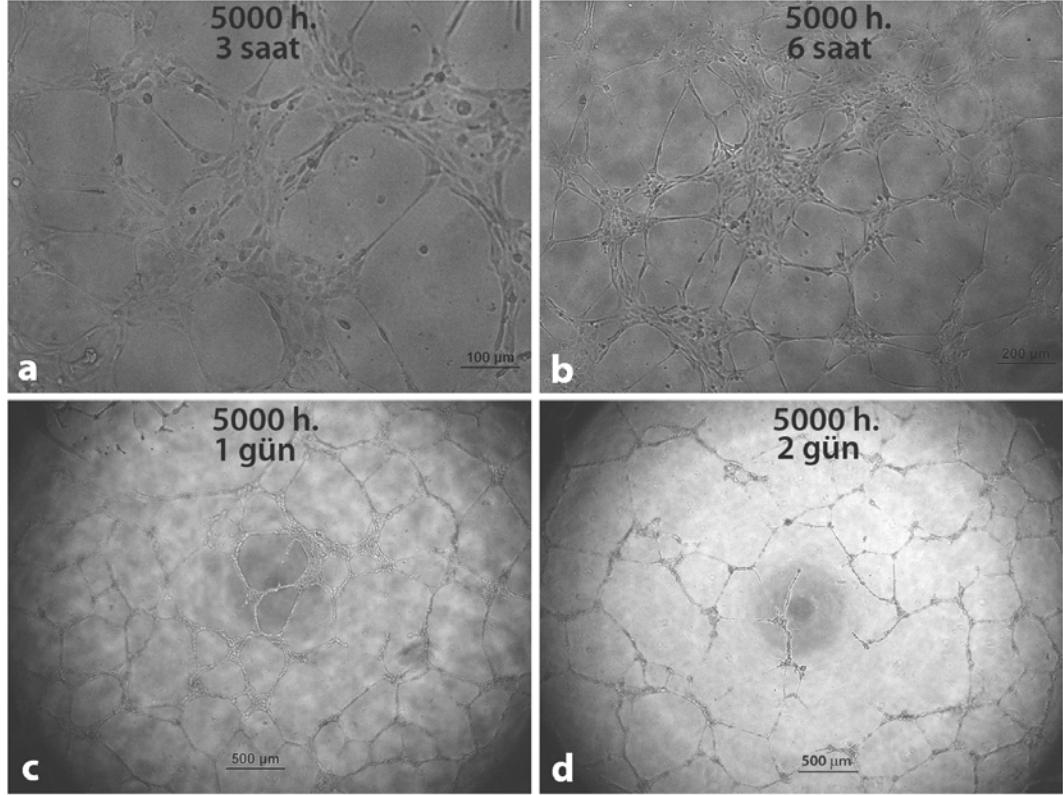


Şekil 4.4.4.1. Farklı konsantrasyondaki HUVEC hücrelerinin anjiyogenik puanları.



Şekil 4.4.4.2. HUVEC hücrelerinin ESM matriks içinde endotelial büyüme besiyeri ile 3 saat inkübasyonu ile yapılan anjiyogenez deneyinin görüntüleri. a) 1000 hücre konulan kuyucuklarda, hücreler tüp oluşturmadılar. b) 1500 hücre konulan kuyucuklarda, hücreler birbirleri ardına dizilip ilk tüpçükleri oluşturmaya başladılar. c) 2000 hücre konulan kuyucuklarda, hücrelerin oluşturduğu kapillerlerden tomurcuklar çıkmaya başladı. d) 3000 hücre konulan kuyucuklarda, hücrelerin oluşturduğu kapillerler hem tomurcuklanma gösterdi, hem de yavaş yavaş çokgenler oluşturmaya başladılar. e) 4000 hücre konulan kuyucuklarda, kapillerler artan sayıda çokgenler oluşturmaya başladı. f) 5000 hücre konulan kuyucuklarda, kapiller çokgenlerin sayısının arttığı ve kapillerlerin tomurcuklanmaya devam ettiği görüldü. g) 7500 hücre konulan kuyucuklarda, kapillerlerin sayısının artmasıyla ağısı bir yapı oluştu. h) 10000 hücre konulan kuyucuklarda, kapillerler birbirlerine yapışmaya ve çokgenlerin daralmaya başladığı görüldü.

5000 hücrenin koyulduğu kuyucuklarda zamana bağlı bir inkübasyon yapıldığında çokgenler oluşturmuş kapillerlerin 3. saatte oluştuğu gözlemlendi. 6. saatte bu çokgenlerin duvarları artan sayıdaki kapillerlerden dolayı kalınlaştı. 24 saat inkübasyonda endotel hücrelerinin ölümüne bağlı olarak kapiller ağ gevşedi ve 48 saat sonunda birbirlerinden kopmaya başladılar (Şekil 4.4.4.3).

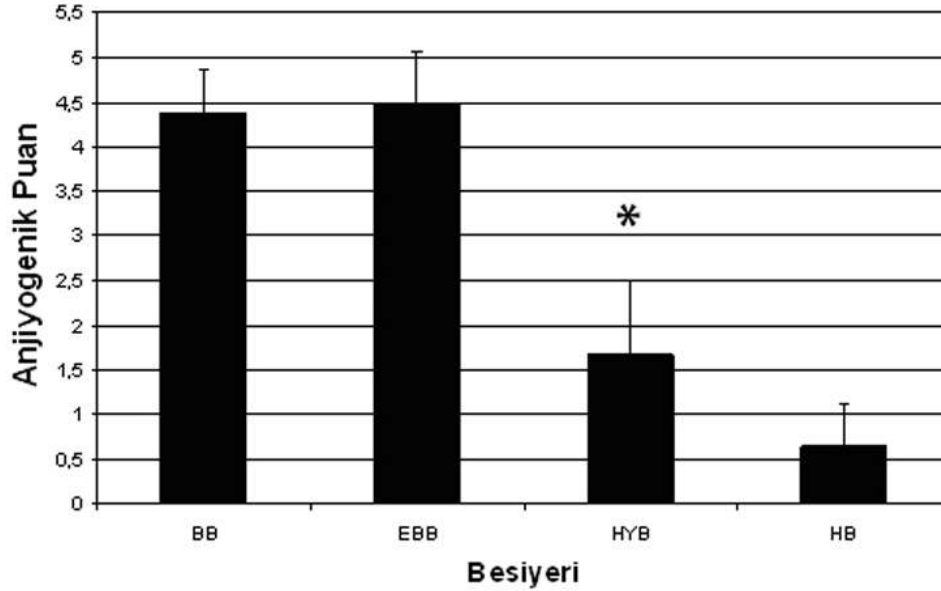


Şekil 4.4.4.3. Anjiyogenez deneyinin zamana bağlı ilerleyişi. a) 5000 hücre konulan kuyucuklarda, 3. saat sonunda oluşan kapillerler görülmektedir. b) 6 saat sonra, kapillerlerin sayılarının arttığı ve çokgen yapılarının duvarlarının kalınlaştığı izlenmektedir. c) 24 saat sonunda, oluşan kapillerlerin gerilemeye başlamasıyla, çokgenlerin genişliği artmıştı. d) 48. saatte endotel hücrelerinin ölümüne bağlı olarak kapillerlerin birbirlerinden koptuğu ve yapının bozulduğu görülmektedir.

4.4.4.2. Hofbauer Hücresi-Yönlendirilmiş Besiyeri ile Yapılan Anjiyogenez Deneyinin Bulguları

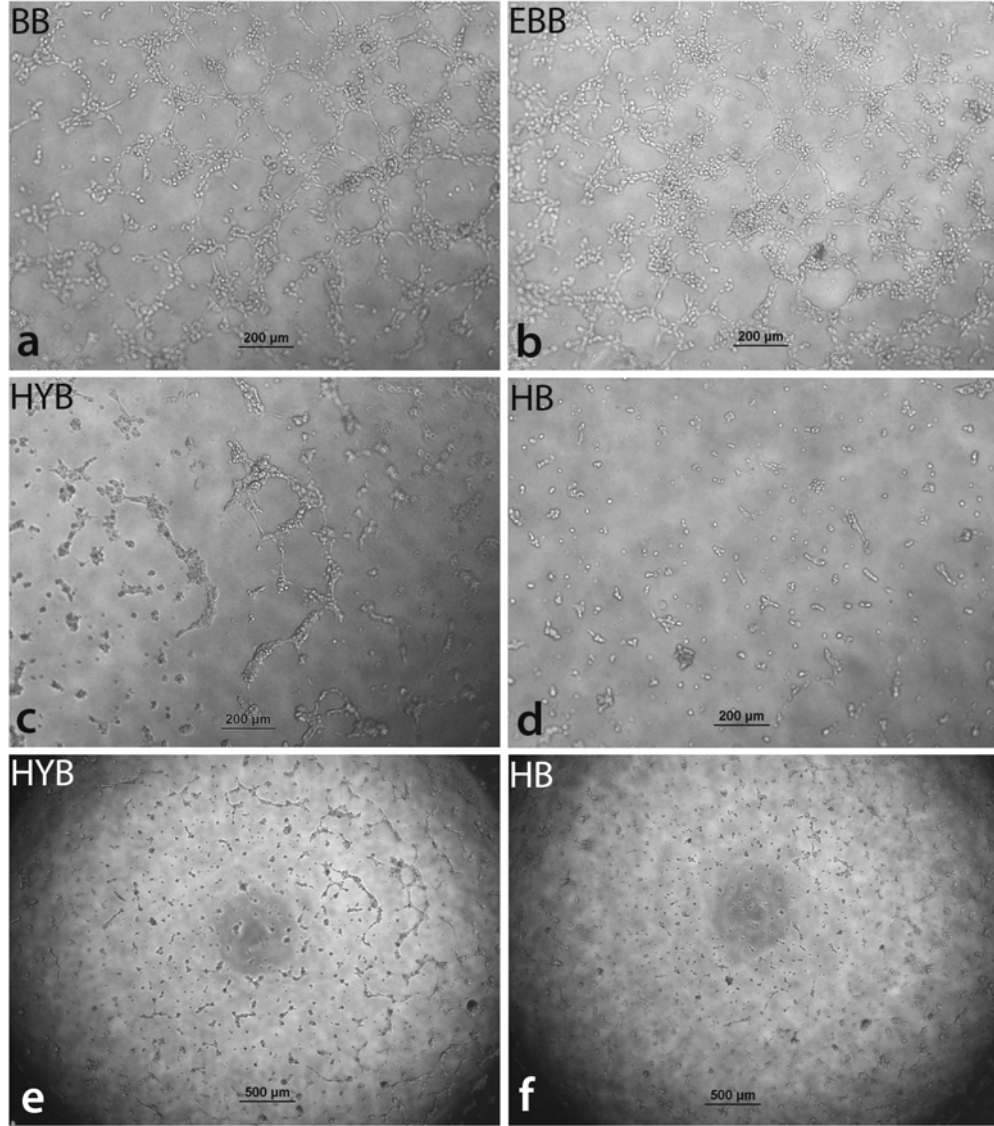
HUVEC hücreleri ile yapılan anjiyogenez deneyinde belirlenen en uygun HUVEC hücre sayısı, yani 4000 ve 5000 hücre, Hofbauer-yönlendirilmiş besiyeri ile anjiyogenez deneyine tabi tutuldu.

Hücreler Hofbauer hücresi-yönlendirilmiş besiyeri (HYBB) içinde kuyucuklara eklendi. Kontrol olarak, endotelyal büyüme besiyeri (EBB), Hofbauer-Besiyeri (HB), endotelyal bazal besiyeri (BB) kullanıldı. Hücreler saatte bir faz kontrast mikroskobunda damar oluşumu açısından incelenerek 3. saatte hücrelerin oluşturduğu kapiller yapıları puanlandırıldı (Şekil 4.4.4.4).



Şekil 4.4.4.4. Hofbauer hücresi-yönlendirilmiş besiyerinin anjiyogenik kapasitesi. Hofbauer hücresi-yönlendirilmiş besiyeri ile inkübe edilen HUVEC hücreleri, bol miktarda anjiyogenik faktörler içeren endotelyal hücre büyüme besiyeri ile inkübe edilenler kadar yüksek bir anjiyogenik aktivite göstermediler. Ancak, sadece Hofbauer besiyeri ile inkübe edilen HUVEC hücrelerine göre anlamlı olarak daha yüksek anjiyogenik aktivite gösterdiler ($p<0.05$).

Hofbauer hücresi-Yönlendirilmiş Besiyeri (HYBB) ile yapılan anjiyogenez deneyinde, Hofbauer hücrelerini kültüre etmek için kullanılan, fakat içinde Hofbauer hücresi kültüre edilmemiş Hofbauer Besiyeri (HB) kontrol olarak kullanıldı. Kısacası HB; Hofbauer hücrelerinden kaynaklanan herhangi bir faktör içermemekteydi. Buna göre, Bazal Besiyeri (BB) ve Endotelyal Büyüme Besiyeri (EBB) ile yapılan anjiyogenez deneyinde HUVEC hücreleri bol miktarda kapillerler ve poligonlar oluştururken, HYB ile yapılan deneyde daha az sayıda kapiller oluşumu gözlemlendi (Şekil 4.4.4.5). HYB ile yapılan deney, kendi kontrolü olan HB ile karşılaştırıldığında, HYB ile yapılan deneyde HUVEC hücrelerinin az sayıda da olsa kapillerler oluşturdukları ve bu kapillerlerin tomurcuklandığı ve yarım poligonlar oluşturdukları görüldü. HB ile yapılan deneyde hücreler birbirlerinden bağımsız, bireysel hücreler olarak izlendi ve kapiller oluşumu yoktu.



Şekil 4.4.4.5. Hofbauer hücresi yönlendirilmiş besiyeri ile yapılan Anjiyogenez deneyinin görüntüleri. a) Bazal Besiyeri (BB) ile HUVEC hücrelerinin kapillerler oluşturduğu gözlenmektedir. b) Endotelyal Büyüme Besiyeri (EBB) ile yapılan deneyde de BB ile yapılabilecek kadar kapiller oluşum elde edildi. c) Hofbauer hücresi-Yönlendirilmiş Besiyeri (HYB) ile yapılan anjiyogenez deneyinde HUVEC hücrelerinin BB veya EBB deki kadar kapiller oluşturmadığı, ancak oluşan az sayıda kapillerlerin tomurcuklanma gösterdiği ve hatta poligonlar oluşturdukları gözlemlendi. d) İçinde Hofbauer hücresi kültür edilmemiş Hofbauer Besiyeri (HB) ile yapılan anjiyogenez deneyinde neredeyse hiç kapiller oluşum gözlenmedi.

TARTIŞMA

Plasenta, fetüsü koruyan ve gelişmesinde önemli roller oynayan çok yönlü bir organdır. Bu organda görülebilen, villus sayısı, çapı ve bunların yüzey alanının azalması ile damar sayılarındaki temel yapısal değişimler, plasental araştırmalarda önemlidir. Villuslardaki damarların lümen genişlikleri ve dallanmalarının azalması, plasentanın yapısal bozukluklarıdır. Plasentada görülmesi muhtemel tüm bu yapısal bozukluklar, fetal büyüme geriliğine neden olabilmektedir (170). Bütün bu anomaliler fetüsü gerekli besinlerden yoksun bırakarak büyümesini engeller. Plasentanın gelişimi birçok faktörün etkisi altında ise de, plasental villusların gelişmesi, damar ağıyla birlikte ve o derecede de doğru orantılı olarak gerçekleştiğinden dolayı “damar gelişimi”, sağlıklı plasentanın gelişimi için büyük önem arz etmektedir.

Plasental damar gelişiminde hem “vaskülogenez” hem de “anjiyogenez” görev alır. Vaskülogenez; ilk damar ağının endotel hücrelerinin öncüllerinden oluşturulması işlemi iken, anjiyogenez; bu oluşturulan ilkel damar ağının taslak olarak kullanılarak daha da genişletilmesi işlemidir (105). Diğer bir ifade ile anjiyogenez, mevcut olan damar endotelinden yeni damarların oluşması olayıdır.

Günümüze kadar yapılan birçok çalışma, insan plasentasında vaskülogenez ve anjiyogenezi ele almasına rağmen (51, 106, 150, 171, 172), bu çalışmalardan hiçbiri Hofbauer hücrelerinin bu işlemlerdeki rollerini araştırma konusu yapmamıştır. Çalışmamızda, plasental vaskülogenez ve anjiyogenezin yoğun olarak görüldüğü erken dönem (1. Trimester) insan plasentalarında, Hofbauer hücrelerinin bu işlemlere doğrudan bir katkısının bulunup bulunmadığını araştırdık.

Plasental villusların stroması, “Hofbauer hücresi” adıyla anılan mezenşimal kökenli plasental makrofajlar içermektedir. Bu hücrelerin, immün komplekslerin tanınması ve antijen sunan hücre olarak görev yapmaları gibi immünolojik rollerinin yanı sıra, stromal sıvı dengesinin sağlanması, morfogenezi ve doku modellenmesini yönlendirme (173) ve diğer plasental hücreler üzerinde çeşitli etkiler gösterme (174, 175) gibi roller üstlendikleri bilinmektedir (24, 35).

Anteby ve ark. (176) tarafından yapılan yeni bir çalışmaya göre, Hofbauer hücrelerinin dallanma morfogenezi ve büyüme faktörleri sinyal yollarında rol alan “Sprouty-Dallanma” proteinlerini eksprese ettikleri gösterilmiştir. Bu araştırmacılar, plasentada Hofbauer hücreleri tarafından eksprese edilen “Spry” nin plasental villöz dallanmada rolü olabileceğini öne sürmüşlerdir. Daha önce de bahsedildiği gibi; villus olgunlaşması esnasında, villus dallanması ve damar ağının gelişimi arasında sıkı bir

ilişki olduğundan dolayı, çalışmamızda da gösterildiği üzere, Hofbauer hücrelerinin damar gelişiminde de etkili olabilecek faktörleri barındırmaları ve salgılamaları kaçınılmazdır. Ayrıca, plasental makrofajlar olan Hofbauer hücrelerinin erken dönemlerde villus özünde belirmesi, bu hücrelerin plasental vaskülogenez ve anjiyogenezle ilişkili olabilecekleri hipotezini güçlendirmektedir (35, 110).

Daha önceki bir çalışmamızda, anjiyogenik hücre kordonlarının (AHK), villus eksenine paralel olarak büyüyen ilkel damar tüplerine (DT) dönüşecek olan, ilk damar motiflerini oluşturduklarını bildirmiştik (159). Erken dönem insan plasentaları damar oluşumları (AHK ve DT) ve Hofbauer hücreleri açısından incelendiğinde, in vivo durumda Hofbauer hücrelerinin anlamlı bir çoğunluğunun vaskülogenez ve anjiyogenezin görüldüğü alanlara yakın yerleştiğini tespit ettik. Hofbauer hücrelerinin i) AHK ve DT'lere temas ettikleri veya temas edecek kadar yakın yerleşmeleri; ii) İki AHK veya iki DT arasına yerleşerek ara bağlantılar gibi davranmaları; iii) birbirleri ardına villus eksenine paralel olarak sıralanarak ilkel damar ağını oluşturacak ana damar motiflerine adeta rehberlik etmeleri; iv) AHK ve DT hücreleri arasına doğru uzanmaları ve v) villus özünde sayıca damar yapıları ile anlamlı olarak ilişkide olmaları şeklindeki bulgularımızın tümü, Hofbauer hücrelerinin vaskülogenez ve anjiyogeneze katıldıkları yönünde güçlü kanıtlardır. Konfokal mikroskop incelemeleri ile de, Hofbauer hücrelerinin bu özel yerleşimlerinin tek düzlemde değil, villus özü boyunca devam ettiğini gösterdik. Bu orijinal bulgular ilk kez çalışmamız tarafından tarif edilmiştir.

Damarlanmanın kontrolü ve düzenlenmesi oldukça karmaşıktır ve hem vaskülogenezi hem de anjiyogenezi farklı türde etkileyebilen çeşitli faktörlerin dengesini ve etkileşimini gerektirir. Her iki damar oluşumu işlemi, reseptörleri üzerinden etki gösteren VEGF, Ang-1 ve Ang-2 gibi çeşitli faktörler tarafından düzenlenir. Bu faktörler, damar destabilizasyonu/stabilizasyonu, endotel hücreler ve öncüllerinin göçü ve çoğalması gibi önemli işlemlerden sorumludurlar (177). Plasental dokularda bu faktörlerin dağılımı ve fonksiyonları oldukça dikkat çeken konulardır.

Bu faktörlerden en çok çalışılanı olan VEGF'in vaskülogenez ve anjiyogenezi endotel hücrelerinin çoğalması, göçü ve filizlenmesini ve endotel hücrelerin tüp-benzeri yapıları oluşturmalarını indükleyerek başlattığı bilinmektedir. VEGF bu olayları iki yüzey reseptörü olan Flt-1 ve Flk-1 üzerinden yapmaktadır (162, 178). VEGF'in Flk-1'e bağlanması endotel hücre farklılaşması ve çoğalmasını indüklerken (179), Flt-1'e bağlanması endotel hücrelerinin birbirleri ile etkileşimine ve tüp oluşumuna neden olur (180). Şimdiye kadar birçok çalışma, plasentada bu faktör ve reseptörlerinin varlığını göstermiştir (181, 182). Her ne kadar plasentada damar gelişiminin düzenlenmesi anlaşılmış olsa da, Hofbauer hücrelerinin bu olaydaki rolleri belirli değildir. Çalışmamızda VEGF ve reseptörleri immünohistokimya yöntemi ile bu hücrelerde belirlenmiştir. Bulgularımıza göre Hofbauer hücreleri VEGF proteinini oldukça yoğun bir şekilde eksprese ettiler. Bu hücreler aynı zamanda yine yoğun bir Flk-1 ve ona göre biraz daha az olmak üzere, Flt-1 reseptörlerini de eksprese ettiler. Hofbauer hücrelerinin

VEGF eksprese etmeleri, bu hücrelerin, VEGF reseptörleri içeren ve yakın yerleştikleri anjiyogenik hücreleri ve primitif endotel hücrelerini parakrin yoldan etkileyerek plasental anjiyogeneze ve vaskülogeneze katıldıklarına işaret etmektedir. Nitekim, VEGF'in endotel hücrelerinden, monositleri ortama çağıran, monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1)'in salınımını arttırdığı gösterilmiştir (183). Bir başka çalışmada, rekombinant insan VEGF'inin Flt-1 üzerinden monositlerin göçünde maksimal etkisi olduğu gösterilmiştir (184). Ayrıca monosit sayılarının arteriyogeneze ilişkili olduğu (185) ve monositlerin ortamdan uzaklaştırılmasının fare ve tavşanda kollateral büyümeyi ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (186). Bütün bu bilgilerin ışığında, Hofbauer hücrelerinden salınan VEGF'in damarlanmada rolleri olabilecek hücrelerin ortama çağırılmasında da etkili olabileceklerini öne sürmekteyiz. Ayrıca, gebeliğin ileriki dönemlerinde, fetal kökenli monositlerin villöz stromaya geçerek Hofbauer hücrelerine olgunlaşabileceği ve heterojen bir Hofbauer popülasyonunun oluşmasında MCP-1 'in rolü olabileceğini düşünmekteyiz. Dolayısıyla, Hofbauer hücrelerinden salgılanan VEGF, endotel hücrelerinden salgılanan MCP-1'i arttırarak, Hofbauer hücrelerinin stromada kendi sayılarını düzenlemelerine yardımcı olabilir.

Daha önceki bir çalışmamızda trofoblastların da VEGF reseptörlerini eksprese ettikleri gösterilmiştir (159). Dolayısıyla Hofbauer hücreleri, salgıladıkları VEGF ile trofoblastları da parakrin yönden etkileyebilirler. Nitekim Khan ve ark. (175)'in yaptıkları çalışmada, Hofbauer hücresi yönlendirilmiş besiyeriyle kültüre edilen trofoblastların büyüme ve farklılaşmaya gittikleri gösterilmiştir. Bunun nedeninin ise Hofbauer hücreleri tarafından salgılanan VEGF olduğu belirtilmiştir. Hofbauer hücrelerinin aynı zamanda VEGF reseptörlerin içermesi ise VEGF'in bu hücrelerde otokrin etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada, monositlerin Flt-1 reseptörleri içerdikleri ve bu reseptörlerin hem VEGF hem de PlGF ile aktive olduğunu göstermiştir (187). Böylece Flt-1'in monositlerde monosit kemotaksisinde ve prokoagulan aktivitesinde fonksiyonel işlev gören bir reseptör olduğunu öne sürmüşlerdir. Tüm bu bilgiler, Hofbauer hücrelerinin hem vaskülogenez ve anjiyogeneze üzerinden, hem "spry" proteinlerinin ekspresyonu ile villöz dallanma üzerinden, hem de trofoblastların çoğalmasına olan etkileri üzerinden plasental gelişime önemli katkılar yaptıklarını öne sürmektedir.

Anjiyopoietinler (Ang-1 ve Ang-2), Tie-1 ve Tie-2 üzerinden etki gösteren faktörlerdir (142). Her ne kadar Tie-1 için ligand tanımlanmamış olsa da, 2007'de Yuan ve arkadaşları, Ang-1'in, Tie-2 bağımlı bir tarzda Tie-1'i aktive ettiğini göstermiştir (143). Ang-1 ve Ang-2'nin her ikisi de Tie-2 için ligandır. Ang-1'in Tie-2'ye bağlanması, alt-yolak olaylarını başlatmak için Tie-2'nin fosforilasyonuna neden olurken, Ang-2, bu Ang-1/Tie-2 reseptör sinyalizasyonundaki olayları antagonize eder (125, 143). Ang-1, endotel hücrelerinin hayatta kalmasını, yeniden organizasyonunu, yeni oluşan kan damarlarının stabilizasyonu ve olgunlaşması için perisitler/damar düz kas hücrelerinin toplanmasını ve iş birliğini düzenler. Ang-2, damar sistemini destabilize eder, damar duvarlarını gevşetir ve peri-endotelyal mural hücreler ile endotelyal hücre temasını baskılar. Böylece endotelyal hücrelerini VEGF'in etkilerine karşı daha

erişilebilir hale getirir ve bu nedenle vaskülogenez ve anjiyogenezi destekler (145-148). Çalışmamızda Hofbauer hücrelerinin Ang-1 eksprese etmediklerini, buna karşın Ang-2 eksprese ettiklerini gösterdik. Plasentada 1. trimesterde vaskülogenezin baskın olduğu dönemde ilkel damarlar oluştuğundan ve bu damarların stabilizasyonunun daha sonraları gerçekleşmesinden dolayı Hofbauer hücrelerinin erken plasentada Ang-2 eksprese etmelerinin vaskülogenezi kolaylaştırdığını düşünmekteyiz. Hofbauer hücrelerinin Ang-2 eksprese etmeleri, bu hücrelerin damar Ang-1 ile sağlanan damar olgunlaşması işleminden çok, damar destabilizasyonu aracılığıyla endotel hücreleri üzerine VEGF'in etkisini arttırdıklarını göstermektedir. Çalışmamızda Hofbauer hücreleri orta şiddette bir Tie-1 ekspresyonu gösterirken, neredeyse yok denecek kadar az Tie-2 ekspresyonu göstermiştir. Tie-1'in ligandı ve fonksiyonları bilinmediğinden dolayı Hofbauer hücrelerinde Tie-1'in neden bulunduğu araştırmaya değer bir gizemdir.

Çalışmamızda, Hofbauer hücrelerinde VEGF kadar potent bir anjiyogenik faktör olan Netrin'in varlığı, ilk kez gösterildi. Netrin-1'in, vaskülogenez ve anjiyogenezin yoğun olarak görüldüğü plasentada bulunması HUVEC hücreleri ve damar düz kas hücrelerinin çoğalması ve göçüne neden olan bu faktörün, plasental vaskülogenez ve anjiyogenezi için önemli bir düzenleyici faktör olabileceğine işaret etmektedir. Hofbauer hücrelerinin VEGF ve Netrin-1 gibi potent anjiyogenik faktörleri salgılamaları, bu hücrelerin vaskülogenez ve anjiyogenezi için önemini bir kez daha göstermektedir.

Hofbauer hücrelerinin fonksiyonlarının daha iyi anlaşılması için in vitro çalışmalara gereksinim vardır. Hofbauer hücre izolasyonu literatürde sıklıkla rastlanamayan bir yöntem olup, daha önce belli başlı birkaç grup tarafından yapılmıştır (58, 176, 188-191). Yine de izolasyon yöntemleri açısından literatürde farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin bazı gruplar Hofbauer hücrelerini sadece "yapışma deneyi"yle (175, 191), bazıları ise önce "Fikol gradient santrifügasyonu ardından yapışma deneyi" (188), bazıları da "Fikol gradient santrifügasyonu, Perkol gradient santrifügasyonu ardından yapışma deneyi" (58) ile Hofbauer hücrelerini izole etmişlerdir. Yapılan çalışmaların hemen hemen hepsi, yapışma deneyinin plasental makrofajları izole etmenin en iyi yolu olduğunu öne sürmüş, hatta in vitro ortamda "yapışan plasental hücreler" (placental adherent cells=macrophages) terimini Hofbauer hücreleri için kullanmışlardır (175, 188, 191). Biz de çalışmamızda tüm bu yöntemleri tek tek denedik ve Hofbauer hücre canlılığı ve sayısı açısından en uygun tekniğin "Fikol gradient santrifügasyonu ardından yapışma deneyi" olduğunu belirledik. Bu teknikte, Fikol gradient santrifügasyonu ile plasental makrofajların bol bulunduğu bir hücre süspansiyonu elde edilmiş, ardından yapışma deneyi ile bol makrofaj bulunan bu süspansiyondaki makrofajların plastik yüzeylere diğer hücrelerden daha hızlı yapışma yeteneklerinden faydalanarak bu hücreler izole edilmiştir. İzole edilen hücreler karakterize edilmiş ve %94±3 saflığında Hofbauer hücreleri elde edildiği görülmüştür. Hofbauer besiyeri, içerdiği Na-Heparin nedeniyle fibroblast türevi hücrelerin kültürde üremesini engellemiş, trofoblast kontaminasyonu da tripsinizasyon ile engellenmiştir. Kültürdeki az miktardaki trofoblast kontaminasyonu, bu hücrelerin kültür kabına Hofbauer hücrelerinden daha zayıf tutunmaları nedeniyle tripsinizasyon işlemiyle daha

kısa sürede kaptan ayrılmış ve uzaklaştırılmışlardır. Fikol gradient santrifügasyonundan sonra bir de perkol gradientinin kullanılması, deneylerimizde izole edilen Hofbauer hücre sayısını azaltmıştır. Bunun nedeninin, oldukça küçük olan ve az hücre içeren 1. trimester plasentalarını izolasyon için kullanmamız olduğunu düşünmekteyiz. Diğer araştırmacıların çoğu Hofbauer izolasyon yöntemini daha büyük olan term plasentalarda yapmıştır (188, 190, 191).

İzole edilen Hofbauer hücrelerinin karakterizasyonu için en çok tercih edilen ve kullanılan belirteç CD68' dir (175, 176, 189-192). CD14, Hofbauer hücreleri için çok uygun olmayan bir belirteçtir, çünkü yapılan flow sitometri çalışmalarında izole Hofbauer hücrelerinin sadece %80'inin CD14-pozitif olduğu belirlenmiştir (189). CD14, lipopolisakkarit reseptör kompleksinin bir parçası, CD68 ise, lizozom-ilişkili membran protein ailesinin bir üyesidir (193). Plasental yatakta CD14-/CD68+ ve CD14+/CD68+ olan iki makrofaj ailesi tespit edilmiştir (193). Ayrıca, Guilbert ve ark. (194) trofoblastların da makrofajlar gibi CD14 eksprese edebildiklerini iddia etmiştir. Bu nedenden dolayı çalışmamızda Hofbauer hücrelerinin karakterizasyonu için daha çok CD68'i kullanmayı uygun gördük.

Plasentadan izole ettiğimiz hücrelerin karakterini belirlemek için immünolojik incelemelerin yanında elektronmikroskoptan da faydalandık. İzole ettiğimiz hücreler TEM de incelendiğinde, bu hücrelerin tamamının tipik Hofbauer hücresi morfolojisinde olduğunu gördük. Düzensiz, bol sitoplazmik uzantılı bir hücre yüzeyi, bol vakuollü sitoplazmaları ile bu hücreleri kolaylıkla ayırt ettik. Şimdiye kadarki çalışmaların hiçbirinde izolasyon tekniğinin ardından hücre karakterizasyonu için TEM kullanılmamıştır; çalışmamız bu açıdan bir ilktir.

Çalışmamızda izole edilen Hofbauer hücrelerinin kültürde de gözlendiği gibi, bu hücreler yuvarlak, oval, elipsoid veya uzamış (fusiform) şekillerde bulunabilmektedirler (18). Hofbauer hücrelerinin protein ekspresyon fenotipinin gebeliğin yaşına bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir (54). Hücrelerin şekillerindeki bu değişiklikler de, bu hücrelerin görevleri ile ilişkilidir. Örneğin daha düzensiz şekilli veya uzamış hücreler daha aktif ve hareketli hücreler iken, yuvarlak hücreler ise daha durağan hücrelerdir. Hofbauer hücrelerinin en belirgin özellikleri sayısız sitoplazmik uzantı ve vakuol içermeleridir (35). Bu vakuoller, izole ettiğimiz Hofbauer hücrelerinin faz-kontrast mikroskop görüntülerinde kolaylıkla ayırt edildi ve Hofbauer hücrelerinde köpüğümsü bir görüntü oluşturdu. Hatta izole edilen Hofbauer hücreleri TEM ile incelendiğinde, bu vakuollerin çeşitli sulu ve katı ekstrasellüler muhteviyatla dolu olduğu görüldü. Bu morfolojik ince yapı bulgularımız, Hofbauer hücrelerinin makrofaj karakterinde hücreler olduğunu ve plasental sıvı dengesini kontrol ettiklerini belirten çalışmaların (35) sonuçlarını teyit etmektedir.

Hofbauer hücrelerinin çok sıklıkla görülmesi de, bazılarının mitotik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (27). Bu mekanizmanın nedeni, Hofbauer hücrelerinin

koryonik villuslardaki sürekliliğinin sağlanması ve lokal mikroçevrenin gerektirdiği durumlarda sayılarını arttırabilmesi olabilir. Hofbauer hücrelerindeki mitozu bir başka açıklama da; bu hücrelerin gebeliğin ilerleyen günlerinde villuslarda beliren monositlerden bağımsız bir dinamizmle kendini-yenileme amacıyla bölünmeye gittikleri yönündeki görüşlerdir (27). Takahashi ve ark. (28)'e göre, gebeliğin 10. gününde fare plasentasının villuslarındaki kan damarlarında ilkel plasental makrofajlar belirir ve bunlar olgunlaşarak fetal makrofajlara dönüşürler. Koryonik villus stromasına göç etmeleriyle birlikte sıvı-benzeri maddeleri fagosite ederek Hofbauer hücrelerine dönüşürler. Yapılan çalışmalarda ilkel fetal makrofajların monosit/makrofaj popülasyonundan önce oluştuğu görülmüştür (28). İlkel plasental makrofajların çoğalması çok nadir görülen bir olaydır. Gebeliğin ilerlemesiyle birlikte, geç fetal dönemde villus özünde monosit/makrofaj popülasyonunun belirmesiyle heterojen bir plasental makrofaj popülasyonu oluşur. Çalışmamızda, İMİV kesitlerinde PCNA (Poliiferating Cell Nuclear Antigen- çoğalan hücre çekirdek antijeni) da CD68 ile birlikte çiftli immünohistokimya tekniği ile boyanmış, ancak belirtilen literatürlerle uyumlu olarak Hofbauer hücrelerinde PCNA'ya, dolayısıyla çoğalmaya rastlamadık (veriler sunulmamıştır). Bundan dolayı, hücre kültürü çalışmalarımızda Hofbauer hücreleri anlamlı olarak çoğalma göstermediler.

Hofbauer hücre kültürlerinde anjiyogenik faktörlerin bulunup bulunmadığını araştırmak için, belirli sürelerle kültüre edilen Hofbauer hücrelerinin oluşturduğu "Hofbauer hücresi-yönlendirilmiş Besiyeri" (HYB) toplandı ve VEGF, Ang-1 ve Ang-2 için ELISA yöntemi ile incelememiz, bu çalışmanın fonksiyonel kısmını oluşturmaktadır. İmmünohistokimya yöntemi ile Hofbauer hücrelerinde VEGF varlığını göstermemiz daha önceki çalışmalarımızın bir teyidi idi. Ancak bu özelliğin ELISA ile de kanıtlanması gerekiyordu. Ayrıca, Hofbauer hücrelerindeki bu VEGF'in Hofbauer hücrelerine fagositoz yoluyla alınıp alınmadığını ELISA yöntemiyle netleştirdik. Araştırmamızın ELISA deney sonuçları, Hofbauer hücrelerinin zamanla miktarında artış gösteren VEGF salgıladıklarını kanıtlamaktadır. Böylece, immünohistokimyada gösterilen VEGF ekspresyonunun bu hücrelerin kendi üretiminin bir sonucu olduğu kanısına varıldı. Yine immünohistokimya bulgularımızla uyumlu olarak ELISA yöntemiyle de HYB'de Ang-1 proteini bulunmamasına karşın, Ang-2, HYB'de ELISA ile gösterildi. Bu deneylerin sonuçları, ELISA testleri ile de Hofbauer hücrelerinin anjiyogenik faktörler salgıladığını ve plasental damarlanmayı parakrin yünden etkileyebileceklerini göstermiştir. Serum içeren HYB'de serum içermeyen HYB'ye göre daha yüksek seviyede Ang-2 bulunmasını, serumda yer alan çeşitli büyüme faktörlerinin Hofbauer hücrelerinden Ang-2 salınımını arttırdığı şeklinde yorumladık.

Yetersiz vaskülogenez ve anjiyogenez sayısız fizyolojik ve patolojik olaylarla ilişkili olduğundan, anjiyogenik yanıtı kantitatif olarak inceleyebilmek için çeşitli in vivo ve in vitro teknikler geliştirilmiştir. Bunlardan en önemli ve en çok tercih edilenler: 1) mikrocerrahi korneal cep modeli, 2) tavuk koryoallantoyik membran deneyi, 3) subkutan disk implantasyonu ile anjiyogenez deneyi, 4) mezenterik pencere anjiyogenez deneyi, 5) in vitro anjiyogenez deneyi. In vitro ortamda anjiyogenezi sayısal

olarak test edebilmenin en uygun yolu “anjyogenez deneyi” olduğundan, çalışmamızda bu yöntem denendi. Çalışmamızın orijinal boyutu, farklı yöntemlerin ve teknik elemanların deney ortamında kullanılmasıdır. Bu bağlamda, konuyu teknik açıdan da değerlendirmek gerekir.

Hofbauer hücresi-yönlendirilmiş Besiyeri (HYB) ile yapılan anjyogenez deneyinde, HYB’nin Hofbauer hücresiyle hiç kültüre edilmemiş Hofbauer-Besiyeri (HB)’ne göre (yani kendi kontrolüne göre) HUVEC hücrelerinin daha fazla kapiller oluşturmaya ve dallanmasına neden olduğunun gözlenmesi ilginçti. Hatta, HYB ile inkübe edilen HUVEC hücreleri az da olsa poligonlar bile oluşturabildiler. Halbuki, HB ile inkübe edilen hücreler sadece dağınık, bireysel hücreler şeklinde kaldılar. HYB ve HB ile yapılan anjyogenez deneylerinde oluşan anjyogenik yapılar puanlandırıldığında, HYB’nin , HB’ye göre anlamlı olarak daha yüksek bir anjyogenik potansiyele sahip olduğu görüldü. İmmünohistokimya ve ELISA bulgularına dayanarak, Hofbauer hücrelerinin HYB içine salgıladıkları anjyogenik faktörlerin (özellikle VEGF, Netrin-1 ve Ang-2) belirlenen anjyogenik potansiyelin nedeni olduğunu öne sürmekteyiz. Bu sayede Hofbauer hücrelerinin ve salgıladıkları faktörlerin, ilkel damar yapıları ile etkileşerek plasental vaskülogenez ve anjyogenezle doğrudan ilişkili olduklarını gösterdik. Böylece, Hofbauer hücrelerine bilinen diğer fonksiyonlarından başka önemli bir rol daha atfetmiş olduk.

Rehman ve ark. (195), periferik kandan izole edilen endotelial progenitör hücrelerin (EPH) büyük çoğunluğunun CD14, Mac-1 ve CD11c gibi monosit/makrofaj belirteçlerini eksprese ettiklerini ve alıcı hayvanlara verilmeleri durumunda anjyogenezi indükleyebildiklerini göstermişlerdir. Bu grup, periferik kandan mononükleer hücreleri yapışma deneyi, ardından yapışmayan hücrelerin yıkanarak uzaklaştırılması ile elde etmiştir. Yapışabilen hücrelerin aynı zamanda “asetile LDL alınımı” ve “uleks lektin”i bağlama” özellikleri ile endotel fenotipi gösterdiklerini belirtmişler ve bu hücreleri EPH olarak tanımlamışlardır. Monositlerin salgıladıkları anjyogenik faktörlerin yanı sıra, endotel-benzeri hücrelere farklılaşabilmeleri sayesinde de anjyogenik etki gösterebilecekleri de öne sürülmüştür (196, 197). Başka bir çalışmada kandan izole edilen monositlerin EPH özelliklerini gösterdikleri, ancak in vitroda vasküler yapılar oluşturamadıkları gösterilmiştir (198). Sonuç olarak monositlerin çeşitli deneysel modellerde endotel hücrelerini taklit edebildikleri söylenmektedir. Çalışmamızda Hofbauer hücrelerinin anjyogenik hücrelere ve damar endoteline yakın yerleşmeleri, aralarına uzanmaları ve bu esnada fusiform şekil almaları, hatta anjyogenik hücrelerin peşisıra yerleşmeleri, bu hücrelerin endotel-benzeri bir fonksiyon gösterebileceğini ve endotel hücrelerine hatta endotel-benzeri hücrelere farklılaşabileceklerini düşündürmektedir. Ayrıca, çalışmamızın sonuçlarına göre Hofbauer hücreleri hem VEGF, Ang-2 ve Netrin-1 gibi anjyogenik faktörleri, hem de bunlara ait reseptörlerden Flt-1, Flk-1 ve Tie-1 eksprese etmektedirler. Bu yönlerden de anjyogenik büyüme faktörlerine yanıt olarak çoğalan ve göç ederek olgun endotel hücrelerine farklılaşan embriyonik anjiyoblastlara benzer bir profil sergilemektedirler.

Sonuç olarak, çalışmamızda Hofbauer hücrelerinin plasental damarlanmadaki muhtemel rollerini araştırdık ve plasenta villus özünde erken dönemde beliren Hofbauer hücrelerinin, bu dönemde yoğun olarak yer alan vaskülogenez ve anjiyogeneze çeşitli anjiyogenik faktörler salgılayarak veya çeşitli reseptörler eksprese ederek katıldıklarını gösterdik. VEGF, Netrin-1 ve Ang-2 eksprese eden Hofbauer hücrelerinin damar yapılarına yakın yerleşmeleri, bu hücrelerin vaskülogenez ve anjiyogeneze kritik roller oynadıklarını göstermektedir. Aniyogenez deneyleriyle de Hofbauer hücrelerinin salgıladıkları bu faktörlerin endotel hücrelerinin kapiller oluşumunu arttırdığını gösterdik. Dolayısıyla, plasental villuslarda bulunan Hofbauer hücreleri sadece plasentanın makrofajları değil, aynı zamanda plasenta gelişmesi ve sağlıklı fetüs oluşumu için en önemli olaylardan biri olan vaskülarizasyon işleminin gerçekleşmesinde rol alan çok fonksiyonlu hücrelerdir.

Çalışmamız plasental villus stromasının makrofajları olan Hofbauer hücrelerinin, plasenta için en önemli işlem olan damarlanmada rol aldıklarını gösteren ilk çalışmadır. Hofbauer hücrelerinin plasental vaskülogenez ve anjiyogenezdaki rollerinin aydınlanması, normal plasentasyonu kontrol eden mekanizmalar ve plasentasyon sırasında oluşabilecek vasküler gelişim bozukluklarının yol açtığı pre-eklampsi ve intrauterin büyüme geriliği gibi hastalıkların patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına yol açacaktır. Bu nedenden dolayı, normal plasentasyon mekanizmalarının açığa çıkarılması için, Hofbauer hücrelerinin izole edildiği in vitro deneyler ile yapılacak başka fonksiyonel çalışmalara gereksinim vardır.

SONUÇLAR

Bu tezde, Hofbauer hücrelerinin plasental damarlanmadaki muhtemel rolleri araştırılmış ve elde edilen sonuçlar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir.

1- İnsan plasenta dokularından alınan örneklerle uygulanan çiftli immunohistokimyasal analizler sonucunda, Hofbauer hücrelerinin anjiyogenik hücre kordonları ve damar tüpleri ile yakın ilişkide oldukları belirlenmiştir. Bu özel yerleşim düzeni, Hofbauer hücrelerinin vaskülogenez ve anjiyogenezele yakından ilgili oldukları hipotezini güçlendirmiştir.

2- Deneylerimiz sonucunda Hofbauer hücrelerinin VEGF, Ang-2 ve Netrin-1 gibi anjiyogenik faktörler ve bunlara ait reseptörleri eksprese ettikleri gösterilmiştir. Hofbauer hücrelerinin bu faktörleri villus stromasına salgılamak suretiyle, yakın yerleştikleri anjiyogenik hücre kordonları ve damar tüplerinin endotel hücrelerinin çoğalma ve farklılaşmasını parakrin yoldan indüklediğini düşündürmektedir.

3- İzole Hofbauer hücrelerinin kültüre edilmesi sonucunda, salgıladıkları faktörleri içeren “Hofbauer hücresi yönlendirilmiş-Besiyeri”, ELISA yöntemi ile incelenmiş ve Hofbauer hücrelerinin VEGF ve Ang-2 salgıladıkları belirlenmiştir.

4- Hofbauer hücrelerinin fonksiyonel olarak vaskülogenez ve anjiyogenezi etkiledikleri, HUVEC hücreleri ile yaptığımız anjiyogeneze deneyiyle ispatlandı. ELISA yöntemi ile, içinde VEGF ve Ang-2 gibi anjiyogenik faktörlerin bulunduğunu gösterdiğimiz “Hofbauer hücresi-yönlendirilmiş Besiyeri” ile inkübe edilen HUVEC hücrelerinin, herhangi bir Hofbauer hücresi-kökenli büyüme faktörü içermeyen “Hofbauer-Besiyeriyle” inkübe edilen hücelere göre daha fazla kapiller oluşturmaları, Hofbauer hücrelerinin damar oluşumunu doğrudan yönlendirdiğini göstermektedir.

5- Hofbauer hücreleri, plasentanın sadece makrofajları değil, aynı zamanda plasenta için en önemli olaylardan biri olan damarlanma işleminin gerçekleşmesinde rol alan çok fonksiyonlu hücrelerdir.

6- Bu çalışma, Hofbauer hücrelerinin hem yapısal hem de fonksiyonel olarak plasenta gelişmesi ve damarlanmasından sorumlu öncelikli elemanlar olduklarını gösteren orijinal tek araştırmadır.

KAYNAKLAR

1. Boyd JD, Hamilton WJ. The Human Placenta. Cambridge: Heffer&Sons; 1970.
2. Denker HW. Trophoblast-endometrial interactions at embryo implantation: a cell biological paradox. *Trophoblast Res* 1990; 4: 1-27.
3. Psychoyos A. The implantation window: can it be enlarged or displaced? *Excerpta Med Int Cong Ser* 1988; 768: 231-232.
4. Heuser CH, Streeter GL. Development of the macaque embryo. *Contrib Embryol Carnegie Inst* 1941; 29: 15-55. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the human placenta. New York: Springer; 2006.
5. Wislocki GB, Streeter GL. On the placentation of the macaque (*Macaca mulatta*) from the time of implantation until the formation of the definitive placenta. *Contrib Embryol Carnegie Inst* 1938; 27: 1-66. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the human placenta. New York: Springer; 2006.
6. Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, Dixon G. Trophoblast invasion and the establishment of haemachorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta* 1981; 2: 71-92.
7. Welsh AO, Enders AE. Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration. *Am J Anat* 1985; 172: 1-29.
8. Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erbeni T, Kotowski A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat (Basel)* 1989; 136: 190-203.
9. King BF. Ultrastructural differentiation of stromal and vascular components in early macaque placental villi. *Am J Anat* 1987; 178: 30-44.
10. Kaufmann P, Scheffen I. Placental development. Orlando: Saunders; 1992.
11. Benirschke K. In, Fetal Homeostasis. New York: New York Academy of Sciences; 1965. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the human placenta. New York: Springer; 2006.
12. Castellucci M, Scheper M, Scheffen I, Celona A, Kaufmann P. The development of the human placental villous tree. *Anat Embryol (Berl)* 1990; 181: 117-128.
13. Castellucci M, Kaufmann P. Evolution of the stroma in human chorionic villi throughout pregnancy. *Bibl Anat* 1982: 40-45.

14. Castellucci M, Kaufmann P. A three dimensional study of the normal human placental villous core: II. Stromal Architecture. *Placenta* 1982; 3: 269-285.
15. Kaufmann P, Sen DK, Schweikhart G. Classification of human placental villi. I. Histology. *Cell Tissue Res* 1979; 200: 409-423.
16. Castellucci M, Zaccheo D, Pescetto G. A three dimensional study of the normal placental villous core. I. Hofbauer cells. *Cell Tissue Res* 1980; 210: 235-247.
17. Kaufmann P, Stark J, Stegner HE. The villous stroma of the human placenta. I. The ultrastructure of fixed connective tissue cells *Cell Tissue Res* 1977; 177: 105-121.
18. Martinoli C, Castellucci M, Zaccheo D, Kaufmann P. Scanning electron microscopy of stromal cells of human placental villi throughout pregnancy. *Cell Tissue Res* 1984; 235: 647-655.
19. Feller AC, Schneider H, Schmidt D, Parwaresch MR. Myofibroblast as a major cellular constituent of villous stroma in human placenta. *Placenta* 1985; 6: 405-415.
20. Demir R, Demir N, Kohnen G, Kosanke G, Mironov V, Ustunel I, Kocamaz E. Ultrastructure and distribution of myofibroblast-like cells in human placental stem villi. *Electron Microsc* 1992; 3: 509-510.
21. Sati L, Seval Y, Yasemin Demir A, Kosanke G, Kohnen G, Demir R. Cellular diversity of human placental stem villi: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Acta Histochem* 2007; 109: 468-479.
22. Durst-Zivkovic B. Das vorkommen der Mastzellen in der nachgeburt. *Anat Anz* 1973; 134: 225-229. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. *Pathology of the human placenta*. New York: Springer; 2006.
23. Benirschke K, Bourne GL. Plasma cells in immature human placenta. *Obstet Gynecol* 1958; 12: 495-503. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. *Pathology of the human placenta*. New York: Springer; 2006.
24. Castellucci M, Zaccheo D. The Hofbauer cells of the human placenta: morphological and immunological aspects. *Prog Clin Biol Res* 1989; 296: 443-451.
25. Wood GW. Mononuclear phagocytes in the human placenta. *Placenta* 1980; 1: 113-123.
26. Fox H. The incidence and significance of Hofbauer cells in the mature human placenta. *J Pathol Bacteriol* 1967; 93: 710-717. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. *Pathology of the human placenta*. New York: Springer; 2006.
27. Castellucci M, Celona A, Bartels H, Steininger B, Benedetto V, Kaufmann P. Mitosis of the Hofbauer cell: possible implications for a fetal macrophage. *Placenta* 1987; 8: 65-76.

28. Takahashi K, Naito M, Katabuchi H, Higashi K. Development, differentiation, and maturation of macrophages in the chorionic villi of mouse placenta with special reference to the origin of Hofbauer cells. *J Leukoc Biol* 1991; 50: 57-68.
29. Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M. The placenta cytokine network and inflammatory signals. *Placenta* 2006; 27: 794-798.
30. Wetzka B, Clark DE, Charnock-Jones DS, Zahradnik HP, Smith SK. PGE2 and TXA2 production by isolated macrophages from human placenta. *Adv Exp Med Biol* 1997; 433: 403-406.
31. Hofbauer J. Ueber das konstante vorkommen bisher unbekannter zelliger Formelemente in der chorionzotte der menschlichen Plazenta und ueber embryotrophe. *Wien Klin Wochenschr* 1903; 16: 871-873. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. *Pathology of the human placenta*. New York: Springer; 2006.
32. Hofbauer J. Grunzuege einer Biologie der menschlichen Plazenta mit besonderer Beruecksichtigung der Fragen der foetalen Ernaehrung. Vienna; 1905. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. *Pathology of the human placenta*. New York: Springer; 2006.
33. Schmidt W. Der Feinbau der reifen menschlichen Eihaut. *Z Anat Entwicklungsgesch* 1956; 119: 203-222. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. *Pathology of the human placenta*. New York: Springer; 2006.
34. Virchow R. *Cellularpathologie in ihrer begruendung auf physiologische und pathologische gewebelehre*. Berlin; 1871. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. *Pathology of the human placenta*. New York: Springer; 2006.
35. Demir R, Erben T. Some new findings about Hofbauer cells in the chorionic villi of the human placenta. *Acta Anat (Basel)* 1984; 119: 18-26.
36. Enders AC, King BF. The cytology of Hofbauer cells. *Anat Rec* 1970; 167: 231-252.
37. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. *Pathology of the human placenta*. New York: Springer; 2006.
38. Katabuchi H, Naito M, Miyamura S, Takahashi K, Okamura H. Macrophages in human chorionic villi. *Prog Clin Biol Res* 1989; 296: 453-458.
39. Frauli M, Ludwig H. Immunocytochemical identification of mitotic Hofbauer cells in cultures of first trimester human placental villi. *Arch Gynecol Obstet* 1987; 241: 47-51.
40. Castellucci M, Schweikhart G, Kaufmann P, Zaccheo D. The stromal architecture of the immature intermediate villus of the human placenta. Functional and clinical implications. *Gynecol Obstet Invest* 1984; 18: 95-99.

41. Chaletzky E. Hydatidenmole. Bern: University of Bern; 1891. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the human placenta. New York: Springer; 2006.
42. Wynn RM. Derivation and the ultrastructure of the so-called Hofbauer cell. *Am J Obstet Gynecol* 1967; 97: 235-248. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the human placenta. New York: Springer; 2006.
43. Wynn RM. Fetomaternal cellular relations in the human basal plate: an ultrastructural study of the placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1967; 97: 832-850.
44. Vacek Z. Derivation and ultrastructure of the stroma cells of the human chorionic villus. *Folia Morphol (Praha)* 1970; 18: 1-13.
45. Sorokin SP, Hoyt RF, Jr. Pure population of nonmonocyte derived macrophages arising in organ cultures of embryonic rat lungs. *Anat Rec* 1987; 217: 35-52.
46. Naito M, Yamamura F, Nishikawa S, Takahashi K. Development, differentiation, and maturation of fetal mouse yolk sac macrophages in cultures. *J Leukoc Biol* 1989; 46: 1-10.
47. Mebius RE, Martens G, Breve J, Delemarre FG, Kraal G. Is early repopulation of macrophage-depleted lymph node independent of blood monocyte immigration? *Eur J Immunol* 1991; 21: 3041-3044.
48. van Furth R. Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiology* 1982; 161: 178-185.
49. Moskalewski S, Ptak W, Czarnik Z. Demonstration of cells with IgG receptor in human placenta. *Biol Neonate* 1975; 26: 268-273.
50. Khansari N, Fudenberg HH. Functional heterogeneity of human cord blood monocytes. *Scand J Immunol* 1984; 19: 337-342.
51. Huppertz B, Peeters LL. Vascular biology in implantation and placentation. *Angiogenesis* 2005; 8: 157-167.
52. Prosdocimi O. Recherche istochimiche per la localizzazione delle sostanze gonadotrope nel tessuto coriale normale, nella mola vescicolare e corioepitelioma. *Riv Ostet Ginecol* 1953; 35: 133. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the human placenta. New York: Springer; 2006.
53. Kaufmann P, Stark J. Semidünschnitt-sytochemische und immunautoradiographische Befunde zum Hormonstoff-wechsel der reifen menschlichen Placenta. *Anat Anz* 1973; 67: 245-249. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the human placenta. New York: Springer; 2006.
54. Goldstein J, Braverman M, Salafia C, Buckley P. The phenotype of human placental macrophages and its variation with gestational age. *Am J Pathol* 1988; 133: 648-659.

55. Johnson PM, Brown PJ. Review article: Fc gamma receptors in the human placenta. *Placenta* 1981; 2: 355-370.
56. Loke YW, Eremin O, Ashby J, Day S. Characterization of the phagocytic cells isolated from the human placenta. *J Reticuloendothel Soc* 1982; 31: 317-324.
57. Uren S, Boyle W. Isolation of macrophages from human placenta. *J Immunol Methods* 1985; 78: 25-34.
58. Zaccheo D, Pistoia V, Castellucci M, Martinoli C. Isolation and characterization of Hofbauer cells from human placental villi. *Arch Gynecol Obstet* 1989; 246: 189-200.
59. Wood GW, King CR, Jr. Trapping antigen-antibody complexes within the human placenta. *Cell Immunol* 1982; 69: 347-362.
60. Braunhut SJ, Blanc WA, Ramanarayanan M, Marboe C, Mesa-Tejada R. Immunocytochemical localization of lysozyme and alpha-1-antichymotrypsin in the term human placenta: an attempt to characterize the Hofbauer cell. *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 1204-1210.
61. Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum Pathol* 2004; 35: 47-54.
62. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406: 782-787.
63. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675-680.
64. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-2088.
65. Bulmer JN, Johnson PM. Macrophage populations in the human placenta and amniochorion. *Clin Exp Immunol* 1984; 57: 393-403.
66. Sutton L, Gadd M, Mason DY, Redman CW. Cells bearing class II MHC antigens in the human placenta and amniochorion. *Immunology* 1986; 58: 23-29.
67. Bulmer JN, Morrison L, Smith JC. Expression of class II MHC gene products by macrophages in human uteroplacental tissue. *Immunology* 1988; 63: 707-714.
68. Lessin DL, Hunt JS, King CR, Wood GW. Antigen expression by cells near the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988; 16: 1-7.
69. Corte G, Moretta A, Cosulich ME, Ramarli D, Bargellesi A. A monoclonal anti-DC1 antibody selectivity inhibits the generation of effector T cells mediating specific cytolytic activity. *J Exp Med* 1982; 156: 1539-1544.

70. Edwards JA, Jones DB, Evans PR, Smith JL. Differential expression of HLA class II antigens on human fetal and adult lymphocytes and macrophages. *Immunology* 1985; 55: 489-500.
71. Nakamura Y, Ohta Y. Immunohistochemical study of human placental stromal cells. *Hum Pathol* 1990; 21: 936-940.
72. Lamarre D, Ashkenazi A, Fleury S, Smith DH, Sekaly RP, Capon DJ. The MHC-binding and gp120-binding functions of CD4 are separable. *Science* 1989; 245: 743-746.
73. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Anti-Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol* 1983; 131: 212-216.
74. Wood GS, Turner RR, Shiurba RA, Eng L, Warnke RA. Human dendritic cells and macrophages. In situ immunophenotypic definition of subsets that exhibit specific morphologic and microenvironmental characteristics. *Am J Pathol* 1985; 119: 73-82.
75. Buckley PJ, Smith MR, Braverman MF, Dickson SA. Human spleen contains phenotypic subsets of macrophages and dendritic cells that occupy discrete microanatomic locations. *Am J Pathol* 1987; 128: 505-520.
76. Lewis SH, Reynolds-Kohler C, Fox HE, Nelson JA. HIV-1 in trophoblastic and villous Hofbauer cells, and haematological precursors in eight-week fetuses. *Lancet* 1990; 335: 565-568.
77. Torres G, Garcia V, Sanchez E, Segarra A, Patterson BK, Melendez-Guerrero LM. Expression of the HIV-1 co-receptors CCR5 and CXCR4 on placental macrophages and the effect of IL-10 on their expression. *Placenta* 2001; 22 Suppl A: S29-33.
78. Goyert SM, Ferrero EM, Seremetis SV, Winchester RJ, Silver J, Mattison AC. Biochemistry and expression of myelomonocytic antigens. *J Immunol* 1986; 137: 3909-3914.
79. Flynn A, Finke JH, Hilfiker ML. Placental mononuclear phagocytes as a source of interleukin-1. *Science* 1982; 218: 475-477.
80. Flynn A, Finke JH, Loftus MA. Comparison of interleukin 1 production by adherent cells and tissue pieces from human placenta. *Immunopharmacology* 1985; 9: 19-26.
81. Glover DM, Brownstein D, Burchett S, Larsen A, Wilson CB. Expression of HLA class II antigens and secretion of interleukin-1 by monocytes and macrophages from adults and neonates. *Immunology* 1987; 61: 195-201.
82. Yagel S, Hurwitz A, Rosenn B, Keizer N. Progesterone enhancement of prostaglandin E2 production by fetal placental macrophages. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987; 14: 45-48.

83. Uren SJ, Boyle W. Class II MHC antigen-positive macrophages from human placenta suppress strong MLR and CML reactions. *Cell Immunol* 1990; 125: 235-246.
84. Fruttiger M. Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 522-527.
85. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C947-970.
86. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
87. Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991; 53: 217-239.
88. Rogers PA, Abberton KM, Susil B. Endothelial cell migratory signal produced by human endometrium during the menstrual cycle. *Hum Reprod* 1992; 7: 1061-1066.
89. Smith SK. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 509-519.
90. Torry DS, Torry RJ. Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 21-29.
91. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364.
92. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
93. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* 1999; 18: 3964-3972.
94. Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997; 89: 981-990.
95. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 1999; 126: 3015-3025.
96. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-958.
97. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone

- marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434-438.
98. Knoth M. Ultrastructure of chorionic villi from a four-somite human embryo. *J Ultrastruct Res* 1968; 25: 423-440.
 99. Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature* 1980; 288: 551-556. CIT: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the human placenta. New York: Springer; 2006.
 100. Davidoff M, Schiebler TH. Über den feinaufbau der Meerschweinchenplacenta während der entwicklung. *Z Anat Entwicklungsgesch* 1970; 130: 234-254.
 101. Dempsey EW. The development of capillaries in the villi of early human placentas. *Am J Anat* 1972; 134: 545-565.
 102. Holmgren L, Glaser A, Pfeifer-Ohlsson S, Ohlsson R. Angiogenesis during human extraembryonic development involves the spatiotemporal control of PDGF ligand and receptor gene expression. *Development* 1991; 113: 749-754.
 103. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653-660.
 104. Burri PH, Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec* 1990; 228: 35-45.
 105. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997; 277: 48-50.
 106. Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4213-4224.
 107. Leiser R, Luckhardt M, Kaufmann P, Winterhager E, Bruns U. The fetal vascularisation of term human placental villi. I. Peripheral stem villi. *Anat Embryol (Berl)* 1985; 173: 71-80.
 108. Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MK, Anand-Apte B, Weatherbee JA, Wang Y, Fang F, Flanagan JG, Tsang ML. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1996; 271: 3154-3162.
 109. Khaliq A, Dunk C, Jiang J, Shams M, Li XF, Acevedo C, Weich H, Whittle M, Ahmed A. Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction. *Lab Invest* 1999; 79: 151-170.

110. Demir R, Kosanke G, Kohnen G, Kertschanska S, Kaufmann P. Classification of human placental stem villi: review of structural and functional aspects. *Microsc Res Tech* 1997; 38: 29-41.
111. Kaufmann P, Kingdom JCP. Development of the vascular system in the placenta. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000.
112. Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, Rafii D, Lyden D. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 61-67.
113. Kaufmann P, Bruns U, Leiser R, Luckhardt M, Winterhager E. The fetal vascularisation of term human placental villi. II. Intermediate and terminal villi. *Anat Embryol (Berl)* 1985; 173: 203-214.
114. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 2003; 22: 6549-6556.
115. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996; 93: 1493-1495.
116. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947-11954.
117. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001; 114: 853-865.
118. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1806-1814.
119. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, Boocock CA, Smith SK. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod* 1993; 48: 1120-1128.
120. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267: 26031-26037.
121. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998; 92: 735-745.

122. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990; 5: 519-524.
123. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
124. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611.
125. Albrecht ED, Babischkin JS, Pepe GJ. Regulation of placental villous angiopoietin-1 and -2 expression by estrogen during baboon pregnancy. *Mol Reprod Dev* 2008; 75: 504-511.
126. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7533-7537.
127. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 2001; 97: 785-791.
128. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 97-132.
129. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 1-30.
130. Conn G, Bayne ML, Soderman DD, Kwok PW, Sullivan KA, Palisi TM, Hope DA, Thomas KA. Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2628-2632.
131. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246: 1309-1312.
132. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309.
133. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 851-858.
134. Carmeliet P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat Med* 2000; 6: 1102-1103.
135. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J,

- Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380: 435-439.
136. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439-442.
 137. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 1994; 71: 374-379.
 138. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-845.
 139. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 1999; 13: 9-22.
 140. Kim YM, Jang JW, Lee OH, Yeon J, Choi EY, Kim KW, Lee ST, Kwon YG. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 2000; 60: 5410-5413.
 141. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; 87: 1161-1169.
 142. Partanen J, Dumont D. Functions of Tie1 and Tie2 receptor tyrosine kinases in vascular development. Berlin: Springer-Verlag; 1999.
 143. Yuan HT, Venkatesha S, Chan B, Deutsch U, Mammoto T, Sukhatme VP, Woolf AS, Karumanchi SA. Activation of the orphan endothelial receptor Tie1 modifies Tie2-mediated intracellular signaling and cell survival. *Faseb J* 2007; 21: 3171-3183.
 144. Currie MJ, Gunningham SP, Han C, Scott PA, Robinson BA, Harris AL, Fox SB. Angiopoietin-1 is inversely related to thymidine phosphorylase expression in human breast cancer, indicating a role in vascular remodeling. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 918-927.
 145. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60.
 146. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11205-11210.

147. Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res* 2006; 312: 630-641.
148. Visconti RP, Richardson CD, Sato TN. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8219-8224.
149. Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ, Fraser HM. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod* 2002; 66: 802-812.
150. Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 110 Suppl 1: S10-18.
151. Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 1994; 78: 409-424.
152. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 2005; 436: 193-200.
153. Nguyen A, Cai H. Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 6530-6535.
154. Park KW, Crouse D, Lee M, Karnik SK, Sorensen LK, Murphy KJ, Kuo CJ, Li DY. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 16210-16215.
155. Ferriani RA, Ahmed A, Sharkey A, Smith SK. Colocalization of acidic and basic fibroblast growth factor (FGF) in human placenta and the cellular effects of bFGF in trophoblast cell line JEG-3. *Growth Factors* 1994; 10: 259-268.
156. Shams M, Ahmed A. Localization of mRNA for basic fibroblast growth factor in human placenta. *Growth Factors* 1994; 11: 105-111.
157. Ahmed A, Li XF, Dunk C, Whittle MJ, Rushton DI, Rollason T. Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors* 1995; 12: 235-243.
158. Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 1997; 18: 657-665.
159. Demir R, Kayisli UA, Seval Y, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY, Huppertz B. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 2004; 25: 560-572.

160. Vuorela P, Hatva E, Lymboussaki A, Kaipainen A, Joukov V, Persico MG, Alitalo K, Halmesmaki E. Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biol Reprod* 1997; 56: 489-494.
161. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-66.
162. Vuckovic M, Ponting J, Terman BI, Niketic V, Seif MW, Kumar S. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor, KDR, in human placenta. *J Anat* 1996; 188 (Pt 2): 361-366.
163. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9349-9354.
164. Demir R, Seval Y, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem* 2007; 109: 257-265.
165. Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y. Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Hum Pathol* 2002; 33: 1069-1077.
166. Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B, Ahmed A. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol* 2000; 156: 2185-2199.
167. Babischkin JS, Suresch DL, Pepe GJ, Albrecht ED. Differential expression of placental villous angiopoietin-1 and -2 during early, mid and late baboon pregnancy. *Placenta* 2007; 28: 212-218.
168. Seval Y, Sati L, Celik-Ozenci C, Taskin O, Demir R. The distribution of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and their receptors tie-1 and tie-2 in the very early human placenta. *Placenta* 2008; 29: 809-815.
169. Demir R. *Histolojik Boyama Teknikleri*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2001.
170. Lee MM, Yeh MN. Fetal microcirculation of abnormal human placenta. I. Scanning electron microscopy of placental vascular casts from small for gestational age fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154: 1133-1139.
171. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73-91.
172. Reynolds LP, Redmer DA. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* 2001; 64: 1033-1040.
173. Demir R, Kayisli UA, Cayli S, Huppertz B. Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. *Placenta* 2006; 27: 535-539.

174. Cervar M, Blaschitz A, Dohr G, Desoye G. Paracrine regulation of distinct trophoblast functions in vitro by placental macrophages. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 297-305.
175. Khan S, Katabuchi H, Araki M, Nishimura R, Okamura H. Human villous macrophage-conditioned media enhance human trophoblast growth and differentiation in vitro. *Biol Reprod* 2000; 62: 1075-1083.
176. Anteby EY, Natanson-Yaron S, Greenfield C, Goldman-Wohl D, Haimov-Kochman R, Holzer H, Yagel S. Human placental Hofbauer cells express sprouty proteins: a possible modulating mechanism of villous branching. *Placenta* 2005; 26: 476-483.
177. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
178. Cunningham SA, Tran TM, Arrate MP, Brock TA. Characterization of vascular endothelial cell growth factor interactions with the kinase insert domain-containing receptor tyrosine kinase. A real time kinetic study. *J Biol Chem* 1999; 274: 18421-18427.
179. Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 1999; 274: 31047-31054.
180. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70.
181. Albrecht ED, Robb VA, Pepe GJ. Regulation of placental vascular endothelial growth/permeability factor expression and angiogenesis by estrogen during early baboon pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5803-5809.
182. Clark DE, Smith SK, Licence D, Evans AL, Charnock-Jones DS. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J Endocrinol* 1998; 159: 459-467.
183. Marumo T, Schini-Kerth VB, Busse R. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes* 1999; 48: 1131-1137.
184. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87: 3336-3343.
185. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, Schaper W. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H2411-2419.

186. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, Weich H, Fernandez B, Golomb G, Carmeliet P, Schaper W, Clauss M. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res* 2003; 92: 378-385.
187. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, Risau W. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 1996; 271: 17629-17634.
188. Nash AD, Uren S, Hawes CS, Boyle W. Application of a novel immunization protocol to the production of monoclonal antibodies specific for macrophages in human placenta. *Immunology* 1989; 68: 332-340.
189. Kesson AM, Fear WR, Williams L, Chang J, King NJ, Cunningham AL. HIV infection of placental macrophages: their potential role in vertical transmission. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 241-246.
190. Wetzka B, Clark DE, Charnock-Jones DS, Zahradnik HP, Smith SK. Isolation of macrophages (Hofbauer cells) from human term placenta and their prostaglandin E2 and thromboxane production. *Hum Reprod* 1997; 12: 847-852.
191. Pavlov O, Pavlova O, Ailamazyan E, Selkov S. Characterization of cytokine production by human term placenta macrophages in vitro. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60: 556-567.
192. Seval Y, Korgun ET, Demir R. Hofbauer cells in early human placenta: possible implications in vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 2007; 28: 841-845.
193. Kim JS, Romero R, Cushenberry E, Kim YM, Erez O, Nien JK, Yoon BH, Espinoza J, Kim CJ. Distribution of CD14+ and CD68+ macrophages in the placental bed and basal plate of women with preeclampsia and preterm labor. *Placenta* 2007; 28: 571-576.
194. Guilbert L, Robertson SA, Wegmann TG. The trophoblast as an integral component of a macrophage-cytokine network. *Immunol Cell Biol* 1993; 71 (Pt 1): 49-57.
195. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; 107: 1164-1169.
196. Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, Lindemann K, Weidner N, Zuzarte ML, Adamkiewicz J, Elsasser HP, Muller R, Havemann K. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation* 2000; 65: 287-300.
197. Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 671-680.

- 198.** Rohde E, Malischnik C, Thaler D, Maierhofer T, Linkesch W, Lanzer G, Guelly C, Strunk D. Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cells* 2006; 24: 357-367.

ÖZGEÇMİŞ

Yasemin SEVAL ÇELİK 1978 yılında İzmir’de doğdu. İlköğrenimini 1989 yılında Bülent Okan İlkokulu, İzmir’de, Ortaöğrenimini 1993 yılında Merzifon Anadolu Lisesi- Amasya’da ve Lise öğrenimini de 1996 yılında Adnan Menderes Anadolu Lisesi- İstanbul’da tamamladı. İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler Lisans eğitimini 2000 yılında Birincilikle bitirdi. Aynı yıl, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde “Üreme Biyolojisi” yüksek lisans programına başladı. Yüksek lisans eğitimi sırasında “Yabancı Hükümetlerce Türk Hükümetine verilen burslar” kapsamında Milli Eğitim Bakanlığı’ndan Finlandiya Hükümet Bursunu kazanarak, 3 ay Helsinki Üniversitesi, Haartman Enstitüsü, Viroloji Anabilim Dalı-Finlandiya’da Prof. Dr. Antti Vaheri ile birlikte çalıştı. Üreme Biyolojisi Yüksek Lisans eğitimini 2003 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda tamamladı. Sonrasında, Amerika-Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Bölümü’nde Prof. Dr. Aydın Arıcı ile birlikte doktora öncesi bursiyeri olarak 14 ay çalıştı. Daha sonra Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Doktora programına başladı ve bu program içerisinde Prof. Dr. Ramazan Demir danışmanlığında tez çalışmalarını tamamladı. Yasemin Seval Çelik’in Science Citation Index’te kayıtlı 28 makale ve yurtiçi-yurtdışı kongrelerde sunulmuş 30’u aşkın kongre bildirisi bulunmaktadır. 2005 yılında “Üreme alanındaki Araştırmalar” için Jinekolojik Araştırma Derneği tarafından verilen “Medikal ve PhD. Öğrenci Ödülünü” (Award in SGI Medical & PhD. Graduate Student Stipends For Research in Reproduction), 2008 yılında ise “Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği Ulusal Kongre Bildiri-İkincilik Ödülü”nü kazanmıştır.

Yasemin SEVAL ÇELİK, 21 Aralık 2009 tarihinde, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora Tez Savunmasını başarıyla tamamlamıştır.

EKLER



Hofbauer Cells in Early Human Placenta: Possible Implications in Vasculogenesis and Angiogenesis

Y. Seval, E.T. Korgun, R. Demir*

Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey

Accepted 16 January 2007

Abstract

The stroma of the placental villi contain numerous macrophages, so-called Hofbauer cells which are of mesenchymal origin and are thought to function in many processes. Although there are many studies concerning placental vasculogenesis and angiogenesis, there has been a lack of evidence on the possible roles of Hofbauer cells in these processes. In this study we hypothesized that Hofbauer cell locations and numbers might be correlated with the vascular structures within the placental villi core and therefore may be implicated to play roles in placental vasculogenesis and angiogenesis.

Placental tissues were obtained from normal first-trimester pregnancies. Tissues were prepared for light microscopic investigations. Double immunohistochemistry staining with CD31/PECAM1 and CD68 was applied to placental tissues. In placental villous core, majority of the Hofbauer cells were found to be either in close contact with angiogenic cell cords and primitive vascular tubes or located in between them. Moreover, the number of Hofbauer cells and vasculogenic structures were found to be significantly correlated. The findings of this study suggest for the first time that Hofbauer cells might be involved in the processes of vasculogenesis and angiogenesis in the placenta.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Vasculogenesis; Angiogenesis; Hofbauer cells; Human placenta

1. Introduction

The creation, maturation and maintenance of the vascular network is necessary for successful hemachorial placentation, as well as normal embryonic development and growth in humans.

Two processes vasculogenesis and angiogenesis, which both are of critical importance for the fetus and the placenta, are involved in the development of the fetal and placental vasculatures. Whereas vasculogenesis results from the de novo formation of vessels derived from pluripotent precursor cells, angiogenesis, is the creation of new vessels from pre-existing vessels [1–3].

Vascularization of the placenta takes place around day 21 post conception (p.c.) [4]. At this time, endothelial progenitor

cells appear as cords right beneath the trophoblastic layer; which are called angiogenic cell cords (ACC). Later on, these cells proliferate, differentiate and migrate to form main vascular patterns and form primitive vascular tubes (VT), which demonstrate a primitive lumen formation [5,6].

The stroma of the placental villi contains numerous macrophages, so-called Hofbauer cells. Hofbauer cells are of mesenchymal origin and are thought to function in many processes.

During the early phase of vascularization, the appearance of Hofbauer cells in the villous core, suggests a paracrine role for these cells during the first stages of placental vasculogenesis [7–10]. Indeed it has been shown that Hofbauer cells express angiogenic growth factors such as VEGF [11,12]. Furthermore it has been shown that human villous macrophages enhance human trophoblast growth and differentiation in vitro and express higher levels of VEGF mRNA than that of peritoneal macrophages [13].

* Corresponding author. Tel./fax: +90 242 227 4486.

E-mail address: rdemir@akdeniz.edu.tr (R. Demir).

Hofbauer cells are typical macrophages with their micropinocytotic activity and phagocytosis ability. However, little attention has been paid to the relationship between Hofbauer cells and the ACC and VT in chorionic villi, and there is no convincing evidence that angiogenic cell growth and function are regulated by the factors derived from these macrophages. Furthermore, none of the studies have so far suggested Hofbauer cells in participating to vasculogenesis and angiogenesis in the placental villi. Other than its macrophage properties we hypothesized that Hofbauer cells play roles in placental vasculogenesis and angiogenesis. In this study, we aimed to provide a better understanding of the role of macrophages in the process of vasculogenesis and angiogenesis in the human placenta.

2. Materials and methods

2.1. Tissue sample collection

A total of 19 samples of human placental tissue [5 samples of 22–28 days (fourth week p.c.); 8 samples of 29–35 days (fifth week p.c.); 6 samples of 36–42 days (sixth week p.c.); as determined by the last menstrual period of the patients] in the first trimester of pregnancy were obtained after legal termination of pregnancy by curettage for medical or psychosocial reasons, which were unlikely to affect placental structure and function. Tissues were supplied from the Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, and Clinic of Obstetrics and Gynecology, Government Hospital, Antalya. Informed consent forms and protocols were approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medicine in Akdeniz University.

2.2. Immunohistochemistry

Serial sections at 5 µm thickness were collected on poly-L-lysine coated slides (Sigma, St. Louis, MO, USA) and incubated overnight at 56 °C. Tissue sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in a graded series of ethanol. Sections were then boiled in a microwave oven in 10 mM citrate buffer, pH 6.0, for 4 times, each for 5 min and a total of 20 min. Thereafter the slides were left to cool for another 20 min. Endogenous peroxidase activity was quenched by 3% hydrogen peroxide in methanol for 20 min. Afterwards, sections were incubated in a blocking serum (Ultra V Block, TP-060-HL; NeoMarker, Fremont, CA, USA) for 7 min in order to block non-specific binding without the washing step, sections were subsequently incubated overnight at 4 °C with either mouse monoclonal anti-human CD31/PECAM1 (MS-1873-R7; Clone 1A10; prediluted, NeoMarkers, Fremont, CA, USA) to identify the ACC as well as VT, or mouse monoclonal anti-human CD68 (M0814; Clone KP1; dilution 1/200; Dako, Glostrup, Denmark) for the identification of placental macrophages. Sections were incubated with the biotinylated secondary antibody (TP-060-HL; LabVision, Fremont, CA, USA) and a streptavidin-peroxidase complex (TP-060-HL; LabVision), respectively, for 15 min. The resulting signal was developed with diaminobenzidine (DAB) (K3466; Dako). Each step was followed by three washes in phosphate buffered saline (PBS) unless otherwise stated.

For double stainings with both of the antibodies, after developing CD31/PECAM1 or CD68 immunoreaction with DAB, the sections were re-incubated with primary antibody against CD68 or CD31/PECAM1, respectively overnight at 4 °C. Afterwards, the sections were incubated with a biotinylated secondary antibody (K0676; Dako), followed by a streptavidin-alkaline phosphatase complex (K0676; Dako) for 20 min each. Slides were developed in Fast Red chromogen (Dako Fast Red Substrate System; K0699; Dako) counterstained with Mayer's Hematoxylin (S3309; Dako). For controls, sections were treated with appropriate mouse IgG diluted to the same final protein concentration as the primary antibody.

Photomicrographs were taken with an Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). All samples for each individual antibody were exposed

to the same protocol at the same time and were stained using the same incubation periods.

2.3. Evaluation of Hofbauer cell numbers and vascular density in the immature intermediate villi (IMIV) sections

To investigate whether Hofbauer cells were spatially and temporally related with vasculogenesis and angiogenesis, the Hofbauer cell numbers located in close vicinity to vascular structures including ACC and VT within the IMIV sections were counted. Three samples from each of the three pregnancy weeks (4th, 5th and 6th weeks) were randomly selected for evaluation, which made a total of 9 samples evaluated for the Hofbauer cell number and vascular structure number counts. Therefore, the number of Hofbauer cells and vascular structures were counted in 42 IMIV sections in each of the 9 samples by two investigators blinded to the source of the tissues in the CD31/PECAM1 and CD68 double stained placental tissue sections. Moreover in the same tissue sections, “HC numbers located close to the vascular structures” and “total HC numbers” within an IMIV were also counted.

2.4. Statistical analysis

The data from the Hofbauer cell and vasculogenic structure counts was evaluated using Pearson's correlation. Statistical calculations were performed using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows version 13.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Statistical significance was defined as $P < 0.05$.

3. Results

3.1. The classification of placental villi types

The human placental villi types were classified according to the criteria of Castellucci et al. (1990) [10].

3.2. Placental macrophages (Hofbauer Cells) located in close vicinity to vascular structures

ACC and primitive VT were the only positively stained cells with CD31/PECAM1 in all the placental samples investigated. CD68 exhibited a granular staining associated with the lysosomal granules in the cytoplasm of villous macrophages; Hofbauer cells.

The CD31/PECAM1-immunopositive ACC and primitive VT in mesenchymal villi and IMIV were located in the stroma, right beneath the trophoblastic layer and were found parallel to the villous axis (Fig. 1a). The Hofbauer cells were generally found in large numbers within the villous stroma, especially in the IMIV (Fig. 1a). The distribution of Hofbauer cells in the villous stroma displayed distinctive features. CD31/PECAM1 and CD68 double immunohistochemistry revealed that in all of the placental samples studied, considerable amounts of the CD68-immunopositive Hofbauer cells were localized in close vicinity to CD31/PECAM1-immunopositive ACC and primitive VT (Fig. 1a and inset). Hofbauer cells could neighbor the ACC and primitive VT with close contact and were also found in between two vascular structures (Fig. 1b,c). Another interesting finding was that Hofbauer cells could in some cases be located right between the cells of ACC and seem to be within the primitive lumen (Fig. 1d).

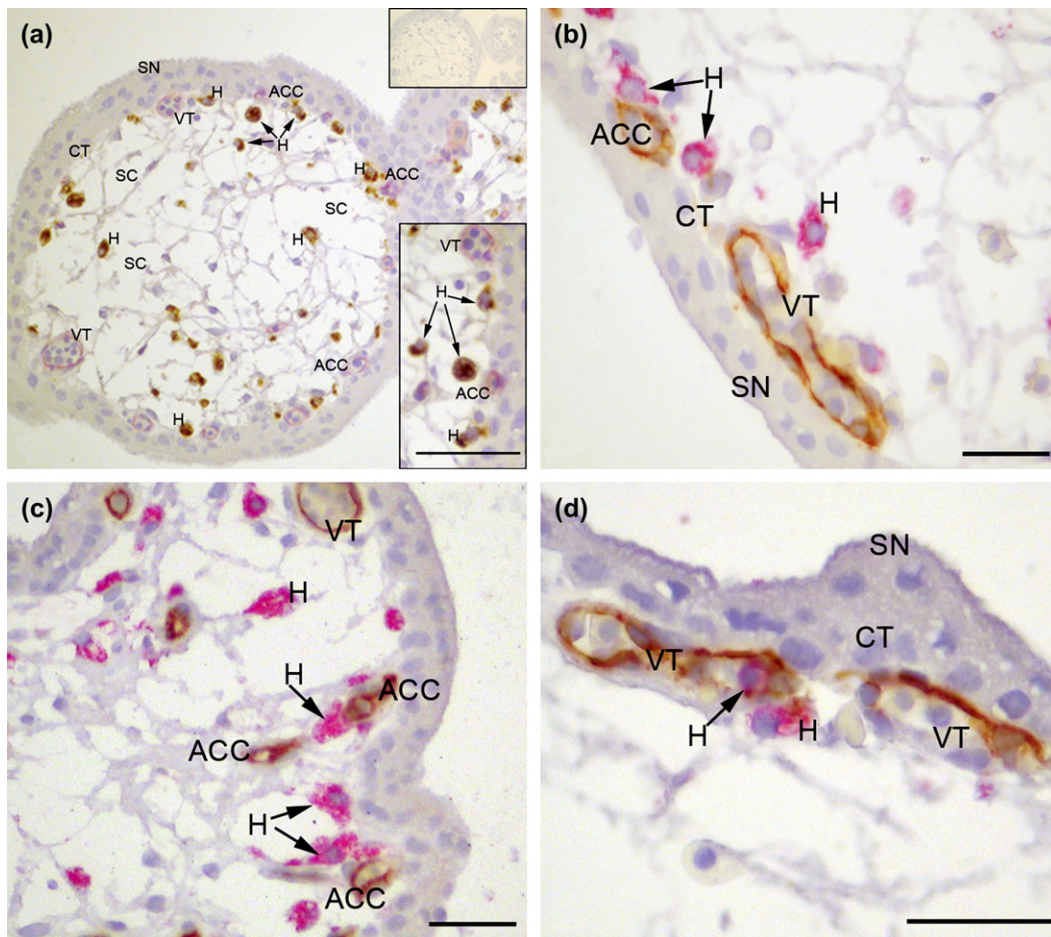


Fig. 1. Double immunohistochemistry representing the localizations of CD31/PECAM-1 and CD68 immunopositive cells. a) CD 31 immunopositive ACC and VT are seen under the cytotrophoblastic layer. Hofbauer cells are dispersed throughout the IMIV stromal channels and majority of these cells were localized nearby the ACC and VT. b) and c) A close relationship between vascular structures and Hofbauer cells is seen. Hofbauer cells were located adjacently to the ACC and primitive VT and these cells could also be seen in between two angiogenic cell cords. d) These cells could attach and protrude the ACC and even found within the primitive lumen. H, Hofbauer Cell, ACC, Angiogenic Cell Cord; VT, Vascular Tube; SC, stromal channel; CT, cytotrophoblast; SN, syncytiotrophoblast. Hofbauer cells and vascular structures are stained as brown (DAB) and red (Fast Red), respectively, in (a) and vice versa in (b–d). Scale bars represent (a) 100 μ m, (b, c) 50 μ m, (d) 25 μ m.

3.3. The number of Hofbauer cells is correlated to the number of vascular structures

The number of Hofbauer cells that were located close to the ACC and VT were counted in 42 IMIV sections in 3 different samples from each pregnancy week in the CD31/PECAM1 and CD68 double stained placenta sections and Pearson's correlation test revealed a significant correlation ($P < 0.05$, $r = 0.686$) between the Hofbauer cell numbers and vascular structure numbers (Fig. 2). On the other hand when Hofbauer cells numbers that were located in close vicinity to vascular structures compared to the total Hofbauer cell numbers, we observed that $43.1 \pm 4\%$ (mean $\pm$ SEM) of Hofbauer cells were located nearby the vascular structures in placental villi.

4. Discussion

Numerous studies have so far investigated vasculogenesis and angiogenesis in the human placenta [2–4,14–17]. We

have recently reported that ACC establish the first main vascular patterns which later form primitive VT that grow towards the longitudinal axis of the villi [5].

The stroma of the placental villi contains mesenchymal-originated macrophages, Hofbauer cells. Several diverse functions have been attributed to Hofbauer cells including stromal fluid balance, the absorption of immune complexes and functioning as antigen presenting cells [7,8]. In a study of Khan et al. (2000), a placental villous macrophage-conditioned media (VMCM) and peritoneal macrophage-conditioned media were compared by means of their in vitro effects on trophoblast growth. They have found that VMCM had higher levels of VEGF and enhanced the growth and differentiation of human trophoblasts in culture. They have also indicated that villous macrophages expressed higher VEGF mRNA levels than that of peritoneal macrophages [13]. Moreover, in a recent study by Anteby et al. (2005), Hofbauer cells were shown to express sprouty (spry) proteins, which are important regulators of branching morphogenesis and growth factor signaling. They concluded that, placental expression of Spry imply an

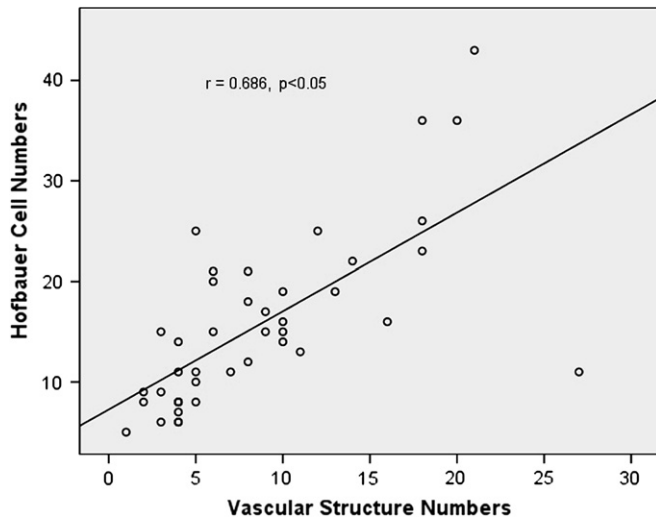


Fig. 2. The statistical analysis of Hofbauer cell numbers located nearby the vascular structures and the vascular structure numbers in the IMIV. As seen, Hofbauer cell numbers are significantly correlated to vascular structure numbers in placental IMIV ($P < 0.05$, $r = 0.686$). This figure represents data from one of the samples belonging to the 4th week of pregnancy. IMIV: immature intermediate villi.

important role for Hofbauer cells in placental villous branching [18]. Since there is a relationship between placental villi branching and vascular network development during villi maturation, in our present study we attribute another important role to the Hofbauer cells, which is involvement in vasculogenesis and angiogenesis of the placenta by interacting with primitive vascular networks.

According to the results of our present study, which show that Hofbauer cells; i) contact ACC and primitive VT; ii) locate in between two ACC or VT; iii) protrude in between the cells of ACC and primitive VT; and iv) quantitatively related to vascular structure numbers within the placental villi core; all suggest a strong evidence for Hofbauer cell participation in vasculogenesis and angiogenesis.

Regulation of vascularization is a very complex process and various factors each of which can regulate the process in different ways are involved. Numerous studies have identified the expressions of VEGF and its receptors in the human placenta [12,19,20] as well as in the Hofbauer cells [5]. Although the regulation of vascular development in the placenta is quite well understood, little is known about the roles of Hofbauer cells in regulation of placental vascularization.

In our present study, we have observed that the majority of Hofbauer cells in the villi locate nearby the main vascular patterns as well as already formed and branching or elongating vessels. The special locations of VEGF-expressing Hofbauer cells strongly suggest that they might play critical roles in vascularization and participate in vascular tube formation and development. The angiogenic factor and receptor profiles of Hofbauer cells need further investigation and functional studies.

Our study is of importance for being the first to show that, Hofbauer cells within the stroma of placental villi might have conducting characteristics in the most important process for

the placenta, which is vascularization. Moreover, in vitro studies on the function of Hofbauer cells in promoting vasculogenesis and angiogenesis are required for the better understanding of the molecular regulation of these processes. Therefore, the possible functions of Hofbauer cells in angiogenesis and vasculogenesis should be studied in vitro by using advanced assays and technologies such as; confocal microscopy, cell migration assays, angiogenesis assays etc. These studies would probably exhibit the importance of Hofbauer cells in the process of placentation.

Functional studies on the roles of Hofbauer cell in placental vasculogenesis and angiogenesis will help elucidate the mechanisms that control normal placentation, which is important in understanding the pathophysiology of conditions associated with the impairment of vascular development during placentation.

Acknowledgment

We would like to thank Sibel Ozer for her excellent technical assistance and Ozgur Tosun for his assistance with the statistical analysis.

This study was supported in part by the Research Fund of Akdeniz University-Antalya/Turkey (Project# 2006.07.0103.004) and The Scientific And Technological Research Council Of Turkey (TUBITAK)-Turkey (Project# SBAG-3267).

References

- [1] Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997;277(5322):48–50.
- [2] Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267(16):10931–4.
- [3] Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73–91.
- [4] Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erben T, Kotowski A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat (Basel)* 1989;136(3):190–203.
- [5] Demir R, Kayisli UA, Seval Y, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY, et al. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 2004;25(6):560–72.
- [6] Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 2004;25(2–3):114–26.
- [7] Castellucci M, Zaccaro D. The Hofbauer cells of the human placenta: morphological and immunological aspects. *Prog Clin Biol Res* 1989;296:443–51.
- [8] Demir R, Erben T. Some new findings about Hofbauer cells in the chorionic villi of the human placenta. *Acta Anat (Basel)* 1984;119(1):18–26.
- [9] Demir R, Kosanke G, Kohnen G, Kertschanska S, Kaufmann P. Classification of human placental stem villi: review of structural and functional aspects. *Microsc Res Tech* 1997;38(1–2):29–41.
- [10] Castellucci M, Scheper M, Scheffen I, Celona A, Kaufmann P. The development of the human placental villous tree. *Anat Embryol (Berl)* 1990;181(2):117–28.
- [11] Cervar M, Blaschitz A, Dohr G, Desoye G. Paracrine regulation of distinct trophoblast functions in vitro by placental macrophages. *Cell Tissue Res* 1999;295(2):297–305.
- [12] Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN, et al. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human

- placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod* 1998; 59(6):1540–8.
- [13] Khan S, Katabuchi H, Araki M, Nishimura R, Okamura H. Human villous macrophage-conditioned media enhance human trophoblast growth and differentiation in vitro. *Biol Reprod* 2000;62(4): 1075–83.
- [14] Reynolds LP, Redmer DA. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* 2001;64(4):1033–40.
- [15] Huppertz B, Peeters LL. Vascular biology in implantation and placenta-tion. *Angiogenesis* 2005;8(2):157–67.
- [16] Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(9):4213–24.
- [17] Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 110(Suppl. 1):S10–8.
- [18] Anteby EY, Natanson-Yaron S, Greenfield C, Goldman-Wohl D, Haimov-Kochman R, Holzer H, et al. Human placental Hofbauer cells express sprouty proteins: a possible modulating mechanism of villous branching. *Placenta* 2005;26(6):476–83.
- [19] Clark DE, Smith SK, Licence D, Evans AL, Charnock-Jones DS. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J Endocrinol* 1998;159(3):459–67.
- [20] Albrecht ED, Robb VA, Pepe GJ. Regulation of placental vascular endo-thelial growth/permeability factor expression and angiogenesis by estrogen during early baboon pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(11):5803–9.



REVIEW

Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta

Ramazan Demir^{a,*}, Yasemin Seval^a, Berthold Huppertz^b

^aDepartment of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey

^bDepartment of Histology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Karl Franz University, Graz, Austria

Received 17 January 2007; received in revised form 15 February 2007; accepted 23 February 2007

KEYWORDS

Angiogenesis;
Early pregnancy;
Haemangiogenic
cells;
Human placenta;
Vasculogenesis;
Review

Summary

Vasculogenesis and angiogenesis are two consecutive processes during blood vessel development in the human placenta. While vasculogenesis, which is the formation of first blood vessels, is achieved by differentiation of pluripotent mesenchymal cells into haemangiogenic stem cells. The subsequent step, angiogenesis, is characterized by development of new vessels from already existing vessels. In this review, we aim to give an overview of vasculogenesis and angiogenesis during the first trimester of human placental development. Recent studies have shown that at the very early stages of placental development, cytotrophoblasts trigger vasculogenesis and angiogenesis, whereas as pregnancy progresses Hofbauer and stromal cells take over the task of triggering blood vessel development. Important growth factors in this scenario are the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and their receptors, as well as Tie-1 and Tie-2. This review depicts the molecular and morphological steps of vasculogenesis and angiogenesis, which can give further insights into human placental development and maturation disorders.

© 2007 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Contents

Introduction	258
The family of VEGF-related proteins and their receptors.	258
VEGF and its receptors during placental vasculogenesis and angiogenesis	258
The differentiation of mesenchymal stem cells into endothelial cell progenitors.	260
Sequential steps during placental vasculogenesis and angiogenesis	261

*Corresponding author. Tel./fax: +90 242 227 44 86.

E-mail address: rdemir@akdeniz.edu.tr (R. Demir).

Conclusion	262
Acknowledgments	262
References	262

Introduction

It is generally accepted that blood vessels develop via two consecutive processes, vasculogenesis and angiogenesis. During vasculogenesis, formation of the earliest primitive capillaries is achieved by in situ differentiation of haemangiogenic stem cells that are derived from pluripotent mesenchymal cells. Haemangiogenic stem cells further differentiate to haemangioblastic stem cells that give rise to angioblastic cells, the progenitors of endothelial cells (Hanahan, 1997; Ribatti et al., 2002) and to haemangioblastic cells, the progenitors of haematopoietic cells. Then, during angiogenesis, new blood vessels derive from already existing vessels (Hanahan and Folkman, 1996) (Fig. 1).

We have previously shown that a variety of factors are associated with placental angiogenesis and vasculogenesis. In this review, we aim to clarify the disagreements in the data on placental angiogenesis and vasculogenesis and to focus on describing an integrated view of placental vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta.

The terms angiogenesis and vasculogenesis have been used synonymously and both terms have been used to characterize the general formation and development of blood vessels. However, there is still no agreement on the exact meaning of these two terms. Although they have been clearly defined (Cogle and Scott, 2004), their characteristic meanings are not appropriately and uniformly utilized. Angiogenesis has been used to describe migration of angioblasts (Charnock-Jones et al., 2004), development of endothelial cells from pre-existing blood vessels (Charnock-Jones et al., 2004) and sprouting of endothelial cells (Pardanaud et al., 1996). Many reviews have summarized the description of terms, mechanisms and cell types regarding blood vessel development (Bauer et al., 2005; Risau et al., 1988).

In all types of angiogenesis, either under normal physiological or pathological conditions, endothelial cell activation is the first process to take place, leading to increased vascular permeability. The main goal of this process is to supply blood.

Various factors affect angiogenesis and vasculogenesis in an autocrine or paracrine manner, as well as directly or indirectly stimulating proliferation and differentiation of endothelial precursor cells (Ferrara, 2004; Hanahan and Folkman, 1996; Millauer et al., 1993).

The family of VEGF-related proteins and their receptors

The vascular endothelial growth factors (VEGFs) are the main growth factors involved in vasculogenesis and angiogenesis (Ribatti, 2005; Risau et al., 1998). They have important roles as endothelial cell mitogens (Dvorak et al., 1995; Ferrara et al., 1996) and have been shown to be expressed in different tissues, including the placenta (Vuorela et al., 1997; Celik-Ozenci et al., 2003, 2004). Other well-studied factors involved in these processes are acidic and basic fibroblast growth factor (aFGF, bFGF), epidermal growth factor (EGF) (Cooper et al., 1995; Ferriani et al., 1994; Kingdom et al., 2000) and another closely related protein, the placenta growth factor (PlGF) (Maglione et al., 1991).

When it was first described, VEGF was thought to act as a vascular permeability factor (Senger et al., 1983). So far, four different VEGF subtypes have been described, termed from VEGF-A to VEGF-D (Tammela et al., 2005). The first to be identified, VEGF-A, is a disulphide bond-linked homodimeric glycoprotein that plays an important role in vasculogenesis, angiogenesis, vascular permeability and vasodilatation (Cheung, 1997; Khaliq et al., 1996; Ni et al., 1997; Shore et al., 1997; Torry and Torry, 1997). VEGF is a heparin-binding growth factor known to act through its surface receptors. The receptors for VEGF, VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (Flk-1/KDR), are human type III receptor tyrosine kinases (Cunningham et al., 1999; Vuckovic et al., 1996). Many studies have shown clearly that both receptors are involved in capillary formation and vascular development during embryogenesis (Breier, 2000; Ferrara, 2000; Hiratsuka et al., 2005; Shalaby et al., 1995, 1997). VEGF and its two receptors, VEGFR-1 (Hanahan, 1997) and VEGFR-2 (Millauer et al., 1993; Terman et al., 1992), are expressed in the endothelium of blood vessels and contribute to vascular development and regulation of vascular permeability (Terman et al., 1992).

VEGF and its receptors during placental vasculogenesis and angiogenesis

Our group has recently investigated the expression of VEGF and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2

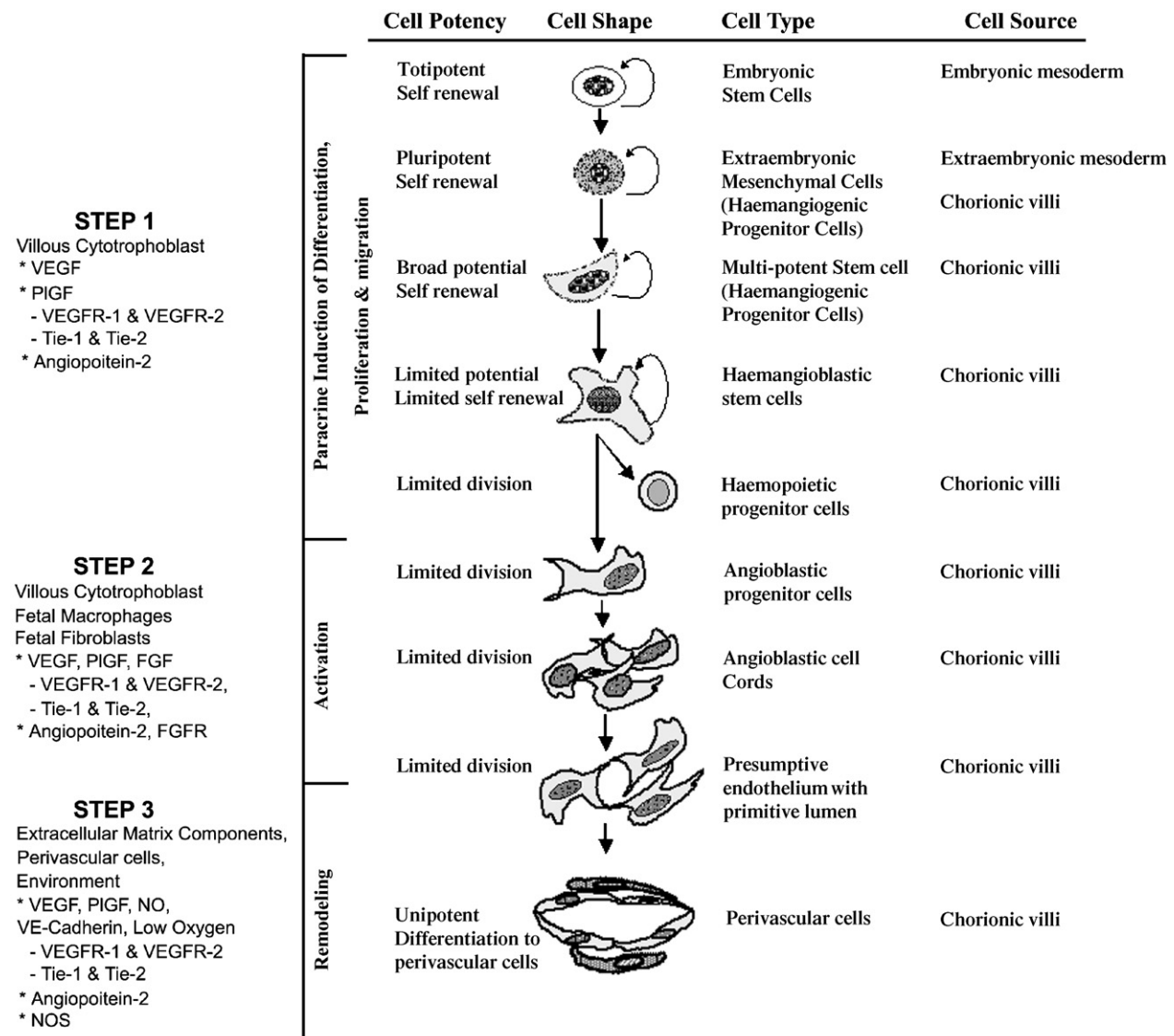


Figure 1. Schematic representation of placental vasculogenesis and angiogenesis. A molecular and morphological step-by-step route can be observed from the cellular source to new vessels with proliferation, differentiation and maturation processes. Depicted on the left are the regulating cells and extracellular matrix components together with growth factors and receptors involved; on the right, the steps of differentiation can be found. The scheme starts with the most potent cells and ends with the most differentiated cells. Extracellular signals prompt haemangiogenic precursor cells to transform and differentiate to become placental vasculogenic and angiogenic stem cells. For details of the molecular and morphological steps of angiogenesis see Demir et al. (2006), Djonov et al. (2003), Gambino et al. (2002), Risau et al. (1988), Tertemiz et al. (2005).

and the angiopoietin receptors Tie-1 and Tie-2 in relation to vascular maturation in the early human placenta (Demir et al., 2004; Kayisli et al., 2006). The vasculogenic importance of the angiopoietin receptors Tie-1 and Tie-2 has also been studied by others (Maisonpierre et al., 1997; Sato et al., 1995; Suri et al., 1996), and with regard to the formation and maturation of blood vessels in different tissues (Hanahan, 1997; Risau et al., 1998). In the last decade, placental vasculogenesis and angiogenesis

has been reviewed and discussed in detail with emphasis on different aspects, such as the molecular profile changes of endothelial complexes during normal pregnancy (Kaufmann et al., 2004; Leach et al., 2002), changes in complicated pregnancies (Mayhew et al., 2004) and its molecular regulation (Risau et al., 1988), but little has been written focusing on the respective growth factors.

According to these studies, VEGF-A, small amounts of VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D and another three

members of the VEGF family have been detected in the placenta (Gu et al., 2006; Klagsbrun and D'Amore, 1996; Vuorela et al., 1997). The receptors for the VEGF family VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR/Flk-1 and VEGFR-3/Flt-4 have been identified in placental tissues (Cooper et al., 1995; Leach et al., 2002; Shore et al., 1997). VEGFR-1 is the receptor for PlGF, VEGF-A, and VEGF-B (de Vries et al., 1992); while VEGFR-2 is the receptor for VEGF-A, VEGF-C and VEGF-D (Terman et al., 1992). VEGFR-3 is the receptor for VEGF-C and VEGF-D, which seem to play roles in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis (Enholm et al., 1998; Joukov et al., 1996).

In VEGF-knockout mice (Ferrara, 2000; Ferrara et al., 1996) and in the absence of VEGFR-2, no differentiation of precursor cells into endothelial cells occurs during vasculogenesis (Shalaby et al., 1995). On the other hand, a mutation in the locus of VEGFR-1 (Fong et al., 1995) does not prevent generation of endothelial cells, but results in endothelial disorganization and abnormal vessel formation during early embryo development. Knockout experiments in mice have highlighted the importance of VEGFR-2 for recruitment and early differentiation of haemangiogenic cells into fetoplacental capillaries (Shalaby et al., 1995, 1997) and of VEGFR-1 for subsequent arrangement of early endothelial cells to form endothelial tubes (Fong et al., 1995, 1999).

The differentiation of mesenchymal stem cells into endothelial cell progenitors

During very early pregnancy, the mesenchymal tissue is located centrally within the villous core, and the villous trophoblast surrounds it by constructing a bilaminar epithelial layer. Depending on the maturation stage of the villi, blood vessels may develop either centrally or peripherally in the direct vicinity of the cytotrophoblastic layer (Demir et al., 2004). Haemangiogenic stem cells within specific regions of the villous core are induced and selected to become a particular cell type. In addition to the noticeable morphological changes, molecular methods have revealed that precursor cells of vasculogenesis express distinct proteins just prior to initiation of vascular development, termed vasculogenic pre-patterning (Davidson and Zon, 2000). The particular cell types emerge within mesenchymal villi (MV) directly following the invasion of the mesenchymal tissue into the mere trophoblastic primary villi. In MV, the haemangioblastic stem cells undergo morphogenesis, start migration and initiate the process during

which angiogenic cell cords develop and change their organization (Kaufmann et al., 2004; Risau et al., 1988).

During placental vasculogenesis and angiogenesis, specific pluripotent mesenchymal cells differentiate into haemangiogenic stem cells – pluripotent cells that can renew and produce distinct daughter cells (Thisse and Zon, 2002; Traver and Zon, 2002). Distinct types of angioblastic and haematopoietic cells derive from the haemangiogenic stem cells. The stem cells are regulated by a highly conserved gene program that involves cell proliferation and differentiation (Zon, 1995).

The main stem cells of placental vasculogenesis are pluripotent mesenchymal cells. These are observed beneath the cytotrophoblastic layer and form haemangiogenic stem cell clusters called primitive vascular patterns (Fig. 1). The haemangiogenic stem cells maintain a close relationship with the trophoblastic layer via their cytoplasmic projections. Both the trophoblastic cells and haemangiogenic stem cells are strongly immunopositive for VEGF and its receptors.

The first signs of primitive vascular patterns formed by haemangiogenic cells are observed in the stroma of MV and immature intermediate villi (IMIV) immediately beneath the trophoblastic layer and parallel to the villous axis beneath the cytotrophoblastic cell layer. These primitive vascular patterns form differently under different conditions in order to form new vascular structures. For example, they may appear as: angiogenic cell cords with/without a presumptive lumen, angiogenic cell cords with/without an elongated pole, or angiogenic cell cords with/without interconnecting tubes. Ultrastructural studies revealed that these patterns are related to the basal membrane of the cytotrophoblast cells (Demir et al., 2004).

This *de novo* vascular formation (vasculogenesis) is induced and regulated by various factors (Fig. 1). We have previously shown that, in the MV at the very early stages of placentation, the cytotrophoblastic layer is very strongly immunopositive for VEGF and its receptors (Demir et al., 2004). With regard to the segmental maturation of the villi, the immunolabeling for VEGF and its receptors decreases in the cytotrophoblastic layer, and increases in the Hofbauer cells and some fibroblast-like cells in the IMIV.

In the next stage of villous maturation, while vasculogenesis continues, angiogenesis begins. Thereafter, Hofbauer cells that are immunopositive for angiogenic factors are recruited to take over the triggering function in IMIV. These observations

were made by focusing on the triggering function for villous maturation in parallel to vasculogenesis and angiogenesis. Therefore, depending on the villous type, VEGF is strongly produced in villous cytotrophoblast cells and, in turn, in the Hofbauer cells and fibroblasts.

During the differentiation process of pluripotent mesenchymal cells that start to differentiate into haemangiogenic stem cells, the expression of some markers, such as CD31 and CD34, are seen at the peripheral cytoplasmic protrusions of these cells. For the formation of primitive capillary tubes, haemangiogenic cells form cord-like accumulations (haemangiogenic cell cords) very close to the basement membrane of the cytotrophoblastic layer of MV and establish contacts by their cytoplasmic processes (see Demir et al. (2004) for details).

Haematopoietic cell series are derived from haemangioblastic stem cells with large and densely stained nuclei that are surrounded by endothelial progenitor cells. Haemangiogenic cells are positive for both CD31 and CD34. Further differentiated haematopoietic cells do not show any immunoreactivity for these proteins at all.

The pluripotent extra-embryonic mesenchymal cells are most likely to be derived from totipotent embryonic stem cells, while multipotent haemangiogenic stem cells are derived from the pluripotent mesenchymal cell populations. These developmental and differentiation processes continue with haemangioblastic and angioblastic cells and angiogenic cell cords and are followed by transformation to haematopoietic cell series and presumptive endothelium with perivascular cell populations. It has to be kept in mind that due to differentiation processes, the degree of self-renewal is decreasing with increasing developmental stage of the cells, and all of the processes are taking place within the mesenchymal core of chorionic villi (Fig. 1).

Sequential steps during placental vasculogenesis and angiogenesis

When trying to visualize the development of vessels within early placental tissues, one has to face one major issue. All sections of placental tissues contain a mixture of villi in different developmental stages. One may find different structural compositions within the same villous section, reflecting different structural segments of vascular development and villous maturation. However, this type of villous presentation may also aid in comparing angiogenic stages within a single villus. Placental samples from very early stages of

human pregnancy may be used to identify specific villous types and cells and to analyze angiogenic stages within these early developmental stages of the placenta.

An understanding of the importance of the sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis early in placentation has emerged as a result of our recent studies (Demir, 2002; Demir et al., 2004, 2006). During the initial stage of placentation, the primitive chorionic villous trees of the human placenta are composed of three components: the two trophoblastic layers and a central extra-embryonic mesoderm. Fetal vascularization of the human placenta is the result of local *de novo* formation of capillaries out of mesenchymal precursor cells (vasculogenesis) in the placental villi (Demir et al., 2006), rather than protrusion of embryonic vessels into the placenta. The processes of vasculogenesis and angiogenesis are mostly restricted to the period of villous tree formation of placental development (Benirschke and Kaufmann, 2000). There are serial relations between the villi core and the trophoblastic layers which lead to the suggestion that they may influence each other's functions in a paracrine manner (Cervar et al., 1999; Demir et al., 1995).

Our previous studies showed that the first signs of vasculogenesis in the chorionic villi tree is evident 21 days post conception, during the stage of a four somite embryo (Demir et al., 1989; Kaufmann et al., 2004). At this stage, in the villi core, haemangiogenic stem cells derived from mesenchymal cells differentiate prior to the formation of first vessels (Demir et al., 1989), rather than them originating from blood monocytes. Moreover, the early appearance of macrophages (Hofbauer cells) in the villous core, which have been suggested to regulate distinct trophoblast functions (Cervar et al., 1999) and to express angiogenic growth factors (VEGF) (Demir et al., 2004), suggests a paracrine role for these cells during the first stages of vasculogenesis (Demir and Erbengi, 1984, 1987; Demir et al., 1997, 2004).

As depicted in Fig. 1, there are three stages in placental vasculogenesis and angiogenesis during villi maturation:

Step-1, vasculogenesis: started by haemangiogenic stem cells induced to differentiate in a paracrine manner by cytotrophoblast cells via VEGF.

Step-2, angiogenesis I: pre-vascular networks occur in a stepwise manner during angiogenesis, induced by growth factors derived from cytotrophoblast and Hofbauer cells.

Step-3, angiogenesis II: differentiation of perivascular cells, including precursors of smooth muscle

cell (myofibroblast-like cells), to form contractile vessels. This process is regulated by induction of growth factors and cytokines derived from the local villous environment as well as the already established fetal circulation.

The main stem cell type are haemangiogenic stem cells. These show differentiation in two directions to form diverse branches of newly differentiating cells (haematopoietic and angioblastic cells) for angiogenesis and vasculogenesis in series. This will later on give rise to vascular components (Davidson and Zon, 2000). We have recently reported that haematopoietic and angioblastic cells series can be observed around days 20 post conception during normal human pregnancy. VEGF and its receptors, especially VEGFR-2, are expressed (Demir et al., 2004), most likely by haemangiogenic cells (Choi et al., 1998; Yamashita et al., 2000), during this gestational period. Moreover, gene-targeting mutations of VEGFR-2 in mice reveal that this receptor is required for the migration of haemangiogenic cells to embryonic sites, but not for haematopoiesis itself (Hidaka et al., 1999; Schuh et al., 1999; Shalaby et al., 1997).

According to our results, during the development of placental villi, primitive vasculogenesis is guided by VEGF and its receptors. In the beginning, VEGF is mainly expressed by the cytotrophoblastic layer of villi and differentiating angiogenic cell precursors, respectively (Demir et al., 2004). This suggests a trophoblast-dependent paracrine induction of vasculogenesis and angiogenesis. Due to this process, primitive vascular patterns and angiogenic cell precursors appear as recognizable units, such as cell–cell contacts and angiogenic cell cords. This is followed by differentiation and proliferation processes that lead to the formation of the primitive vascular patterns (Demir et al., 1997). It has been suggested that all the proliferation and differentiation is controlled by combined mechanisms of the microenvironment regulating lineage-specific gene transcription which promotes the survival of certain cell types (Thisse and Zon, 2002; Traver and Zon, 2002). During the development of the vascular patterns, the organization and function of most villi are continuously refined. We know that vascular tube formation in successive stages, thus executing a distinct gene program at each developmental stage (Umeda et al., 1983), is essential for the establishment of vascular network in placental villi tree.

During this de novo vessel formation, there is the need for a first trigger to induce differentiation of the primary source cells, pluripotent mesenchymal

cells. Since placental vasculogenesis occurs in the absence of already formed endothelium, pre-existing mature endothelial cells and also circulating endothelial precursor cells (Eichmann et al., 2002) are not required for placental vasculogenesis.

Conclusion

By combining our studies with the literature, we have described the developmental stages of placental vasculogenesis and angiogenesis during very early placental development. The haemangiogenic stem cells with further daughter cell populations can be seen as touchstones of angiogenic cell differentiation.

Acknowledgments

This study was supported in part by the Research Fund of Akdeniz, University-Antalya/Turkey and The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK), Turkey (Project no.: SBAG-3267).

References

- Bauer SM, Bauer RJ, Velazquez OC. Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vasc Endovasc Surg* 2005;39:293–306.
- Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta. New York: Springer; 2000.
- Breier G. Angiogenesis in embryonic development – a review. *Placenta* 2000;21(Suppl. A):S11–5.
- Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Kayisli UA, Arici A, Demir R. Localization of vascular endothelial growth factor in the zona pellucida of developing ovarian follicles in the rat: a possible role in destiny of follicles. *Histochem Cell Biol* 2003;120:383–90.
- Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Korgun ET, Savas B, Demir R. Expressions of VEGF and its receptors in rat corpus luteum during interferon alpha administration in early and pseudopregnancy. *Mol Reprod Dev* 2004;67: 414–23.
- Cervar M, Blaschitz A, Dohr G, Desoye G. Paracrine regulation of distinct trophoblast functions in vitro by placental macrophages. *Cell Tissue Res* 1999;295: 297–305.
- Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 2004;25:103–13.
- Cheung CY. Vascular endothelial growth factor: possible role in fetal development and placental function. *J Soc Gynecol Investig* 1997;4:169–77.

- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998;125:725–32.
- Cogle CR, Scott EW. The hemangioblast: cradle to clinic. *Exp Hematol* 2004;32:885–90.
- Cooper JC, Sharkey AM, McLaren J, Charnock-Jones DS, Smith SK. Localization of vascular endothelial growth factor and its receptor, flt, in human placenta and decidua by immunohistochemistry. *J Reprod Fertil* 1995;105:205–13.
- Cunningham SA, Tran TM, Arrate MP, Brock TA. Characterization of vascular endothelial cell growth factor interactions with the kinase insert domain-containing receptor tyrosine kinase. A real time kinetic study. *J Biol Chem* 1999;274:18421–7.
- Davidson AJ, Zon LI. Turning mesoderm into blood: the formation of hematopoietic stem cells during embryogenesis. *Curr Top Dev Biol* 2000;50:45–60.
- de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989–91.
- Demir R. Why is placental vasculogenesis different from conventional vasculogenesis? *ICEM* 2002;2:391–2.
- Demir R, Erbengi T. Some new findings about Hofbauer cells in the chorionic villi of the human placenta. *Acta Anat (Basel)* 1984;119:18–26.
- Demir R, Erbengi T. Possible functions of Hofbauer cells. *Acta Anat* 1987;130(1):24.
- Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erbengi T, Kotowski A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat (Basel)* 1989;136:190–203.
- Demir R, Demir N, Ustunel I, Erbengi T, Trak I, Kaufmann P. The fine structure of normal and ectopic (tubal) human placental villi as revealed by scanning and transmission electron microscopy. *Zentralbl Pathol* 1995;140:427–42.
- Demir R, Kosanke G, Kohnen G, Kertschanska S, Kaufmann P. Classification of human placental stem villi: review of structural and functional aspects. *Microsc Res Tech* 1997;38:29–41.
- Demir R, Kayisli UA, Seval Y, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY, et al. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 2004;25:560–72.
- Demir R, Kayisli UA, Cayli S, Huppertz B. Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. *Placenta* 2006;27:535–9.
- Djonov V, Baum O, Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003;314:107–17.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029–39.
- Eichmann A, Pardanaud L, Yuan L, Moyon D. Vasculogenesis and the search for the hemangioblast. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:207–14.
- Enholm B, Jussila L, Karkkainen M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor-C: a growth factor for lymphatic and blood vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med* 1998;8:292–7.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2000;55:15–35 [discussion-6].
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25:581–611.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439–42.
- Ferriani RA, Ahmed A, Sharkey A, Smith SK. Colocalization of acidic and basic fibroblast growth factor (FGF) in human placenta and the cellular effects of bFGF in trophoblast cell line JEG-3. *Growth Factors* 1994;10:259–68.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376:66–70.
- Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 1999;126:3015–25.
- Gambino LS, Wreford NG, Bertram JF, Dockery P, Lederman F, Rogers PA. Angiogenesis occurs by vessel elongation in proliferative phase human endometrium. *Hum Reprod* 2002;17:1199–206.
- Gu B, Alexander JS, Gu Y, Zhang Y, Lewis DF, Wang Y. Expression of lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) in the human placenta. *Lymph Res Biol* 2006;4:11–7.
- Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997;277:48–50.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353–64.
- Hidaka M, Stanford WL, Bernstein A. Conditional requirement for the Flk-1 receptor in the in vitro generation of early hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7370–5.
- Hiratsuka S, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Maru Y, Shibuya M. Membrane fixation of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis and angiogenesis in mice. *Mol Cell Biol* 2005;25:346–54.
- Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996;15:1751.
- Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis.

- II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 2004; 25:114–26.
- Kayisli UA, Cayli S, Seval Y, Tertemiz F, Huppertz B, Demir R. Spatial and temporal distribution of Tie-1 and Tie-2 during very early development of the human placenta. *Placenta* 2006;27:648–59.
- Khaliq A, Li XF, Shams M, Sisi P, Acevedo CA, Whittle MJ, et al. Localisation of placenta growth factor (PlGF) in human term placenta. *Growth Factors* 1996;13:243–50 [color plates I–II, pre bk cov].
- Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;92:35–43.
- Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:259–70.
- Leach L, Babawale MO, Anderson M, Lammiman M. Vasculogenesis, angiogenesis and the molecular organisation of endothelial junctions in the early human placenta. *J Vasc Res* 2002;39:246–59.
- Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9267–71.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55–60.
- Mayhew TM, Charnock-Jones DS, Kaufmann P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* 2004;25:127–39.
- Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835–46.
- Ni Y, May V, Braas K, Osol G. Pregnancy augments uteroplacental vascular endothelial growth factor gene expression and vasodilator effects. *Am J Physiol* 1997;273:H938–44.
- Pardanaud L, Luton D, Prigent M, Bourcheix LM, Catala M, Dieterlen-Lievre F. Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development* 1996;122:1363–71.
- Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol* 2005;128: 303–9.
- Ribatti D, Vacca A, Nico B, Ria R, Dammacco F. Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. *Curr Mol Med* 2002;2:537–43.
- Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklom P, Kemler R, et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 1988;102:471–8.
- Risau W, Esser S, Engelhardt B. Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells. *Pathol Biol (Paris)* 1998;46:171–5.
- Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995;376: 70–4.
- Schuh AC, Faloony P, Hu QL, Bhimani M, Choi K. In vitro hematopoietic and endothelial potential of flk-1(–/–) embryonic stem cells and embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2159–64.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983–5.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertszenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376:62–6.
- Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, et al. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997;89:981–90.
- Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 1997;18:657–65.
- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171–80.
- Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005;65:550–63.
- Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:1579–86.
- Tertemiz F, Kayisli UA, Arici A, Demir R. Apoptosis contributes to vascular lumen formation and vascular branching in human placental vasculogenesis. *Biol Reprod* 2005;72:727–35.
- Thisse C, Zon LI. Organogenesis – heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science* 2002;295:457–62.
- Torry DS, Torry RJ. Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta. *Am J Reprod Immunol* 1997;37: 21–9.
- Traver D, Zon LI. Walking the walk: migration and other common themes in blood and vascular development. *Cell* 2002;108:731–4.
- Umeda PK, Kavinsky CJ, Sinha AM, Hsu HJ, Jakovcic S, Rabinowitz M. Cloned mRNA sequences for two types of embryonic myosin heavy chains from chick skeletal muscle. II. Expression during development using S1 nuclease mapping. *J Biol Chem* 1983;258: 5206–14.
- Vuckovic M, Ponting J, Terman BI, Niketic V, Seif MW, Kumar S. Expression of the vascular endothelial

- growth factor receptor, KDR, in human placenta. *J Anat* 1996;188(Part 2):361–6.
- Vuorela P, Hatva E, Lymboussaki A, Kaipainen A, Joukov V, Persico MG, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biol Reprod* 1997;56:489–94.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000;408:92–6.
- Zon LI. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* 1995;86:2876–91.



Cellular diversity of human placental stem villi: An ultrastructural and immunohistochemical study

Leyla Sati^a, Yasemin Seval^a, Ayse Yasemin Demir^b, Georg Kosanke^c, Gaby Kohnen^d, Ramazan Demir^{a,*}

^aDepartment of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, 07070 Campus, Antalya, Turkey

^bDepartment of Clinical Chemistry and Hematology, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands

^cDepartment of Anatomy II, Klinikum, RWTH, Aachen, Germany

^dDepartment of Obstetrics and Gynecology, Glasgow Royal Infirmary, UK

Received 7 February 2007; received in revised form 25 April 2007; accepted 27 April 2007

This study is dedicated to the health of our beloved friend Prof. Dr. Peter Kaufmann

KEYWORDS

Human placenta;
Stem villi;
Myofibroblast;
Immuno-
histochemistry;
Ultrastructure

Summary

The aim of the study was to investigate the distribution and differentiation of cell types in the stroma of human placental stem villi (SV). A total of 14 human term placental tissues were studied. Double immunolabeling was performed for desmin-vimentin, desmin- α -smooth actin and vimentin- α -smooth actin. Cytokeratin 7, proliferating cell nuclear antigen immunolabeling was also performed. Parallel tissue samples were examined by transmission electron microscopy. HSCORE was performed for the semi-quantitative analysis of distribution of cells in the stroma of SV. Vimentin-labeled cells were mostly distributed in the subtrophoblastic area. Desmin-vimentin double immunolabeling was mainly localized in the triangular area and to a lesser degree in the perivascular area and vessel walls ($p = <0.001$). However, desmin- α smooth actin labeling was observed predominantly in the vessel wall and perivascular area. Vimentin- α smooth actin immunoreactivity was significantly stronger in the triangular and perivascular areas compared to the vessel walls ($p = 0.003$). Ultrastructurally, cells in the stroma of SV were mesenchyme cells, reticulum cells, fibroblasts, myofibroblasts, smooth muscle cells, and Hofbauer cells, filamented and vacuolated cells. The differentiation of myofibroblasts in the triangular and perivascular areas may play a role in maturation of SV and villous contractility, modulation of the intervillous space and this may have effects on maternofetal placental circulation.

© 2007 Elsevier GmbH. All rights reserved.

*Corresponding author. Tel./fax: +90 242 227 44 86.

E-mail address: rdemir@akdeniz.edu.tr (R. Demir).

Introduction

Histological investigations of human term placental tissues distinguish five different villous segments (Benirschke, 2000; Castellucci et al., 1990; Kaufmann, 1982; Kaufmann and Burton, 1994; Kaufmann et al., 1979) according to fetal vessel types and the stromal architecture. The first attempts to analyze their developmental interactions (Castellucci et al., 1990; Kaufmann, 1982) and branching patterns (Kosanke et al., 1993) led to the concept that during the first trimester the mesenchymal villi (MV) are the forerunners of the immature villi, which then transform into immature intermediate villi (IMIV) and stem villi (SV). During the second half of pregnancy, this developmental pattern changes; MV thereafter transform into mature intermediate villi (MIV), which at the beginning of the third trimester start producing terminal villi (TV) at their surfaces. These TV represent the most important exchange region for nutritive substances and oxygen until the end of pregnancy.

Some fibroblast-like cells of different tissues have been reported to show ultrastructural features of both fibroblasts and smooth muscle (SM) cells (Gabbiani et al., 1971, 1972; Komuro, 1990; Majno et al., 1971). These cells were called “myofibroblasts” and provide contractile power for wound contraction (Hinz et al., 2001b; Serini and Gabbiani, 1999; Tomasek et al., 2002). Myofibroblasts were found to have some ultrastructural features common to SM cells; however, in other respects they are dissimilar to muscle cells (Kapanci et al., 1974; Kaye et al., 1971; Scully, 1981).

Myofibroblasts can, according to the experimental or clinical situation, express other SM cell contractile proteins, such as SM-myosin heavy chains or desmin; however, the presence of α -smooth muscle actin (α -SMA) represents the most reliable marker of the myofibroblastic phenotype (Tomasek et al., 2002). It has been shown that α -SMA expression in stress fibers is essential for the acquisition of high contractile activity by myofibroblasts, in the absence of the neo-expression of any other SM cell-specific contractile protein, e.g., SM-myosin (Hinz et al., 2001a). The temporal or permanent expression of α -SMA in fibroblastic cells is generally related to the development of structural features typical of myofibroblasts.

Important advances have been made recently in understanding several aspects of myofibroblast biology. Earlier immunohistochemical studies strongly suggested the presence of myofibroblast cells in the villous stroma of human placental SV (Beham et al., 1988; Demir et al., 1992, 1994; Feller et al., 1985; Kohnen et al., 1995, 1996).

These findings were controversial since Feller et al. (1985) used the histochemical localization of dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) as a specific marker for myofibroblast cells, an interpretation which was questioned by others. However, the co-expression of desmin, vimentin and α -SMA (Graf et al., 1997; Kohnen et al., 1995) and the ultrastructure of some of the stromal cells (Demir et al., 1992, 1994) made the presence of myofibroblast cells seem very likely. The myofibroblasts are characterized by antibody reactions against components in the intracellular microfilaments such as α -SMA and members of the intermediary filaments such as vimentin, desmin and laminin (Fuchs and Cleveland, 1998; Iwasaki et al., 1987).

According to Kohnen et al. (1996), some myofibroblast cells showed immunohistochemical labeling patterns that seem to be associated with specific stromal areas and elements of the vessel wall of the SV core. At that time we considered the possibility that there is a stromal barrier between the peripheral stroma and vessel walls that might affect SV maturation.

The aim of this current study was to examine the relationship between maturation of human placental SV and myofibroblast cells, and to investigate the stromal architecture with regard to the cellular diversity and distribution of placental SV.

Materials and methods

Tissue collection and storage

Samples from human placentas were obtained after legal delivery of pregnancies. In all cases, written consent from patients and approval of the local ethical committee was obtained. Tissues were supplied by the Department of Obstetrics and Gynecology, Medical Faculty, Akdeniz University, Antalya, Turkey.

A total of 14 normal human placental tissue samples were studied. The specimens were from 3rd trimester of pregnancy with full-term delivery: post-conception (p.c.) weeks 36–38 (six samples 36 weeks p.c.; and eight samples 38 weeks p.c.). Tissues were classified as described previously (Demir et al., 1989) by assessing the embryonic developmental stages according to the Carnegie classification (O’Rahilly, 1973).

Immunohistochemistry

Human placental samples were fixed immediately in formalin fixative at room temperature for

6 h. Samples were then processed for embedding in paraffin wax using standard methods. 5- μ m thick sections were cut by microtome and collected onto poly-L-lysine-coated slides (Sigma, St. Louis, MO).

Sections were labeled for binding of antibodies against cytokeratin 7, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), vimentin, desmin and α -SMA, as follows. Serial sections were dewaxed, rehydrated, and placed in citrate buffer. To unmask antigens, an antigen-retrieval procedure was performed by heating the samples twice in a microwave oven at 750 W for 5 min each time. After cooling for 20 min at room temperature, the sections were washed in phosphate buffered saline (PBS) and then soaked in 3% H_2O_2 for 15 min to quench endogenous peroxidase activity. All subsequent dilutions and thorough washes between stages were performed using PBS unless otherwise stated. After blocking with Ultra V blocking reagent (Lab Vision, Fremont, CA) for 10 min at room temperature to reduce non-specific binding, sections were incubated with 1:100 dilution of mouse monoclonal cytokeratin 7 (NeoMarkers, Fremont, CA), 1:3000 dilution of mouse monoclonal PCNA (Sigma), 1:100 dilution of mouse monoclonal anti-desmin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), prediluted mouse monoclonal anti-vimentin (Dako Corporation, Carpinteria, CA), 1:300 dilution of mouse monoclonal α -SMA (Santa Cruz Biotechnology) antibodies for 1 h at room temperature. Binding of the primary antibodies was detected using LSAB 2 streptavidin-biotin horseradish peroxidase kit (Dako), employed according to manufacturer's instructions, for 20 min. Antibody complexes were then visualized by incubation with diaminobenzidine (DAB) chromogen (Lab Vision kit) prepared using 1–2 drops (40–100 μ l) of DAB chromogen with each 1 ml of DAB substrate. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Dako) for 10 s, dehydrated, mounted glycerol-gelatin, and examined using an Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

In order to visualize the presence of desmin and vimentin, or α -SMA and desmin, or α -SMA and vimentin, double labeling was performed with antisera in the same dilutions as in single labeling experiments. For double labeling with desmin/vimentin, α -SMA/desmin and α -SMA/vimentin, first desmin and α -SMA reactions were developed using DAB chromogen as described above. The sections were then re-incubated with primary antibody against vimentin and desmin, overnight at 4°C. Then, the sections were incubated with a ready-to-use biotinylated secondary antibody (Dako) for 20 min followed by a ready-to-use streptavidin-alkaline phosphatase complex (Dako) for 20 min.

Slides were developed in Fast Red chromogen (tablets from Lab Vision), prepared according to manufacturer's instructions in naphthol phosphate substrate, for 5 min (1 tablet for 5 ml of naphthol phosphate substrate) and mounted with glycerol-gelatin.

Negative controls were performed by replacing the primary antibodies with mouse IgG1 (Dako, Denmark) or mouse IgG2 (for PCNA; Dako, Denmark) at the same dilutions used for primary antibodies.

Semi-quantitative analysis of immunolabeling intensities

The intensity of immunolabeling reaction was evaluated semi-quantitatively as follows. Cells were scored according to the following categories: 0 (no labeling), + (weak but detectable), ++ (moderate or distinct), +++ (intense). In order to demonstrate the double labeling distributions, for each slide, an HSCORE value was calculated by summing the percentages of cells grouped in one intensity category and multiplying this number with the weighted intensity of the labeling, using the formula [$HSCORE = \sum P_i(i+1)$], where i represents the intensity scores and P_i is the corresponding percentage of the cells. For each placental sample, five parallel tissue sections were randomly selected and five randomly selected SV were evaluated for each tissue section microscopically using 400 $\times$ original magnification. The percentage of cells for each intensity within these areas was determined by two investigators in "blind" (coded) studies, and the average score was used. The H-SCORE values were graphed.

Electron microscopy

Fourteen clinically normal human placentas were studied. After normal vaginal delivery, chorionic vessels for one cotyledon were clamped. These vessels were cannulated near to the clamp, and the cotyledon was perfused with 0.1M cacodylate buffer followed by perfusion fixation with buffered 2.5% glutaraldehyde, pH 7.4. Small bundles of villi not exceeding 2 $\times$ 1 $\times$ 1 mm³ derived from different parts of the chorionic sac of placenta were also removed from all specimens and fixed with 2.5% buffered glutaraldehyde for 2 h. All specimens were placed in 1% phosphate-buffered osmium tetroxide for 1 h, dehydrated through a graded series of ethanol and embedded in Araldite CY 212. The 1- μ m thick semi-thin and ultrathin sections were cut using a Nova ultramicrotome. Semi-thin sections

were stained with alkaline toluidine blue-pyronine solution for light microscopical observations. Ultra-thin sections were collected on coated grids and contrast stained with uranyl acetate and lead citrate prior to examination with a transmission electron microscope (Philips 300, Zeiss EM 10 and Leo 910).

Results

Stem villi classification

Human placental SV were classified into three groups according to their diameters: large SV (type I, $\theta > 250 \mu\text{m}$), medium SV (type II, $\theta > 150 \mu\text{m}$ to $250 \mu\text{m}$) and small SV (type III, $\theta < 150 \mu\text{m}$) according to our previous study (Demir et al., 1997).

The representative distributions of cell types in the placental SV are indicated in Fig. 1.

Immunohistochemical findings

Immunohistochemistry results using antibodies to cytokeratin 7, PCNA, desmin, vimentin and α -SMA showed different localization in their distribution patterns. The immunolabeling for cytokeratin 7 was performed in order to localize the trophoblastic layer of human placental SV (Fig. 2a). The proliferation marker PCNA was mainly localized in the cells of the intima layer (*Tunica intima*) of vessel walls (Fig. 2b). The semi-quantitative analysis of immunolabeling for desmin, vimentin and α -SMA are shown in Table 1 in different regions of SV. The distribution of desmin-positive cells was largely localized in the outer part of the media layer (*Tunica media*) of vessel walls, but not in the inner part. Desmin immunopositive cells were mainly observed in the so-called “triangular area”, which is surrounded and bordered by vessel walls compared to perivascular area and sub-trophoblastic region in the villous stroma (Fig. 2c).

In contrast to desmin, the intima layer of vessel walls showed a dense vimentin labeling. Vimentin is a marker of mesenchymal cells. Even though there was a high labeling intensity in the triangular area, relatively less labeling was observed in the sub-trophoblastic region and perivascular areas (Fig. 2d).

The presence of α -SMA as the most reliable marker of myofibroblastic cells was mainly localized in the media layer of vessel walls and in perivascular areas (Fig. 2e). The triangular area and sub-trophoblastic regions were comparatively less immunopositive for α -SMA. However, a weak immuno-reaction was detectable in the intima layer of the vessel wall.

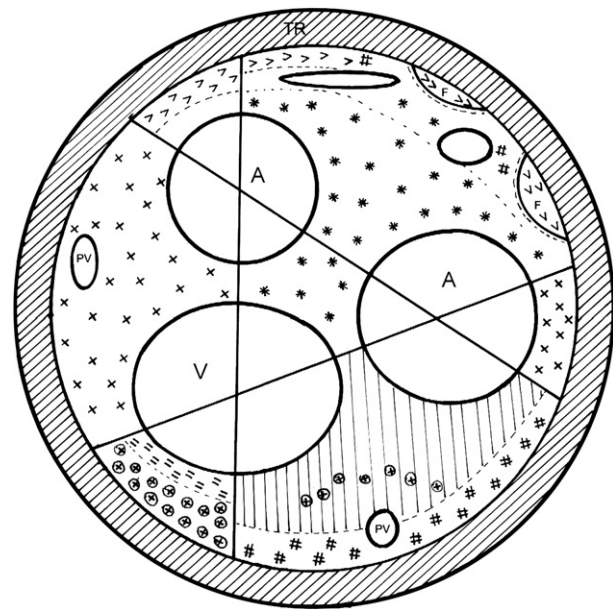


Figure 1. Distribution and localization of stromal cell populations in human placental stem villi. Regional indications with different symbols are as follows: |||| fibroblasts, multiple branched and few branched; (= = = =) typical contractile muscle cells, myoblast or myocyte; (xxxx) mesenchymal and glycogen rich cells; (++++ (in circles) Hofbauer cell in compressed stromal channel; (#####) reticulum cell; >>>> vacuolated and tonofilament-rich cells related to fibrinoid degeneration; (****) myofibroblasts. A = artery, V = vein; TR = trophoblast; F = fibrinoid; PV = peripheral vessels.

The vessel walls and the stroma of the SV were separately examined by HSCORE analysis for double labeling and results are illustrated in Fig. 3. The desmin-vimentin double immunolabeling (Fig. 4a) was mainly localized in the triangular area and to a lesser degree in the perivascular area and vessel wall. There was a significant difference in their distribution patterns ($p = < 0.001$). Desmin- α -SMA labeling (Fig. 4b) was observed predominantly in the vessel wall and perivascular areas (not statistically significant, $p = 0.063$). Vimentin- α -SMA immunoreactivity (Fig. 4c) was significantly stronger in the triangular and perivascular areas compared to the reactivity found in the vessel wall ($p = 0.003$).

Ultrastructural findings

Eight cell types were identified ultrastructurally in SV stroma: fibroblasts, myofibroblasts, and reticulum cells, Hofbauer cells in compressed channels, mesenchymal cells, filamented cells, vacuolated cells and SM cells. The distribution

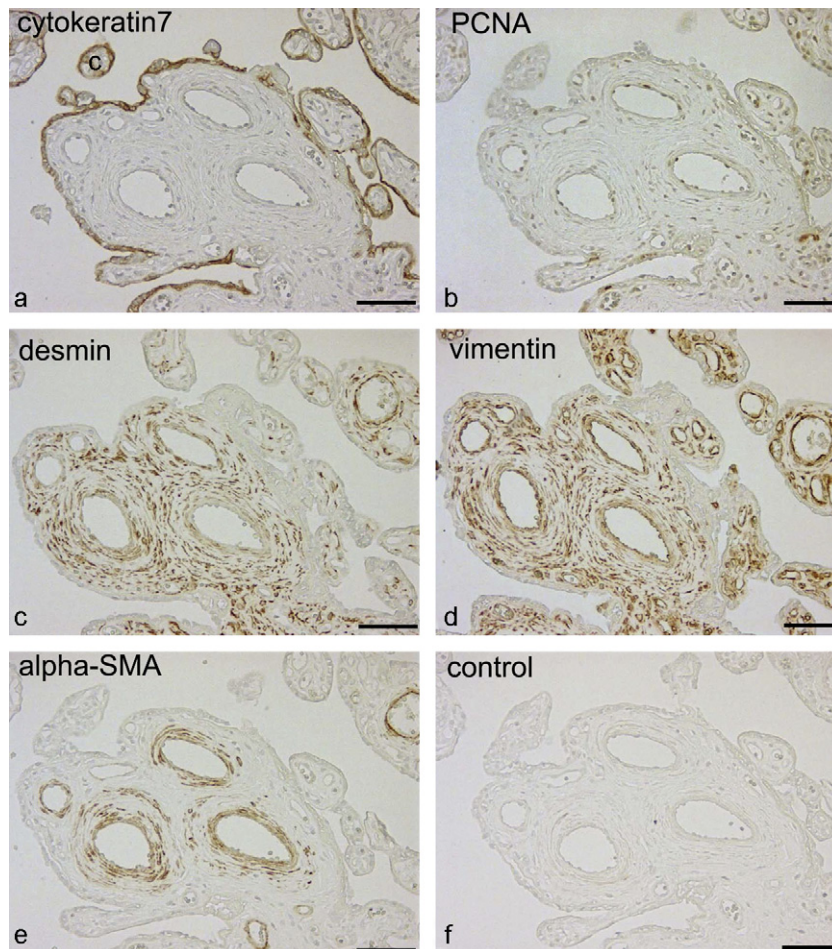


Figure 2. The different immunohistochemical labeling patterns in human placental stem villi of: (a) cytokeratin 7 (b) PCNA (c) desmin, (d) vimentin, (e) α -SMA and (f) control slides showed no labeling. Scale bar = 50 μ m.

Table 1. The semi-quantitative distributions of desmin, vimentin and α -SMA in villous stroma of stem villi

	Vessel wall		Stroma		
	IL	ML	PVA	TAA	STR
Desmin	0	++	++	+++	++
Vimentin	++	+	++	+++	++
α -smooth actin	+	+++	+++	++	+

IL = intima layer, ML = media layer, PVA = perivascular area, TAA = triangular area, STR = sub-trophoblastic region. The degree of immunoreactivity was evaluated as: 0 = absent; (+) weak; (++) moderate; (+++) strong.

and localization of these different cells types in the stroma of SV are demonstrated in Fig. 5.

The structural order of large vessel wall

Apart from small peripheral vessels, generally, 2–3 large vessels were situated in the stroma of SV.

They consisted of an intima layer including endothelium and sub-endothelium, and a media with several layers of SM cells (Figs. 5b and c). The intima was composed of endothelium, myofibroblast-like cells and some SM cells and extracellular matrix (ECM) showing a regular, thin, parallel line configuration. The lumen was lined by a continuous sheet of endothelial cells that appeared to have an intense metabolism. Many pinocytotic vesicles of different size were observed (Fig. 5b).

In some arteries, endothelial cells bulged into the lumen. Others with signs of hyperactivity were very irregularly shaped and formed digitations attached to adjacent cells by numerous junction complexes (Fig. 5b). Some endothelial cells of arteries had zones that were free of organelles, but filled with many pinocytotic vesicles. Mainly amorphous ECM was present in this region, SM cells with rich glycogen particle accumulation and myofibroblast-like cells were situated among this matrix, which contained very few collagen fibers, and these were differently orientated (Figs. 5b and c).

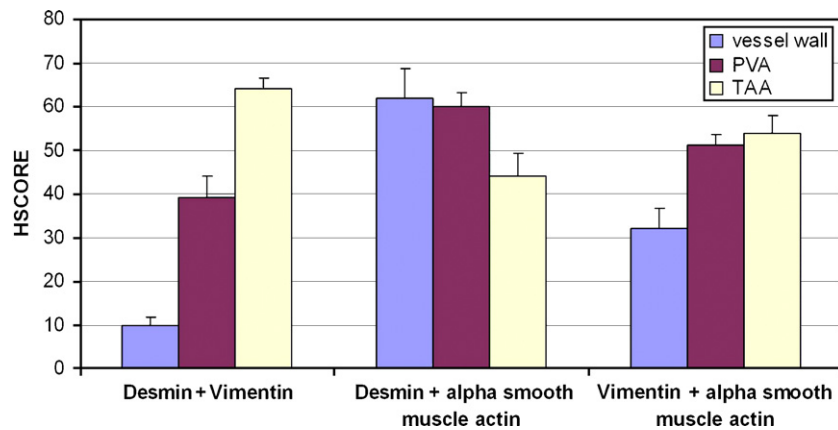


Figure 3. The immunohistochemical distribution of desmin-vimentin, desmin- α -SMA and vimentin- α -SMA double labeling by means of HSCORE. Desmin-vimentin double labeling was mainly localized in the triangular area (TAA). Both desmin- α -SMA positive cells were predominantly found in the vessel wall (VW) and perivascular area (PVA). Vimentin- α -SMA double-labeled cells were observed strongly in the TAA and PVA.

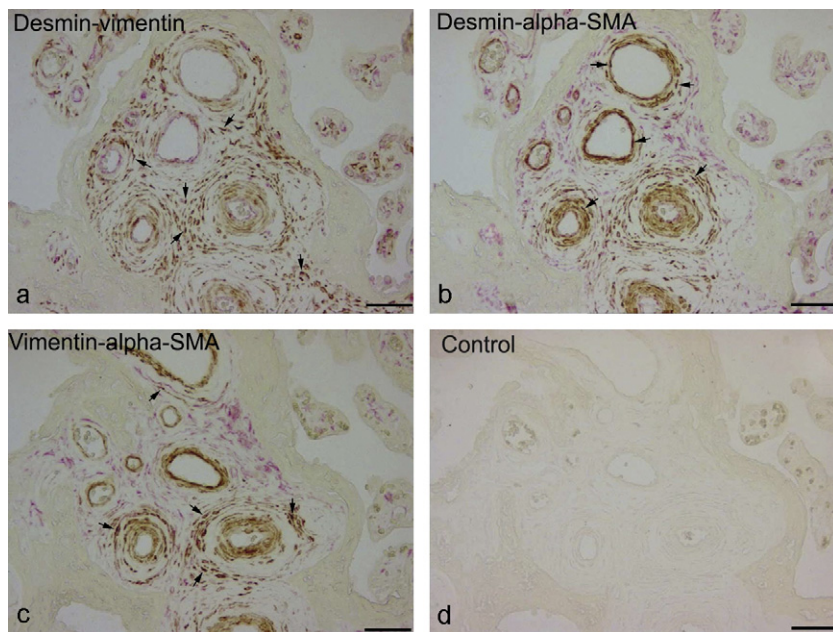


Figure 4. The immunohistochemical distribution of: (a) desmin-vimentin (b) desmin- α -SMA and (c) vimentin- α -SMA double immunolabeling. (d) Control slides showed no labeling. Arrows show the double-labeled cells in different areas of stem villi. Scale bar = 50 μ m.

The media layer of the arteries consisted of the same cellular and fibrillar elements as that of veins, but was much thicker. It was found to have three cell types: fibroblasts, myofibroblasts and contractile SM cells. In the media layer muscle cells, the peripherally localized myofibroblast-like cells differentiated to centrally localized normal SM cells. Ultrastructurally, the SM cells of the media of SV vessels showed the typical features of SM cells, including abundant cytoplasmic filaments with dense bodies occupying almost all the cytoplasm, and few perinuclear organelles (Figs. 5c and d). The

cytoplasmic filaments in some portions of the cytoplasm had fairly well developed surface vesicles that were enveloped by material similar to that of the external lamina surrounding the cells (Figs. 5b and d). Cell forms transitional between myofibroblast and SM cells were observed in the media (Fig. 5e). Disintegration of fibers and amorphous components were found at the cell periphery.

The ECM was dominant in the media layer and increased in quantity with increasing diameter of the SV. In some sections, the ECM seemed to form

concentric circles surrounding the vessels. The above-mentioned cell populations and matrices, typical SM cells – fibroblasts, myofibroblasts and dense ECM – were dominant in vessel walls of type I (large) SV. In type II (medium) and type III (small) SV vessel walls, dense ECM, muscle cells and fibroblasts were abundant in the intima or the media.

The largest segments of vessel in SV near the chorionic plate had a very dense fibrous wall consisting of very few cells and bundles of large fibers elongated in different directions to the axis of the villi. At the level of branching stem villous segments, cellular elements were very rare in the septum separating three neighboring vessels.

Extravascular stromal cell population

We were able to identify all the cell types indicated earlier in the extravascular stroma. These stromal cells were related to each other, and all showed varying degrees of maturation and polymorphism. Typical myofibroblast cells with

characteristics of both fibroblast and SM cells were observed in the extravascular stroma. These cells had invaginated nuclei, well-developed rough endoplasmic reticulum (rER) cisternae, mitochondria and moderately developed other cytoplasmic organelles, dense bodies among the filaments dispersed in the cytoplasm and fragments of external lamina (Fig. 5f). Microfilaments were sparse and only present at some points within the cytoplasm. Surface vesicles, identified as invaginations of some portion of the cell membrane, were rarely present. The normal myofibroblast cells were seen to contain relatively abundant cytoplasmic filaments with distinct dense bodies and plaques along the cell membrane, and rER cisternae (Fig. 5f).

Varieties of fibroblasts and myofibroblasts were the dominant cell types in the stroma of type II (medium) and type III (small) SV. In all three types

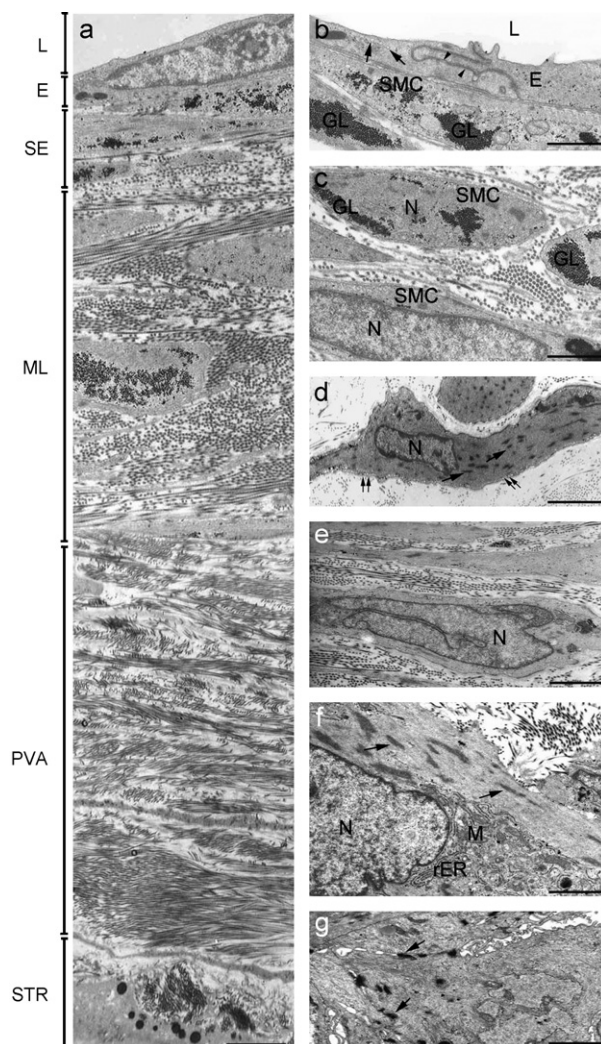


Figure 5. (a) Transmission electron micrograph across the wall of a vessel and stromal elements in stem villi core from lumen (L) to periphery. Note the very thin endothelium (E) lining the lumen. A thick media layer (ML) containing circularly oriented smooth muscle cells, perivascular area (PVA) with abundant collagen fibrils and subtrophoblastic regions (STR) were also seen. Scale bar = 1.70 μ m. The relative cell distribution for each topographic region was presented as follows: (b, c) Ultrastructure of intima and media layers of vessel walls of stem villi are seen. The vascular intima composed of endothelium (E), subendothelium (SE) containing myofibroblast; smooth muscle cells (SMC) beneath the endothelium are seen. Pinocytotic activity (arrows) is appearing in endothelial cells with cytoplasmic projections into vascular lumen (L) and with cellular connection complexes (digitation like; arrow heads) between two cells were seen. Scale bars = 0.90 μ m. (d) Ultrastructurally, a typical smooth muscle cell, including abundant cytoplasmic filaments with dense bodies (arrows) occupying almost all cytoplasm, surface vesicles (double arrows) and few perinuclear organelles. Scale bar = 3.30 μ m. (e) A typical transitional cell between myofibroblast and smooth muscle cell with irregular nucleus is seen. There are a few dense bodies and surface vesicles that are present and external lamina is obvious. Scale bar = 2 μ m. (f) The typical myofibroblast cell showing transitional features between fibroblast and smooth muscle cells is seen. The half of the cell cytoplasm included well-developed rER cisternae, the rest had myofilament bundles and dense bodies (arrows) and a fragmented external lamina was found. M: Mitochondria. Scale bar = 0.70 μ m. (g) This micrograph shows a different cell type which is tonofilament-rich and connected to others by true desmosome complexes (arrows) at the periphery of stem villi. These cells surrounded by fibrinoid showed some characteristics of trophoblastic cells. Scale bar = 1.40 μ m. N: nucleus; GL: glycogen particle accumulations.

of SV, Hofbauer cells were regularly found in compressed stromal channels (Fig. 6).

A different cell type containing local cytoplasmic tonofilament bundles, but sparse numbers of cytoplasmic organelles, was observed at the periphery of the SV. These cells formed cell groups with several true desmosome complexes between their cytoplasmic processes (Fig. 5g). These cells were surrounded by different types of fibrinoid. Also, some vacuolated or non-vacuolated cell types were seen. These featured very well developed rER cisternae, glycogen accumulations, large lipid droplets, tonofilaments bundles and cytoplasmic projections on the surface associated with the fibrinoid degeneration. They were observed in the peripheral regions (Fig. 7).

There were some other cell forms in the different parts of SV stroma having features as follows. Some of these stromal cells were spindle-shaped, resembling fibroblasts. Rare cell-to-cell contacts existed as junction complexes of macula adherens-type and desmosome-like texture. Cytoplasmic processes extended into the interstitial space, which was filled with loose ECM. Cells like these were more numerous in triangular stromal areas formed by two or more vessels and less numerous at the villous circumference.

Discussion

The ultrastructural composition of cores of SV was very heterogeneous. As described previously (Benirschke, 2000; Kaufmann et al., 1977; Kaufmann et al., 1979), placental SV connective tissue is composed of fibroblasts, reticulum cells, myofibroblasts, SM cells, pericytes, Hofbauer cells and plasma cells, as well as a variable number of undifferentiated mesenchymal cells.

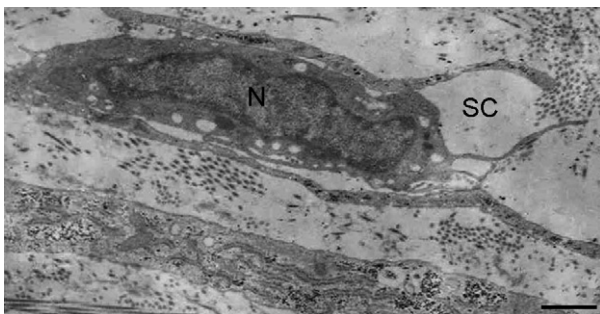


Figure 6. A Hofbauer cell in compressed stromal channels (SC) with very dense granules, micro- and macro-pinocytotic vesicles is seen. These cells are rarely found at the periphery stroma of stem villi. N: nucleus. Scale bar = 2 μ m.

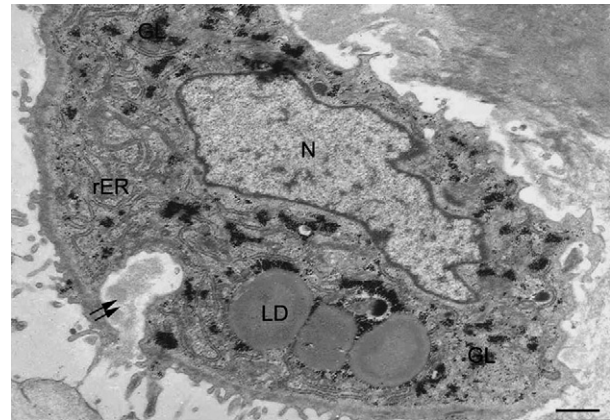


Figure 7. The cell type with many cytoplasmic extensions on the cell surface, which is related to fibrinoid areas, reflecting large lipid droplets (LD), glycogen accumulations (GL), well-developed rER cisternae, abundant microfilament bundles. Interestingly, this cell type shows a large caveola type of opening on the cell surface (double arrows). N: nucleus. Scale bar = 2 μ m.

Fibroblastic stromal cells, which constitute the predominant cell type in mesenchymal tissues, are responsible for the production of most connective components (Serini and Gabbiani, 1999; Tomasek et al., 2002). According to previous studies (Kohnen et al., 1995, 1996), stromal villi maturation takes place due to immunobiological differentiation of some cell series, including mesenchymal cells, fibroblasts, myofibroblasts and muscle cells in villi cores. The main differentiation cell type, myofibroblast, is accepted. Myofibroblastic cells seem to be rare and are considered to be accompanying cells (Gabbiani, 1981; Lipper et al., 1980; Majno et al., 1971). In our placental samples, myofibroblast cells were most frequently observed in the extravascular stroma of placental SV, and were associated with the media layers of vessels.

According to the results of the study reported here, myofibroblast cells were localized abundantly in triangular areas formed by two or more large vessels, and in peripheral middle stroma of SV and also in the media layer of vessels. The remarkable demonstration of myofibroblast cells only in the specific areas of SV reported here has not previously been clearly demonstrated in human placental villi. Nevertheless, Feller et al. (1985) suggested that these cells appeared in all of the placental villi cores during different periods of pregnancy.

Ultrastructure of the transitional cell forms between fibroblast and SM cell components revealed well-formed myofibroblasts with dilated cisternae of rER, irregular shaped nuclei and bundles of myofilaments with dense bodies. Myofibroblast cells showed

typical criteria as mentioned by Gabbiani et al. (1971); developing features of cytoplasmic organelles were observed. In some myofibroblast cells, about half of the cell cytoplasm included well-developed rER cisternae; the rest had myofilament bundles and dense bodies. Around the cell membrane, the presence of basal lamina fragments was observed. These criteria of myofibroblast cells were identified in stroma of all types of SV. According to the results of this study, the numbers of myofibroblast cells increased in triangular areas interposed between two or more large vessels and peripheral regions of stroma.

Scanning electron microscopy (SEM) demonstrated the stellate form of myofibroblast-like cells in this region and their tendency to establish three-dimensional networks (Castellucci and Kaufmann, 1982a, b; Demir et al., 1994). It would appear that myofibroblast cells can play an important role in regulation and maintenance of normal fetal blood flow in human placental villi as well as in the regulation of intervillous maternal blood flow (Demir et al., 1992; Kohnen et al., 1996). Recently, Bosco et al. (2005) suggested that in severe pre-eclampsia, the decreased placental blood flow may be due to structural and functional impairment of the endothelium of the vessels of SV and the surrounding perivascular and stromal myofibroblasts, by increasing thrombomodulin expression, which may modulate fetal blood flow in the villous tree. We observed a different cell type surrounded by different types of fibrinoid with abundant tonofilament bundles and several true desmosome complexes between their cytoplasmic processes. These cells might be associated with fibrinoid degeneration in peripheral regions of SV suggesting a structural correlate to changing pressure conditions in SV.

Depending on the vessel damage in the placental vascular bed, the generation of the endothelial cells will be impaired by means of special cells which are probably derived from myofibroblast cells and not only undergo morphological changes, but also move to intimal layers of vessels to form a pseudo-endothelial lining. Our results have demonstrated that most of the PCNA positive cells were localized in the intima layer of vessel walls, indicating that these cells might possibly have a hidden potential to differentiate into endothelial or subendothelial cells and these cells might be important in the processes of repair and replacement of cells following endothelial injury.

Myofibroblast differentiation is a complex process, regulated by several factors (including transforming growth factor β 1), an ECM component (the EDA splice variant of cellular fibronectin) (Muro

et al., 2003), as well as the presence of mechanical tension (Desmouliere et al., 1993). These findings suggest that myofibroblast cells originate from mesenchymal stem cells undergoing myofibroblastic differentiation. These findings are compatible with those of the special myofibroblastic phenotypes (Kohnen et al., 1996) that might employ specific functions, such as contractile properties, that play a regulatory role in the feto-placental blood flow. According to our results, transitional cells between fibroblasts and myofibroblast cells possibly indicate that myofibroblast cells may be transformed into SM cells in vessel walls. The modulation and regulation ECM (Demir-Weusten et al., 2007) and the growth into different stromal cell types may provide the effect for villi maturation.

After the description of myofibroblasts which were intermediate between the SM cells and fibroblasts in granulation tissue by Gabbiani et al. (1971), there has been increasing interest in the determination the origin and fate of these cells in the placenta (Demir et al., 1992; Skalli et al., 1986, 1987). SM cells, which seem to deviate from other stromal elements in different sources, may play roles in pathological processes (Fujii et al., 1981).

Some investigations (Konishi et al., 1984; Scully, 1981) suggested a possible origin for the muscle elements in multipotential mesenchymal cells that can show a differentiation towards the fixed connective tissue cells and angiogenic cells in human placental villi core (Demir and Erbenli, 1984a, b; Demir et al., 1989, 2006, 2007; Kaufmann et al., 1977, 1979). Konishi et al. (1984) suggested that during the development of the human fetal uterus, immature SM cells resembling myofibroblasts originate from undifferentiated mesenchymal cells which surround the paramesonephric ducts. However, the participation of SM cells and myofibroblast cells in the normal human placental SV was not clearly defined.

Recently, Lakhe-Reddy et al. (2006) demonstrated that beta 8 cytosolic tail in mesangial cells organize a signaling complex that culminates in Rac1 activation to mediate wild-type differentiation, whereas decreased beta 8 activation shifts mesangial cells toward a RhoA-dependent myofibroblast phenotype. They transduced the mesangial cells with inhibitory Rac peptide fused to human immunodeficiency virus-Tat, resulting in enhanced α -SMA organization (Lakhe-Reddy et al., 2006).

According to our findings, transitional cells, which were myofibroblast cells with features between those of SM cells and fibroblasts, occur in the peripheral regions of the media layer in large vessels of placental SV. There was agreement

between the immunohistochemical findings reported by Kohnen et al. (1995, 1996) and our own ultrastructural results (Demir et al. 1992, 1994). Ultrastructural findings in the study reported here show that there are cells with some features of both SM cells and fibroblasts, which are ultrastructurally very similar to myofibroblasts described in granulation tissues (Gabbiani et al., 1971, 1972; Ghahtially, 1982; Sappino et al., 1990). We believe that the myofibroblast cells at triangular areas of stroma and near the media layers of vessels of SV that exhibited these features may have the ability to differentiate into both SM cells and endothelial cells, in response to changes in the placental environment and the hemodynamics of the fetal circulation.

This immunohistochemical study mapping the distribution of cytoskeletal proteins demonstrated that the stromal cells of the human placental villous tree demonstrate a maturation and differentiation from the mesenchymal precursor via the reticular cell towards a fibroblast and myofibroblast or SM cell. The centrally positioned cells of the SV have a higher maturation than the cells of the periphery in the villi and they start differentiation from the periphery to the central region (Kohnen et al., 1996).

Proliferation studies regarding SM cells *in vitro* (Kocher et al., 1991; Wu et al., 2003) and *in vivo* (Clowes et al., 1988; Owens and Thompson, 1986) revealed a dramatic decrease in α -SMA synthesis preceding the onset of proliferation (Owens and Thompson, 1986) and a switch towards a β -cytoplasmic actin predominance (Barja et al., 1986; Clowes et al., 1988; Kocher et al., 1984, 1991).

Investigations on cultured fibroblasts demonstrate the loss of α -SMA as a transformation sensitive marker (Leavitt et al., 1985). This result can be interpreted in two different ways: first it shows that cultured fibroblasts can exhibit SM differentiation markers, as already known from several studies (Mattey et al., 1997; Narine et al., 2006; Saeed et al., 2004), secondly the loss of α -SMA in cultured fibroblasts coincides with transformation and degeneration of the cells. Our previous results indicated a higher cyto-differentiation of cells co-expressing vimentin, desmin and α -SMA during the SV core maturation (Kohnen et al. 1996).

To conclude, the main findings of this study are:

- (a) The development of placental villous trees takes place by means of cellular differentiation from stem cell to varieties of villi core cells, which show a distribution according to functional aspects.
- (b) During SV maturation, the main cellular differentiation process takes place between fibro-

blastic cells and SM cells by means of the co-expression of cytoskeletal proteins.

- (c) Some stromal areas of SV provide a source for stromal development and differentiation by means of various cellular populations, and under severe hemodynamic stresses, myofibroblast cells undergo morphological and biomolecular changes to form, probably, new cell varieties in vascular walls.

Acknowledgments

We would like to thank Sibel Ozer for her excellent technical assistance. This work was partly funded by Grants from Akdeniz University Research Foundation and the Technical Research Council of Turkey (TUBITAK) (Project no: SBAG-3267 (1055460)).

References

- Barja F, Coughlin C, Belin D, Gabbiani G. Actin isoform synthesis and mRNA levels in quiescent and proliferating rat aortic smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Lab Invest* 1986;55:226–33.
- Beham A, Denk H, Desoye G. The distribution of intermediate filament proteins, actin and desmoplakins in human placental tissue as revealed by polyclonal and monoclonal antibodies. *Placenta* 1988; 9:479–92.
- Benirschke KKP. Pathology of human placenta. New York, Berlin: Springer; 2000.
- Bosco C, Parra M, Barja P, Rodrigo R, Fernandez V, Suarez M, et al. Increased immunohistochemical expression of thrombomodulin at placental perivascular myofibroblast in severe preeclampsia (PE). *Histol Histo-pathol* 2005;20:1045–55.
- Castellucci M, Kaufmann P. Evolution of the stroma in human chorionic villi throughout pregnancy. *Bibl Anat* 1982a;40–5.
- Castellucci M, Kaufmann P. A three-dimensional study of the normal human placental villous core: II. Stromal architecture. *Placenta* 1982b;3:269–85.
- Castellucci M, Scheper M, Scheffen I, Celona A, Kaufmann P. The development of the human placental villous tree. *Anat Embryol (Berl)* 1990;181:117–28.
- Clowes AW, Clowes MM, Kocher O, Ropraz P, Chaponnier C, Gabbiani G. Arterial smooth muscle cells in vivo: relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin. *J Cell Biol* 1988;107:1939–45.
- Demir R, Demir N, Kohnen G, Kosenke G, Mirinov AV, Ustunel I, et al. Ultrastructure and distribution of myofibroblast-like cells in human placental stem villi. *Electron Microsc* 1992;3:509–10.
- Demir R, Erbeni T. Architecture of the chorionic villi core in human placenta. *Acta Anat* 1984a;120:19–20.

- Demir R, Erben T. Some new findings about Hofbauer cells in the chorionic villi of the human placenta. *Acta Anat* 1984b;119:18–26.
- Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erben T, Kotowski A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat* 1989;136:190–203.
- Demir R, Kaufmann P, Ustunel I, Kohnen G, Mironov V. Myofibroblast-like cells in human placental stem villi. *ICEM-13* 1994;109–10.
- Demir R, Kosanke G, Kohnen G, Kertschanska S, Kaufmann P. Classification of human placental stem villi: review of structural and functional aspects. *Microsc Res Tech* 1997;38:29–41.
- Demir R, Kayisli UA, Cayli S, Huppertz B. Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. *Placenta* 2006;27:535–9.
- Demir R, Seval Y, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem* 2007; doi:10.1016/j.acthis.2007.02.008
- Demir-Weusten AY, Seval Y, Kaufmann P, Demir R, Yucel G, Huppertz B. Matrix metalloproteinases-2, -3 and -9 in human term placenta. *Acta Histochem* 2007; doi:10.1016/j.acthis.2007.04.01
- Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993;122:103–11.
- Feller AC, Schneider H, Schmidt D, Parwaresch MR. Myofibroblast as a major cellular constituent of villous stroma in human placenta. *Placenta* 1985;6:405–15.
- Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 1998;279:514–9.
- Fujii S, Nakashima N, Okamura H, Takenaka A, Kanzaki H, Okuda Y, et al. Progesterone-induced smooth muscle-like cells in the subperitoneal nodules produced by estrogen. Experimental approach to leiomyomatosis peritonealis disseminata. *Am J Obstet Gynecol* 1981;139:164–72.
- Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971;27:549–50.
- Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J Exp Med* 1972;135:719–34.
- Gabbiani G.R.-B.E. The fibroblast. In: Glynn, editor. *Handbook of inflammation, tissue repair and regeneration*, vol. 3. Amsterdam, Elsevier/North-Holland: Biomedical Press; 1981. p. 1–50.
- Ghahdially F. *Ultrastructural pathology of the cell and matrix*. London: Butterworth; 1982.
- Graf R, Matejevic D, Schuppan D, Neudeck H, Shakibaei M, Vetter K. Molecular anatomy of the perivascular sheath in human placental stem villi: the contractile apparatus and its association to the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* 1997;290:601–7.
- Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 2001a;12:2730–41.
- Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 2001b;159:1009–20.
- Iwasaki H, Isayama T, Ichiki T, Kikuchi M. Intermediate filaments of myofibroblasts. *Immunocytochemical and immunocytochemical analyses. Pathol Res Pract* 1987;182:248–54.
- Kapanci Y, Assimacopoulos A, Irle C, Zwahlen A, Gabbiani G. “Contractile interstitial cells” in pulmonary alveolar septa: a possible regulator of ventilation-perfusion ratio? Ultrastructural, immunofluorescence, and in vitro studies. *J Cell Biol* 1974;60:375–92.
- Kaufmann P. Development and differentiation of the human placental villous tree. *Bibl Anat* 1982;29–39.
- Kaufmann P, Burton G. Anatomy and genesis of the placenta. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press Ltd; 1994. p. 441–84.
- Kaufmann P, Stark J, Stegner HE. The villous stroma of the human placenta. I. The ultrastructure of fixed connective tissue cells. *Cell Tissue Res* 1977;177:105–21.
- Kaufmann P, Sen DK, Schweikhardt G. Classification of human placental villi. I. Histology. *Cell Tissue Res* 1979;200:409–23.
- Kaye GI, Pascal RR, Lane N. The colonic pericryptal fibroblast sheath: replication, migration, and cytodifferentiation of a mesenchymal cell system in adult tissue. 3. Replication and differentiation in human hyperplastic and adenomatous polyps. *Gastroenterology* 1971;60:515–36.
- Kocher O, Gabbiani F, Gabbiani G, Reidy MA, Cokay MS, Peters H, et al. Phenotypic features of smooth muscle cells during the evolution of experimental carotid artery intimal thickening. *Biochemical and morphologic studies. Lab Invest* 1991;65:459–70.
- Kocher O, Skalli O, Bloom WS, Gabbiani G. Cytoskeleton of rat aortic smooth muscle cells. Normal conditions and experimental intimal thickening. *Lab Invest* 1984;50:645–52.
- Kohnen G, Castellucci M, Hsi BL, Yeh CJ, Kaufmann P. The monoclonal antibody GB 42 – a useful marker for the differentiation of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 1995; 281:231–42.
- Kohnen G, Kertschanska S, Demir R, Kaufmann P. Placental villous stroma as a model system for myofibroblast differentiation. *Histochem Cell Biol* 1996;105:415–29.
- Komuro T. Re-evaluation of fibroblasts and fibroblast-like cells. *Anat Embryol (Berl)* 1990;182:103–12.
- Konishi I, Fujii S, Okamura H, Mori T. Development of smooth muscle in the human fetal uterus: an ultrastructural study. *J Anat* 1984;139(Part 2):239–52.
- Kosanke G, Castellucci M, Kaufmann P, Mironov VA. Branching patterns of human placental villous trees: perspectives of topological analysis. *Placenta* 1993; 14:591–604.
- Lakhe-Reddy S, Khan S, Konieczkowski M, Jarad G, Wu KL, Reichardt LF, et al. Beta8 integrin binds Rho GDP

- dissociation inhibitor-1 and activates Rac1 to inhibit mesangial cell myofibroblast differentiation. *J Biol Chem* 2006;281:19688–99.
- Leavitt J, Gunning P, Kedes L, Jariwalla R. Smooth muscle alpha-actin is a transformation-sensitive marker for mouse NIH 3T3 and Rat-2 cells. *Nature* 1985;316:840–2.
- Lipper S, Kahn LB, Reddick RL. The myofibroblast. *Pathol Annu* 1980;15:409–41.
- Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* 1971;173:548–50.
- Mattey DL, Dawes PT, Nixon NB, Slater H. Transforming growth factor beta 1 and interleukin 4 induced alpha smooth muscle actin expression and myofibroblast-like differentiation in human synovial fibroblasts in vitro: modulation by basic fibroblast growth factor. *Ann Rheum Dis* 1997;56:426–31.
- Muro AF, Chauhan AK, Gajovic S, Iaconcig A, Porro F, Stanta G, et al. Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *J Cell Biol* 2003;162:149–60.
- Narine K, Wever OD, Valckenborgh DV, Francois K, Bracke M, Desmet S, Mareel M, Nooten GV. Growth factor modulation of fibroblast proliferation, differentiation, and invasion: implications for tissue valve engineering. *Tissue Eng* 2006;12:2707–16.
- O’Rahilly R. Developmental stages in human embryos, Part A. Publ. 631. Washington: Carnegie Institute; 1973.
- Owens GK, Thompson MM. Developmental changes in isoactin expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo. Relationship between growth and cytodifferentiation. *J Biol Chem* 1986;261:13373–80.
- Saeed AE, Parmentier JH, Malik KU. Activation of alpha1A-adrenergic receptor promotes differentiation of rat-1 fibroblasts to a smooth muscle-like phenotype. *BMC Cell Biol* 2004;5:47.
- Sappino AP, Schurch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 1990;63:144–61.
- Scully RE. Smooth-muscle differentiation in genital tract disorders. *Arch Pathol Lab Med* 1981;105:505–7.
- Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 1999;250:273–83.
- Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillesen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986;103:2787–96.
- Skalli O, Vandekerckhove J, Gabbiani G. Actin-isoform pattern as a marker of normal or pathological smooth-muscle and fibroblastic tissues. *Differentiation* 1987;33:232–8.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:349–63.
- Wu XJ, Huang L, Song DL, Jin J, Zhao G. Effects of endothelial cell growth states on the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Sheng Li Xue Bao* 2003;55:554–9.



The Distribution of Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 and Their Receptors Tie-1 and Tie-2 in the Very Early Human Placenta

Y. Seval^a, L. Sati^a, C. Celik-Ozenci^a, O. Taskin^b, R. Demir^{a,*}

^a Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey

^b Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 20 June 2008

Keywords:

Human placenta
Vasculogenesis
Angiogenesis
Angiopoietin-1
Angiopoietin-2
Tie-1
Tie-2

ABSTRACT

Angiopoietins are integral to vasculogenesis and angiogenesis, which play crucial roles in the growth and development of the placenta. The current study assessed expression of angiopoietins (Ang-1 and Ang-2) and their receptors (Tie-1 and Tie-2) during development of the early human placenta. First-trimester placental tissues were obtained from women undergoing curettage during normal pregnancies. The use of immunohistochemistry (IHC) showed that Ang-1 was primarily localized to syncytiotrophoblasts where it displayed moderate immunoreactivity, whereas weak immunoreactivity for Ang-1 was observed in endothelial cells and angiogenic cell cords (ACC). Strong immunoreactivity for Ang-2 was also found predominantly in syncytiotrophoblasts with lower immunostaining levels evident in cytotrophoblasts. Moderate immunoreactivity for Ang-2 was observed in endothelial cells, ACC and Hofbauer cells. By contrast, the trophoblastic shell, as well as endothelial cells and ACC exhibited strong staining intensity for Tie-1 with the strongest immunoreactivity for Tie-2 observed in cytotrophoblasts, ACC and endothelial cells. Western blotting of tissue extracts confirmed the IHC results. Previous studies focused on VEGF and its receptors in controlling vasculogenesis and angiogenesis in human placenta. However, the specific localization patterns of angiopoietins and their receptors revealed by the current study emphasize the importance of these molecules in placental vascular development. Functional studies aimed at identifying the molecular mechanisms of actions of these factors and receptors may prove essential in elucidating the pathophysiology of placental disorders such as intrauterine growth restriction and pre-eclampsia.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The development of a functional placental vascular network requires establishment of new blood vessels by two cooperative and tightly regulated processes, i.e. vasculogenesis and angiogenesis. Vasculogenesis describes the *de novo* development of the primitive vascular network from endothelial progenitor cells – angioblasts. During angiogenesis the primitive vascular network formed by vasculogenesis is used as a template to develop new vessels from already existing vessels [1]. Vasculogenesis occurs primarily during fetal development and placentation, whereas angiogenesis occurs in adult tissues during wound healing, formation of the corpus luteum and endometrial growth [2].

Vasculogenesis and angiogenesis are regulated by the equilibrium among locally acting stimulatory and inhibitory factors [3–5]. A broad spectrum of angiogenic factors identified in the placenta

includes basic fibroblast growth factor (bFGF) [6], hepatocyte growth factor (HGF) [7], placental growth factor (PlGF) [8,9], tumor necrosis factor- α (TNF- α) [10] and members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family [8,9]. While the majority of studies evaluating the regulation of vasculogenesis and angiogenesis have focused on the VEGF family, a growing body of evidence indicates the importance on the angiopoietin family which is comprised of angiopoietin-1, and -2 (Ang-1 and Ang-2) in regulating these processes. Both the VEGF and the angiopoietin growth factor families act through their tyrosine kinase receptors [11].

VEGF binds to Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1 or VEGFR-1) and kinase inserts domain-containing receptor (Flk-1/KDR or VEGFR-2) to stimulate endothelial cell proliferation, permeabilization, migration and assembly into capillary tubes [3,12–14]. Angiopoietins act through Tie-1 (tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains) and Tie-2 (Tunica internal endothelial cell kinase) [15]. Although the ligand for Tie-1 has not been determined, Yuan et al. [16] demonstrated that Ang-1 activates Tie-1 in a Tie-2-dependent manner. Both Ang-1 and Ang-2 are ligands for Tie-2 [17]. Binding of Ang-1 to Tie-2 promotes

* Corresponding author. Tel./fax: +90 242 2274486.

E-mail address: rdemir@akdeniz.edu.tr (R. Demir).

phosphorylation of Tie-2 to initiate down-stream effects, whereas Ang-2 can antagonize effects on Ang-1/Tie-2 receptor signaling [14,16]. Ang-1-mediated phosphorylation of Tie-2 promotes: (1) cell survival through phosphorylation of Akt threonine kinase and p42/44 MAPK [16]; (2) reorganization of endothelial cells; (3) recruitment and association of pericytes/vascular smooth muscle cells to mature and stabilize newly formed blood vessels [14]. In contrast, Ang-2 is an antagonist of Ang-1-mediated Tie-2 activation. It destabilizes the vasculature, loosens vessel walls and suppresses endothelial cell contact with peri-endothelial mural cells, rendering endothelial cells more accessible to VEGF actions and therefore, further promotes vasculogenesis and angiogenesis [14,18–21]. While VEGF mediates vasculogenesis and angiogenesis, the angiopoietins are primarily mediators of vascular remodeling and survival of endothelial cells during vasculogenesis and angiogenesis [2,22].

Several studies have evaluated the spatial and temporal expression of VEGF and its receptors in human [23–27] and non-human placentas [28–31]. Previously, we described the distribution of VEGF and its receptors during villous maturation in the early human placenta [25]. We found that, VEGF was initially localized to cytotrophoblasts, but that as pregnancy progressed, VEGF expression shifted towards Hofbauer cells (placental macrophages) in the villous core. The strongest immunostaining was observed for the VEGF receptors, Flt-1 and KDR, present in the angiogenic cell cords (ACC) and the villous stromal cells, respectively [25].

Compared with VEGF and its receptors, far fewer studies have described the expression of angiopoietins and their receptors in human placenta. Moreover, published results have provided contradictory information regarding localization of these factors. Since none of the available studies have investigated the expression of angiopoietins in the very early human placenta, the current study sought to rectify this gap in our knowledge by determining the expression profiles of angiopoietins and their receptors during the very early stages of placental development.

2. Materials and methods

2.1. Tissue collection

A total of 26 human placental tissues [6 samples of 22–28 days (4th week post conception (p.c.)); 8 samples of 29–35 days (5th week p.c.); 7 samples of 36–42 days (6th week p.c.); and 5 samples of 43–49 days (7th week p.c.)] in the first-trimester of pregnancy were obtained after legal termination of pregnancy by curettage for medical or psychosocial reasons, which were unlikely to affect placental structure and function. None of the normal pregnancies received hormone treatment. Tissues were supplied from the Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, and Clinic of Obstetrics and Gynecology, Government Hospital, Antalya. Informed consent forms and protocols to use the tissues were approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medicine in Akdeniz University.

Immediately after vacuumed aspiration of the conceptus (no application of prostaglandins), placental samples (1) were fixed with 10% formalin and embedded in paraffin for further immunohistochemical analysis ($n = 16$) and (2) were snap frozen in liquid nitrogen for Western blot analysis ($n = 10$).

2.2. Immunohistochemistry

A total of 16 placental samples belonging to different weeks of pregnancy were used for immunohistochemical analysis. Serial sections at 5 μ m thickness were collected on poly-L-lysine coated slides (Sigma, St. Louis, MO, USA) and incubated overnight at 56 °C. Tissue sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in a graded series of ethanol. Sections were then treated in a microwave oven in 10 mM citrate buffer, pH 6.0, for 5 min twice and left to cool for 20 min. After three washes in phosphate buffered saline (PBS), endogenous peroxidase activity was quenched by 3% hydrogen peroxide in PBS for 20 min and again washed three times in PBS. Afterwards, sections were incubated in a blocking serum (Ultra V Block, TP-060-HL; NeoMarker, Fremont, CA, USA) for 10 min in order to block non-specific binding. Subsequently, sections were incubated over night at 4 °C with mouse monoclonal anti-human angiopoietin-1 (MAB923; Clone 171718; 5 μ g/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), mouse monoclonal anti-human angiopoietin-2 (MAB0983; Clone 180102; 2 μ g/ml; R&D Systems), rabbit polyclonal anti-human Tie-1 (sc-342; C-18; 0.6 μ g/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), rabbit polyclonal anti-human Tie-2

(sc-324; C-20; 0.5 μ g/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc.) and mouse monoclonal anti-human CD34 (sc-19621; B 1-3C5; 2 μ g/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc.) in a humidified chamber. Sections were washed three times in PBS and incubated with the biotinylated anti-mouse (BA-9200; 4.3 μ g/ml; Vector Laboratories, Burlingame, CA) and biotinylated anti-rabbit (BA-1000; 4.3 μ g/ml; Vector Laboratories) secondary antibodies for 45 min at room temperature in a humidified chamber. After three washes with PBS, the antigen–antibody complexes were detected by using a streptavidin–peroxidase complex (TP-060-HL; LabVision, Fremont, CA, USA), for 15 min followed by three rinses in PBS. The resulting signal was developed with diaminobenzidine (DAB) (K3466; Dako) and sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (S3309; Dako) and mounted with Permount (Fisher Chemicals, Springfield, NJ, USA) on glass slides. For controls, sections were treated with either appropriate mouse IgG or normal rabbit IgG depending on the primary antibody used and diluted to the same final protein concentration as the primary antibody.

Photomicrographs were taken with an Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). All samples for each individual antibody were exposed to the same protocol at the same time and were stained using the same incubation periods.

2.3. HSCORE analysis

The intensity for Ang-1 and Ang-2 immunoreactivity was semi-quantitatively evaluated using the following intensity categories: 0 (no staining), 1+ (weak but detectable staining), 2+ (moderate or distinct staining), and 3+ (intense staining). For each tissue, an HSCORE value was derived by calculating the sum of the percentages of cells that stained at each intensity category and multiplying that value by the weighted intensity of the staining, using the formula $HSCORE = \sum P_i(i+1)$, where i represents the intensity scores and P_i is the corresponding percentage of the cells. In each slide, five randomly selected areas were evaluated under a light microscope (40 $\times$ magnification), and the percentage of the cells for each intensity within these areas was determined at different times by two investigators blinded to the type and source of the tissues. The intra- and inter-individual coefficients of variations were 8% and 11%, respectively, for the HSCORE evaluation. The average score of the two independent observers was used.

2.4. Western blot analysis

Total protein from first-trimester human placentas ($n = 10$) was extracted with cell extraction buffer (BioSource International; Camarillo, CA) containing 3 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and protease inhibitor cocktail (Sigma–Aldrich). The protein concentration was determined by a detergent compatible protein assay (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA). Samples (50 μ g) were loaded on 7.5% Tris–HCl gels, electrophoretically separated and electroblotted onto nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories). The membrane was blocked with 5% non-fat dry milk in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1 h to reduce non-specific binding. Subsequently, the membrane was incubated for 2 h with primary antibodies against angiopoietin-1 (MAB923; Clone 171718; 5 μ g/ml in TBS-T; R&D Systems), angiopoietin-2 (MAB0983; Clone 180102; 5 μ g/ml in TBS-T; R&D Systems) and β -actin (sc-47778, C4; 0.05 μ g/ml in TBS-T Santa Cruz Biotechnology Inc.). The membrane was washed with TBS-T for 1 h and incubated with horseradish peroxidase conjugated anti-mouse secondary antibody (PI-2000; 0.1 μ g/ml; Vector Laboratories) diluted in 5% non-fat dry milk in TBS-T. The protein was visualized by light emission on film (Amersham Biosciences; Buckinghamshire, England) with enhanced chemiluminescence substrate (Amersham Biosciences). Immunoblot bands for Ang-1, Ang-2 and β -actin were quantified using an optical densitometer. The optical density (OD) values of Ang-1 and Ang-2 bands were divided to the OD values of β -actin to normalize the bands.

2.5. Statistical analysis

Since the data from the HSCORE were not normally distributed (as determined by Kolmogorov–Smirnov test), pairwise multiple comparisons were analyzed with non-parametric ANOVA on ranks (Kruskal–Wallis test) followed by *post hoc* Student–Newman–Keuls test. In contrast, the data from Western blots were normally distributed and therefore, were analyzed with Student's *t*-test or one-way ANOVA, followed by *post hoc* Holm–Sidak test when appropriate. Statistical calculations were performed using SigmaStat for Windows, version 3.0 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA). Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Distribution of Ang-1 in the early human placenta

Ang-1 revealed a cytoplasmic staining in all the specimens examined. Ang-1 was mainly localized to the syncytiotrophoblast with a strong immunoreactivity in all types of placental villi (Fig. 1a). Weak immunoreactivity was observed in the endothelial cells and stromal cells for Ang-1 in the immature intermediate villi (IMIV) (Figs. 1b and 3a), whereas almost no

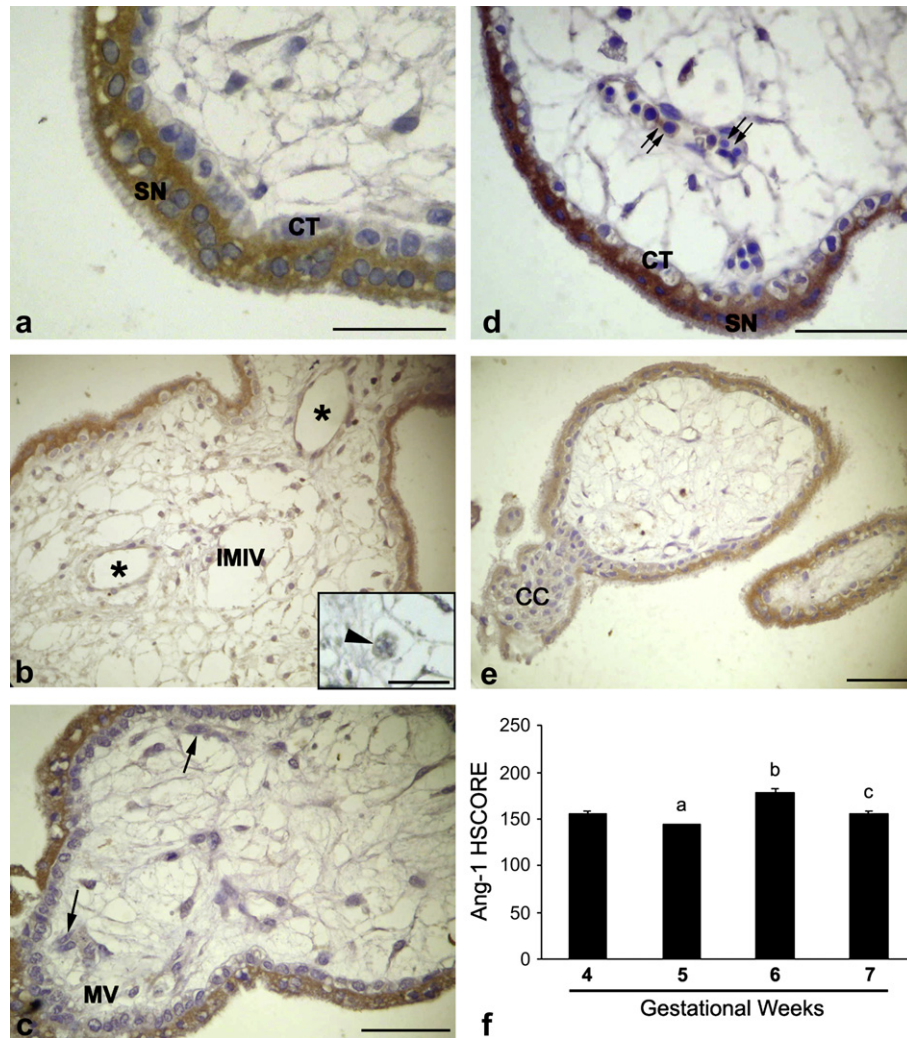


Fig. 1. The distribution of Ang-1 in the early human placental villi. (a) Ang-1 was primarily expressed in the syncytiotrophoblast (SN). No immunoreactivity was observed in the cytotrophoblasts (CT). (b) Ang-1 revealed a weak immunoreactivity in the vessel (asterisk) endothelium within an immature intermediate villous (IMIV). (inset b) Moreover, Hofbauer cells (arrow heads) were also negative. (c) The angiogenic cell cords (arrows) within a mesenchymal villous (MV) were almost negative for Ang-1. (d) Some of the hematopoietic cells (double arrows) were found to be immuno-positive. (e) The cytotrophoblastic cell columns (CC) revealed a weak staining. Scale bars represent 50 μ m (a, b, c, d and e) and 25 μ m (inset b). (f) The HSCORE of Ang-1 immunostaining intensities in the early human placental villi. The data are represented as mean $\pm$ SEM. a: $p < 0.05$, 4th week vs. 5th week; b: $p < 0.05$, 6th week vs. 4th and 5th weeks; c: $p < 0.05$, 7th week vs. 6th week.

immunoreactivity was observed in the angiogenic cell cords (ACC) of mesenchymal villi (MV) (Fig. 1c). Hofbauer cells were negative for Ang-1 (Fig. 1b, inset). Some, but not all fetal hematopoietic cells were moderately stained with Ang-1 (Fig. 1d). Moreover, the cytotrophoblastic cell columns (CC) revealed a weak staining with Ang-1 (Fig. 1e).

According to the HSCORE analysis, Ang-1 showed a significant decrease from the 4th week to the 5th week ($p < 0.05$), and a significant increase towards the 6th week ($p < 0.001$). The HSCORE values decreased significantly afterwards ($p < 0.001$) (Fig. 1f).

3.2. Distribution of Ang-2 in the early human placenta

Ang-2 also revealed a cytoplasmic staining in all the specimens examined. Ang-2 was mainly localized to the syncytiotrophoblast with a strong immunoreactivity and to a lesser extent to the cytotrophoblast cells where moderate to weak immunoreactivity was observed in all types of placental villi (Fig. 2a). Moderate immunoreactivity was observed in the endothelial cells, stromal cells and ACC for Ang-2 in both the MV and IMIV (Figs. 2b, c and

3c). Moreover, the Hofbauer cells also exhibited a moderate staining intensity for Ang-2 (Fig. 2b, inset). Similar to Ang-1, some, but not all fetal hematopoietic cells were moderately stained with Ang-2 (Fig. 2d). The CC exhibited a moderate staining with Ang-2 (Fig. 2e).

Ang-2 HSCORE values showed a slight decrease which was only significant at the 7th week when compared to the 4th week ($p < 0.05$) as pregnancy progressed (Fig. 2f).

No staining was observed in the sections where isotype mouse IgG was used instead of the angiopoietin antibodies (Fig. 3e).

3.3. Distribution of Tie-1 in the early human placenta

Tie-1 immunoreactivity exhibited a cytoplasmic staining pattern. Tie-1 protein revealed a strong staining intensity in the trophoblastic shell and as well as the endothelial cells and ACC. Among the cells of the villous stroma, Hofbauer cells revealed a moderate immunoreactivity while mesenchymal cells displayed weak staining (Fig. 3b). The immunostaining intensities for Tie-1 did not show any significant changes throughout the gestational weeks examined.

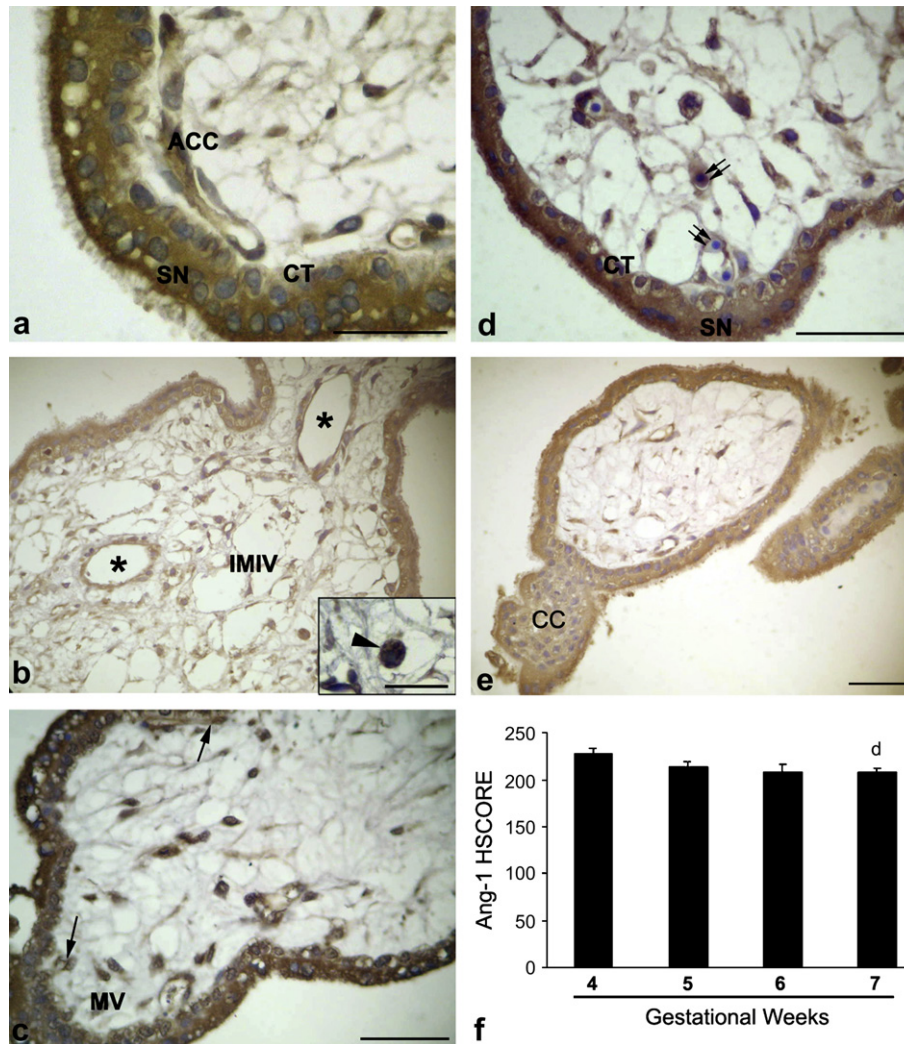


Fig. 2. The distribution of Ang-2 in the early human placental villi. (a) Ang-2 was exhibited a stronger immunoreactivity in the syncytiotrophoblast (SN), when compared to cytotrophoblasts (CT). (b) Moderate staining in vessel (asterisk) endothelial cells was observed in immature intermediate villi (IMIV). (inset b) As seen, Hofbauer cells (arrow heads) were also moderately stained. (c) The staining intensity in angiogenic cell cords (arrows) in the mesenchymal villi (MV) was moderate. (d) Some but not all the hematopoietic cells (double arrows) were moderately stained with Ang-2. (e) Trophoblastic cell columns (CC) were also immuno-positive for Ang-2. Scale bars represent 50 μ m (a, b, c, d and e) and 25 μ m (inset b). (f) The HSCORE of Ang-2 immunostaining intensities in the early human placental villi. The data are represented as mean $\pm$ SEM. d: $p < 0.05$, 7th week vs. 4th week.

3.4. Distribution of Tie-2 in the early human placenta

Tie-2 immunoreactivity exhibited a cytoplasmic staining pattern. Tie-2 exhibited the strongest immunoreactivity in the cytotrophoblasts, angiogenic cells and endothelial cells. The stromal cells and Hofbauer cells revealed a moderate staining intensity for Tie-2 (Fig. 3d). No significant changes in Tie-2 immunostaining intensities were observed as pregnancy advanced.

No staining was observed in the sections where normal rabbit IgG was used instead of the Tie antibodies (Fig. 3f).

3.5. The expression of angiopoietins throughout the very early stages of human placentation

Western blot analysis revealed bands at approximately 55 kDa and 66 kDa for Ang-1 and Ang-2, respectively. Ang-1 showed a significant increase towards the 26th and 27th days of pregnancy ($p < 0.05$), where from this day on, its expression decreased. Ang-2 also revealed a significant increase in expression towards the 26th and 27th days although expression was lower afterwards ($p < 0.05$) (Fig. 4).

4. Discussion

Development of the placental vascular network begins early, with an initial phase of vasculogenesis, followed by branching and then non-branching angiogenesis [32]. Both Ang-1 and Ang-2 interact with the Tie-2 receptor [18]. Ang-1 induces maturation and stabilization of the developing vasculature [33], whereas Ang-2 causes destabilization required for additional sprout formation and branching angiogenesis [18,34].

The present study, profiles the localization and expression of angiopoietins-1 and -2 during the very early phases of vasculogenesis and angiogenesis. Although several studies have addressed the localization of VEGF and its Flt-1 and Flk-1 receptors, as well as the angiopoietin receptors, Tie-1 and Tie-2, far fewer studies have assessed the expression of the angiopoietins, especially in the first-trimester placenta. Moreover, none of these studies investigated the expression of angiopoietins in placental samples belonging to very early stages of pregnancy.

Previously, Dunk et al. [35] localized the Ang-1 mRNA hybridization signal to both cytotrophoblasts and syncytiotrophoblast of primary chorionic villi. In contrast, they found that the Ang-2 mRNA hybridization signal was confined to the innermost cytotrophoblast

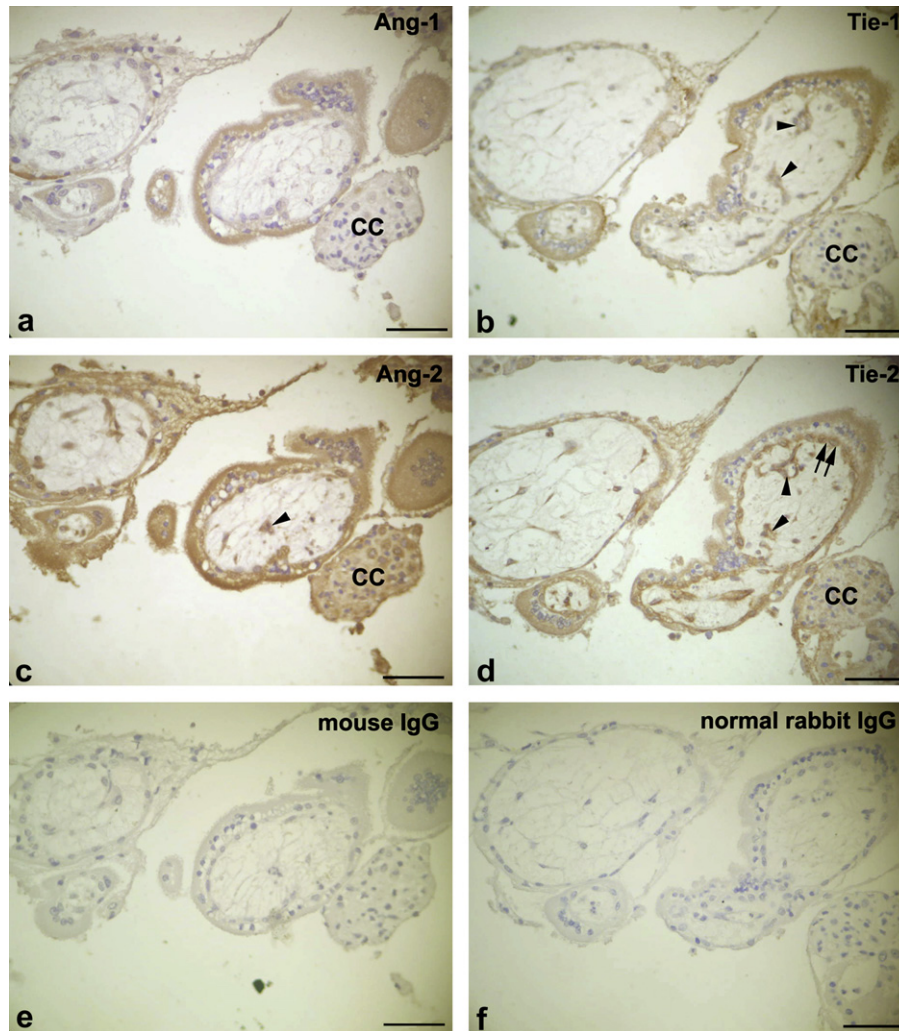


Fig. 3. The distribution of Ang-1, Ang-2 in parallel to Tie-1 and Tie-2 in the early human placental villi. (a) Ang-1, (b) Tie-1, (c) Ang-2, (d) Tie-2, (e) mouse isotype control for Ang-1 and Ang-2 antibodies and (f) rabbit isotype control for Tie-1 and Tie-2 antibodies. Tie-1 was mainly expressed in the syncytiotrophoblast and to a lesser extent in the cytotrophoblasts while Tie-2 was also expressed in both of the layers, it was more abundant in the cytotrophoblastic layer (arrows). While both Tie-1 and Tie-2 were expressed in vessels (arrow heads), when compared, Tie-2 immunoreactivity was stronger. Whereas Tie-1 was negative in trophoblastic cell columns (CC), Tie-2 was positive. No staining was seen in the negative controls (e and f). Scale bars represent 50 μ m.

layer in first-trimester placental tissues. In early baboon pregnancies, Babischkin et al. [36] observed abundant expression of Ang-1 and Ang-2 in syncytiotrophoblast and cytotrophoblasts of the chorionic villi and in the vascular endothelial and nonvascular cells of the villous core. The current study extended immunohistochemical evaluations to include the trophoblastic sheath – and found that Ang-1 protein is localized only in the syncytiotrophoblast. Like the findings of Babischkin et al. [36], we found that Ang-2 was localized primarily in the syncytiotrophoblast and to a lesser extent in the cytotrophoblastic layers of the placental villi. Our observations on the first-trimester human placenta are also concordant with those of Geva et al. [37] who reported that, Ang-1 and Ang-2 mRNA are localized principally in the villous syncytiotrophoblast. Variations in the localization of angiopoietins among different studies might reflect differences in the gestational ages of the placental tissues examined. However, only the current study evaluated placental tissues in the very early stages of placentation (as early as the 4th week) where vasculogenesis and angiogenesis are initiated.

The current study observed weak immunoreactivity in endothelial cells of vessels within immature intermediate villi with no immunoreactivity observed in angiogenic cell cords of mesenchymal villi. This expression of Ang-1 in endothelial cells of villi

undergoing maturation is consistent with the role of Ang-1 as a vascular maturation and stabilizing agent.

Hofbauer cells, the macrophages of the placenta were also immuno-positive for Ang-2, Tie-1 and Tie-2. We have previously shown the relationship between vasculogenesis and angiogenesis with Hofbauer cells and stated that these cells may act in a paracrine manner and influence these processes by expressing angiogenic factors [38]. Our results are in accordance with this previous study. Since Hofbauer cells locate in close vicinity to angiogenic cell cords and vessels, and express Ang-2, Tie-1 and Tie-2, one may suggest that these cells can play active roles in regulating the placental vascular formation.

The current study also identified Ang-1 and Ang-2 in various hematopoietic cells present in blood vessels. Based on *in vitro* studies on hematopoietic and endothelial cells, Huang et al. [39] suggested that Tie-2/angiopoietins may act as critical regulators of proliferation of hematopoietic progenitors and endothelial cells in a synergistic manner [39]. Further studies are needed to elucidate the roles of angiopoietins and their receptors on the development of hematopoietic cells in the placenta.

Using Western blotting of placental extracts obtained from the 22nd day through the 5th weeks of pregnancy determined that both Ang-1 and Ang-2 levels increased significantly between the

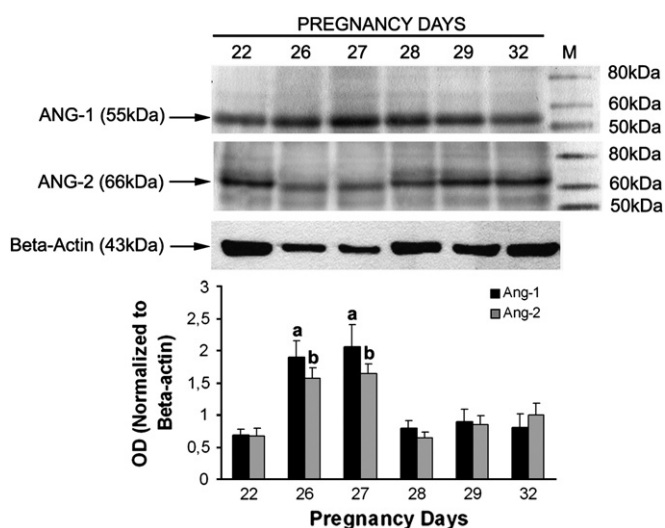


Fig. 4. Western blot analysis of Ang-1 and Ang-2 proteins in the early days of human placental development. The bands for Ang-1 (55 kDa) and Ang-2 (66 kDa) were detected by Western blot. The sample loading amounts were determined by β -actin (43 kDa). The immunoblot bands were quantified by an optical densitometer. The OD (optical density) values of Ang-1 and Ang-2 bands were normalized to the OD values of β -actin bands. The data in the graph are presented as mean $\pm$ SEM. a: $p < 0.05$, pregnancy days 26 and 27 vs. 22, 28, 29 and 32 for Ang-1; b: $p < 0.05$, pregnancy days 26 and 27 vs. 22, 28, 29 and 32 for Ang-2.

26th and 27th days and then declined thereafter. These biochemical measurements were in accordance with immunohistochemical HSCOREs of which indicated that Ang-1 and Ang-2 levels were elevated during the 4th week of pregnancy (HSCORE, $p < 0.05$).

Previously, Ang-1 and Ang-2 were shown to promote growth and migration of trophoblast cells *in vitro* [35]. The current study shows a co-localization of Ang-1, Ang-2, and Tie-2 in trophoblasts during the first-trimester of human pregnancy, which suggests that angiopoietins may play an autocrine role in trophoblast function. Consistent with that hypothesis, Ang-2 enhances trophoblast DNA synthesis and NO release, whereas Ang-1 acts as a potent chemotactic factor for trophoblasts [35].

In conclusion, we investigated the expression profiles of angiopoietins and their receptors during the period of vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. Depending on the expression and localization of these factors and their receptors, our results suggest that these factors and their receptors may play crucial autocrine and paracrine roles in vascular development, remodeling and trophoblast function that are important for proper placental development. Furthermore, functional studies will hopefully increase our understanding of the molecular mechanisms underlying vasculogenesis and angiogenesis in the human placenta, and thereby help to elucidate the pathophysiology of placental vascular disorders such as intrauterine growth restriction and pre-eclampsia.

Acknowledgement

The authors would like to thank Sibel Ozer for her excellent technical support and Dr. Aziz Akkaya for the provision of the tissues. We also would like to thank Dr. Frederick Schatz and MS. Lynn Buchwalder for their helpful advices and critical reading of the manuscript. This study was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) – Project# SBAG-3267 (105-S460) and the Research Fund of Akdeniz University – Antalya/Turkey (project # 2007.03.0122.004).

References

- [1] Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 2004;25:114–26.
- [2] Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110(Suppl 1):S10–8.
- [3] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4–25.
- [4] Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997;277:48–50.
- [5] Iruela-Arispe ML, Dvorak HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemostasis* 1997;78:672–7.
- [6] Shams M, Ahmed A. Localization of mRNA for basic fibroblast growth factor in human placenta. *Growth Factors* 1994;11:105–11.
- [7] Kilby MD, Afford S, Li XF, Strain AJ, Ahmed A, Whittle MJ. Localisation of hepatocyte growth factor and its receptor (c-met) protein and mRNA in human term placenta. *Growth Factors* 1996;13:133–9.
- [8] Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 1997;18:657–65.
- [9] Vuorela P, Hatva E, Lymboussaki A, Kaipainen A, Joukov V, Persico MG, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biol Reprod* 1997;56:489–94.
- [10] Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442–7.
- [11] Dantzer V, Leach L, Leiser R. Angiogenesis and placental vasculature – a workshop report. *Placenta* 2000;21(Suppl A):S69–70.
- [12] Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996;271:603–6.
- [13] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25:581–611.
- [14] Albrecht ED, Babishkin JS, Pepe GJ. Regulation of placental villous angiopoietin-1 and -2 expression by estrogen during baboon pregnancy. *Mol Reprod Dev* 2008;75:504–11.
- [15] Partanen J, Dumont D. Functions of Tie1 and Tie2 receptor tyrosine kinases in vascular development. Berlin: Springer-Verlag; 1999.
- [16] Yuan HT, Venkatesha S, Chan B, Deutsch U, Mammoto T, Sukhatme VP, et al. Activation of the orphan endothelial receptor Tie1 modifies Tie2-mediated intracellular signaling and cell survival. *FASEB J* 2007;21:3171–83.
- [17] Currie MJ, Gunningham SP, Han C, Scott PA, Robinson BA, Harris AL, et al. Angiopoietin-1 is inversely related to thymidine phosphorylase expression in human breast cancer, indicating a role in vascular remodeling. *Clin Cancer Res* 2001;7:918–27.
- [18] Maisonnier PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55–60.
- [19] Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11205–10.
- [20] Visconti RP, Richardson CD, Sato TN. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8219–24.
- [21] Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res* 2006;312:630–41.
- [22] Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ, Fraser HM. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod* 2002;66:802–12.
- [23] Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Boock CA, Brown KD, Smith SK. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J Reprod Fertil* 1993;99:609–15.
- [24] Clark DE, Smith SK, Sharkey AM, Charnock-Jones DS. Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum Reprod* 1996;11:1090–8.
- [25] Demir R, Kayisli UA, Seval Y, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY, et al. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 2004;25:560–72.
- [26] Demir R, Kayisli UA, Cayli S, Huppertz B. Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. *Placenta* 2006;27:535–9.
- [27] Demir R, Seval Y, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem* 2007;109:257–65.
- [28] Barleon B, Hauser S, Schollmann C, Weindel K, Marme D, Yayon A, et al. Differential expression of the two VEGF receptors flt and KDR in placenta and vascular endothelial cells. *J Cell Biochem* 1994;54:56–66.
- [29] Achen MG, Gad JM, Stacker SA, Wilks AF. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor are co-expressed during early embryonic development. *Growth Factors* 1997;15:69–80.
- [30] Cheung CY. Vascular endothelial growth factor: possible role in fetal development and placental function. *J Soc Gynecol Invest* 1997;4:169–77.
- [31] Robb VA, Pepe GJ, Albrecht ED. Placental villous vascular endothelial growth factor expression and vascularization after estrogen suppression during the last two-thirds of baboon pregnancy. *Endocrine* 2007;31:260–7.

- [32] Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta. New York: Springer; 2000.
- [33] Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, et al. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 1998;83:233–40.
- [34] Hagen AS, Orbus RJ, Wilkening RB, Regnault TR, Anthony RV. Placental expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and tie-2 during placental development in an ovine model of placental insufficiency-fetal growth restriction. *Pediatr Res* 2005;58:1228–32.
- [35] Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol* 2000;156: 2185–99.
- [36] Babischkin JS, Suresch DL, Pepe GJ, Albrecht ED. Differential expression of placental villous angiopoietin-1 and -2 during early, mid and late baboon pregnancy. *Placenta* 2007;28:212–8.
- [37] Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87: 4213–24.
- [38] Seval Y, Korgun ET, Demir R. Hofbauer cells in early human placenta: possible implications in vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 2007;28:841–5.
- [39] Huang XL, Takakura N, Suda T. In vitro effects of angiopoietins and VEGF on hematopoietic and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264:133–8.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Placenta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/placenta



The Presence of Kinesin Superfamily Motor Proteins KIFC1 and KIF17 in Normal and Pathological Human Placenta

L. Sati, Y. Seval-Celik, G. Unek, E.T. Korgun, R. Demir*

Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 16 July 2009

Keywords:

Human placenta
KIFC1
KIF17
Preeclampsia
Diabetes
Placental transport

ABSTRACT

Kinesin superfamily proteins (KIFs) are motor proteins that participate in chromosomal and spindle movements during mitosis and meiosis, and transport membranous organelles and macromolecules fundamental for cellular functions. Although the roles of KIFs in axonal and dendritic transports have been studied extensively, their role in intracellular transport in general is less well known. The diversity of kinesins suggests that each kinesin may have a specific function. Therefore, in this study we aimed to investigate the presence and cellular localization of KIFC1 and KIF17 in normal and pathological human placentas. First-trimester (22–56 days) and normal, preeclamptic (PE), and diabetic-term placental tissues were obtained and further studied by immunohistochemistry (IHC) and Western blot methods.

KIFC1 was mainly localized to the syncytiotrophoblast both in early and term placental samples. However, a stronger immunoreactivity was observed both in PE and diabetic placentas compared to normal-term placentas. KIF17 was most intensively localized in developing vascular endothelium in early pregnancy. Even though KIF17 was moderately stained in the endothelium of villi from normal human-term placentas, stronger immunoreactivity was observed in all types of villi of both PE and diabetic placentas. Western blotting of tissue extracts confirmed the IHC results.

Here, we demonstrate the presence of KIFC1 and KIF17 in human placenta for the first time. The intense expression of KIFC1 in syncytiotrophoblast and KIF17 in vascular endothelium suggests that both the proteins might be important in a cargo-transport system. An increased expression pattern of both KIFC1 and KIF17 in PE and diabetes might suggest that these proteins may be involved in complex trophoblast functions and placental pathologies. Further studies will clarify the physiological role of KIFs in human placental transport and development.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The placenta is unique among all other organs in that it conducts the functional activities of most fetal organs (except the locomotor apparatus and the central nervous system) throughout its development. Fetal gas transfer, excretion, catabolism, resorption, and numerous metabolic, secretory, and immunological functions are partially or completely performed by the placenta during pregnancy as a substitute for still immature embryonic and fetal organs [1]. Abnormalities in any one of these functions can be associated with poor pregnancy outcome, ranging from the mild (intrauterine growth restriction, IUGR) to the severe (implantation failure and embryonic, fetal, or perinatal death).

Maternofetal and fetomaternal diffusional transfer depends on the thickness of the separating layers, whereas facilitated transport,

active transport, and vesicular transfer are influenced by the number and kind of layers of the barrier. Increasing knowledge of placental physiology lets us know that synthetic, secretory, and transport functions of the placenta are important aspects of this organ [2]. Also, it has been found that transporters play an important role in this nutrient and waste exchange in the placenta [3, 4]. The trafficking of proteins is tightly regulated, and various different types of proteins are known to be involved.

Kinesin superfamily proteins (KIFs) and cytoplasmic dyneins serve as motors that move along microtubules carrying cargoes such as organelles including mitochondria, lysosomes, synaptic vesicles, protein complexes, and mRNAs [5–8]. Axonal and dendritic transports serve as ideal systems for studying motors involved in intracellular transport. However, studies have also shown that transport mechanisms found in neurons are operational in other cell types as well.

The 45 KIFs have been classified into three major types on the basis of the position of the motor domain: NH2-terminal motor domain type, middle motor domain type, and COOH-terminal

* Corresponding author. Tel.: +90 242 2496881; fax: +90 242 2274486.
E-mail address: rdemir@akdeniz.edu.tr (R. Demir).

motor domain type (called N-kinesin, M-kinesin, and C-kinesin, respectively) [7, 9]. Motor domain includes a p-loop motif, switch 1 and 2 motifs, and microtubule-binding regions [6] and utilizes ATP to fuel their movement along microtubules. Microtubules serve as rails for these transportation proteins and have a polarity in a manner in which there is a fast-growing plus end and a relatively stationary minus end. Outside the motor domain, kinesins also contain different stalk and tail domains that mediate oligomerization, regulation of motor activity, and interactions with their specific cargos [10]. The organization is tightly regulated in cells. Although the motor domain is highly conserved among different KIFs, regions other than the motor domain are quite divergent and these regions serve as cargo-binding domains. The sequence diversity of the cargo-binding domains explains why KIFs transport a wide variety of cargos, including membranous organelles and macromolecular complexes.

It is becoming increasingly clear that the cell uses a number of KIFs and tightly controls the direction, destination, and velocity of transport of various important functional molecules. How motors regulate the binding and release of their cargo is critical; however, only a few studies have attempted to address this important question [11–14].

It is known that the placenta is an organ that develops in a short period of time, and that its functions change with the progress of gestation. It has been shown that the expression levels of amino acid transporters, glucose transporters, placental efflux transporters such as P-glycoprotein (P-gp), and other transporters that contribute to the transfer of nutrients and waste between mother and the fetus change during pregnancy [15–17]. The properties of these transporters are still largely obscure. Therefore, the aim of this study was to determine by immunohistochemistry and Western blot analysis, first, the presence and cellular localization of two different kinesins, KIFC1, a C-kinesin, and KIF17, an N-kinesin, in the very early human placenta at various days of gestation and second, their expression in normal and pathological (diabetes and preeclampsia) human-term placentas.

2. Materials and methods

2.1. Tissue collection

A total of 26 samples of human early placental tissue [six samples at 22–28 days (fourth week p.c.); eight samples at 29–35 days (fifth week p.c.); seven samples at 36–42 days (sixth week p.c.); and five samples at 43–49 days (seventh week p.c.)] in the first trimester of pregnancy were obtained after legal termination of pregnancy by curettage for medical or psychosocial reasons, which were unlikely to affect placental structure and function. Besides, placentas from uncomplicated pregnancies ($n = 5$) and those affected by either pregestational insulin-dependent diabetes mellitus or by preeclampsia were obtained after vaginal delivery or cesarean section at term ($n = 4$ each). Preeclampsia was defined as occurrence of hypertension (sustained blood pressure greater than 140 mmHg systolic and 90 mmHg diastolic), edema, and proteinuria ($\geq 1^+$ protein on dip stick) after 20 wk gestation in a previously normotensive woman. Preeclampsia was associated with intrauterine growth restriction based on both birth weight and placental size in the samples studied. None of the normal pregnancies were receiving hormone treatment. Tissues were obtained from the Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, and Clinic of Obstetrics and Gynecology, Government Hospital, Antalya. Informed consent forms and protocols to use the tissue were approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medicine in Akdeniz University.

Placentas were transported to the laboratory immediately and (1) were embedded in paraffin for further immunohistochemical analysis and (2) were snap-frozen in liquid nitrogen for Western blot analysis. For light microscopic analysis, tissue samples were fixed with 10% neutral formaldehyde for 12 h and were dehydrated in ethanol, cleared in xylene, and embedded in paraffin.

2.2. Immunohistochemistry

Serial sections at 5 μ m thickness were collected on poly-L-lysine-coated slides (Sigma, St. Louis, MO), dewaxed, rehydrated, and placed in citrate buffer. To unmask antigens, an antigen-retrieval procedure was performed by treating the samples in a microwave oven at 750 W for 5 min twice. After cooling for 20 min at room

temperature, the sections were washed in PBS and then kept in 3% H_2O_2 for 15 min to remove endogenous peroxidase activity, followed by three washes with PBS. After blocking with Ultra V blocking reagent (Lab Vision, Fremont, CA) for 10 min at room temperature to reduce non-specific binding, the sections were incubated with a 1:150 dilution of mouse monoclonal KIFC1 (H0003833-M01; Abnova), a 1:300 dilution of rabbit polyclonal KIF17 (ab11261-50; Abcam) antibodies, and a mouse monoclonal anti-human CD31 (MS-1873-R7; Clone 1A10; prediluted, NeoMarkers, Fremont, CA, USA) antibody for the detection of angiogenic cell cords and endothelial cells for 2 h at room temperature in a humidified chamber. The sections were washed three times in PBS and incubated with the biotinylated anti-mouse (BA-9200; 1: 400 Dilution; Vector Laboratories, Burlingame, CA) and biotinylated anti-rabbit (BA-1000; 1: 400 Dilution; Vector Laboratories) secondary antibodies for 45 min at room temperature. After three washes with PBS, the antigen–antibody complexes were detected by using a streptavidin–peroxidase complex (TP-060-HL; LabVision, Fremont, CA, USA) for 15 min followed by three rinses in PBS. The resulting signal was developed with diaminobenzidine (DAB) tablets (D-4293; Sigma), and the sections were counterstained with Mayer's Hematoxylin (S3309, Dako) and mounted with Permount (Fisher Chemicals, Springfield, NJ, USA) on glass slides. For controls, the sections were treated with either appropriate mouse IgG or normal rabbit serum depending on the primary antibody used and diluted to the same final protein concentration as the primary antibody.

Photomicrographs were taken with an Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). All the samples for each individual antibody were exposed to the same protocol at the same time and were stained using the same incubation periods.

2.3. Semi-quantitative analysis of staining intensities

The intensities of KIFC1 and KIF17 immunoreactivity were evaluated semi-quantitatively as follows. Positively stained cells were grouped according to the following categories: 0 (no staining), + (weak but detectable), ++ (moderate or distinct), and +++ (intense). In addition, for each slide, an HSCORE value was calculated by summing the percentages of cells grouped in one intensity category and multiplying this number with the weighted intensity of the staining, using the formula $HSCORE = \sum Pi(i + 1)$, where i represents the intensity scores and Pi is the corresponding percentage of the cells. For each placental sample, five parallel tissue sections were randomly selected and five randomly selected areas were evaluated for each tissue section under a microscope using 400 $\times$ original magnification. The percentage of cells for each intensity within these areas was determined by two investigators in “blind” (coded) studies, and the average score was used. The HSCORE values were graphed.

2.4. SDS-PAGE and Western blotting

Total protein from early, normal, and pathological human-term placentas was extracted with cell extraction buffer [BioSource International; Camarillo, CA] containing 3 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). The protein concentration was determined by a detergent-compatible protein assay (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA). Samples (50 μ g) were loaded on 5% (for KIF17) and 10% (for KIFC1) Tris–HCl gels, electrophoretically separated and electroblotted onto PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories). The membrane was blocked with 5% non-fat dry milk in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1 h to reduce non-specific binding. Subsequently, the membrane was incubated overnight at +4°C with primary antibodies against KIFC1 (Abnova; 1:250 dilution) and KIF17 (Abcam; 1:250 dilution) in TBS-T. The membrane was washed with TBS-T for 1 h and incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies (Vector Laboratories) diluted at 1:6000 in 2.5% non-fat dry milk in TBS-T for 1.5 h at room temperature. The protein was visualized by light emission on film (Amersham Biosciences; Buckinghamshire, England), and the signal was detected using SuperSignal Chemiluminescent Kit (Pierce Biotechnology) and quantified. As the internal control to confirm equal loading of the samples, a β -actin antibody (sc-47778, C4; Santa Cruz Biotechnology Inc., 1:5000 in 5% non-fat dry milk) was used for 2 h at room temperature to probe each immunoblot simultaneous to the probe for KIFC1 and KIF17 antibody probes. The relative densities of bands were assessed using an Alpha Digi Doc 1000 gel documentation unit (Alpha Innotech Corporation, CA, USA). The intensity of β -actin bands was quantified and their values were used to establish a ratio of KIFC1/ β -actin and KIF17/ β -actin.

2.5. Statistical analysis

For the data obtained from HSCORE analysis, all the pairwise multiple comparison procedures (Holm–Sidak method) were performed for KIFC1. However, since the data from the HSCORE were not normally distributed for KIF17, all the pairwise multiple comparisons were analyzed with ANOVA on ranks (Dunn's method). Statistical calculations were performed using SigmaStat for Windows, version 3.0 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA). Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

3. Results

To characterize and clarify the presence of KIF isoforms and the cell types that express KIFC1 and KIF17 proteins, initial immunohistochemical studies were performed with human placental tissues.

3.1. Characterization and subcellular localization of KIFC1 in the early human placenta

The cytotrophoblast cells revealed a very weak-staining pattern with KIFC1 (Fig. 1a–e) in both the mesenchymal villous (MV) and immature intermediate villi (IMIV). KIFC1 was mainly localized to syncytiotrophoblast with a strong immunoreactivity in all types of placental villi (Fig. 1a–e). It labelled numerous punctate structures in the cytoplasm of syncytiotrophoblast cells (Fig. 1c). However, it was interesting that some of the placental villi showed a strong nuclear staining in cytotrophoblast cells and trophoblastic cell columns with relatively less immunoreaction in syncytiotrophoblast cells (Fig. 1b). Moreover, syncytiotrophoblast microvilli were barely immunopositive with KIFC1 (Fig. 1d). Weak immunoreactivity was observed in the endothelial cells, stromal cells, Hofbauer cells, which are placental macrophages, and angiogenic cell cords (ACCs) (Fig. 1, inset c) (Fig. 1a–e). Even though most of the fetal hematopoietic cells were immunonegative for KIFC1, there were few immunopositive hematopoietic cells in the vessels (Fig. 1d).

According to the HSCORE analysis, KIFC1 showed a significant increase from the 4th week to the 5th week ($p < 0.05$), and a significant difference towards the 7th week compared to the 4th and 5th weeks ($p < 0.05$). The HSCORE values were statistically

significant between the 4th and the 8th weeks as pregnancy progressed ($p < 0.05$) (Fig. 1f).

No immunostaining was observed in the sections where mouse IgG was used instead of the KIFC1 antibody (Fig. 1e, inset).

3.2. Characterization and subcellular localization of KIF17 in the early human placenta

Immunohistochemical analysis showed that the trophoblastic layers of chorionic villous tree, Hofbauer cells, angiogenic cell cords, and trophoblastic cell columns were moderately immunopositive with KIF17 in both MV and IMIV when compared to the reaction observed in the vascular endothelium (Fig. 2a–c). KIF17 was intensively localized in the developing vascular endothelium (Fig. 2a–c). There was also a moderate to strong immunoreactivity with KIF17 in the apical microvilli of syncytiotrophoblast forming a brush border (Fig. 2b). KIF17 revealed a cytoplasmic staining in all the specimens examined. However, there was a membranous reaction, particularly in the apical membrane of cytotrophoblast cells (Fig. 2b). In addition, a weak to moderate immunoreactivity was observed with KIF17 in stromal cells (Fig. 2a–c). Moreover, some of the fetal hematopoietic cells were strongly immunopositive for KIF17 even though there were still some negatively stained hematopoietic cells (Fig. 2c).

KIF17 HSCORE values showed a significant decrease from the 4th week through the 6th week ($p < 0.05$), and were significantly decreased at the 8th week when compared to the 4th week ($p < 0.05$). In addition, statistical analysis showed that the HSCORE values obtained from the 5th and the 7th weeks of early pregnancy were significantly higher than that of the 8th week ($p < 0.05$) (Fig. 2d).

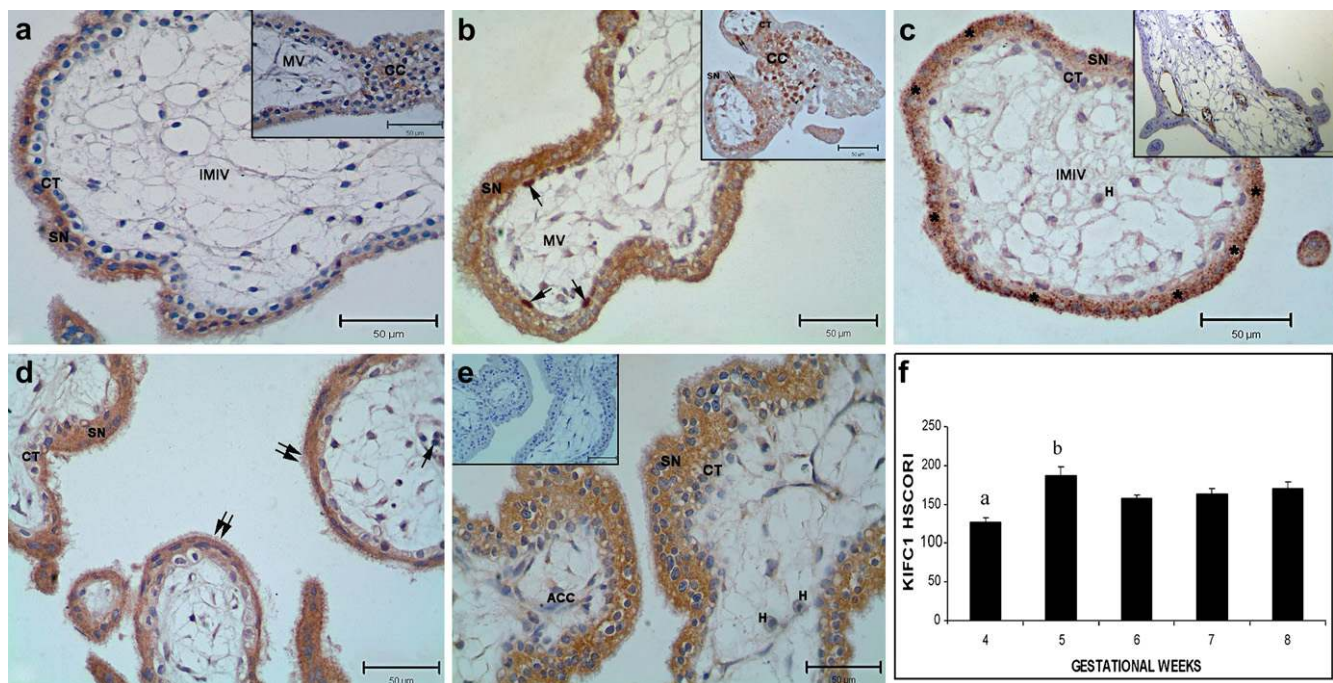


Fig. 1. The distribution of KIFC1 in the early human placental villi with the progression of pregnancy. Tissue sections are taken from the 4th, 5th, 6th, 7th, and the 8th weeks of first-trimester human placenta: (a) KIFC1 is mainly expressed in the syncytiotrophoblast (SN). Weak or no immunoreactivity is observed in the cytotrophoblasts (CTs). Inset: a weak cytoplasmic immunostaining is present in trophoblastic cell columns (CCs). (b) A nuclear KIFC1 expression is observed in some of the cytotrophoblast cells (arrows) and CCs (arrow heads) (inset). (c) The dot-like expression pattern of KIFC1 (asterisk) within the trophoblastic layers of villous tree. Moreover, Hofbauer cells (H) are weakly stained with KIFC1. Angiogenic cell cords and endothelial cells of vessels are immunopositive for CD31 (inset). (d) Some of the hematopoietic cells (arrows) are found to be immunopositive. Please observe a weak-staining pattern in syncytiotrophoblast microvilli (double arrows). (e) Angiogenic cell cords (ACCs) also reveal a weak-staining pattern. No staining is seen in the negative controls (inset). MV: mesenchymal villous; IMIV: immature intermediate villi. Scale bars represent 50 μ m (a–e and insets). (f) The HSCORE of KIFC1 immunostaining intensities in the early human placental villi. The data are represented as means $\pm$ SEM. (a) $p < 0.05$, 5th, 6th, 7th, and 8th week vs. 4th week; (b) $p < 0.05$, 5th week vs. 6th and 7th weeks.

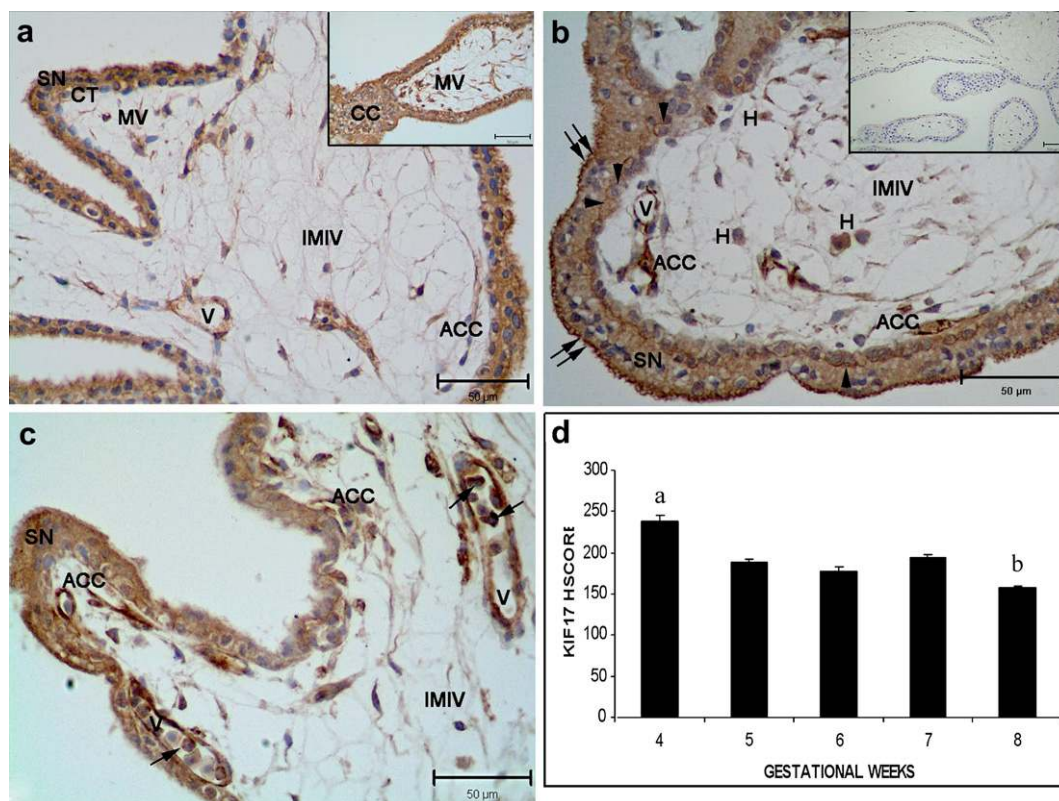


Fig. 2. The distribution of KIF17 in the early human placental villi: (a) KIF17 is expressed in both, the syncytiotrophoblast (SN), cytotrophoblasts (CTs), and angiogenic cell cords (ACCs) and trophoblastic cell columns (CCs) (inset). KIF17 exhibits stronger immunoreactivity in vessel (V; arrows) endothelial cells in overall sections when compared to other cell types in the villi. (b) A membranous reaction, particularly apical membrane, in cytotrophoblast cells is observed for KIF17 (arrow heads). Hofbauer cells (H) are also moderately stained. Please observe a strong staining pattern in syncytiotrophoblast microvilli (double arrows). (c) Some but not all the hematopoietic cells (arrows) are strongly stained with KIF17. Please observe the strongest immunoreaction in the endothelial cells of the vessels (V) as well. No staining is seen in the negative controls (b; inset). MV: mesenchymal villous; IMIV: immature intermediate villi. Scale bars represent 50 μ m (a–c and insets). (d) The HSCORE of KIF17 immunostaining intensities in the early human placental villi. The data are represented as means $\pm$ SEM. (a) $p < 0.05$, 4th week vs. the 5th, 6th, and the 8th week; (b) $p < 0.05$, 5th and 7th weeks vs. the 8th week.

There were no immunoreactions in negative control slides which were treated with normal rabbit serum substituting the KIF17 antibody at the same final protein concentration (Fig. 2b, inset).

3.3. Changes in the protein expression levels of KIFC1 and KIF17 proteins in early human placenta with the progress of gestation

We also performed Western blot analysis on tissue extracts from early human placentas. The blots revealed clear bands for KIFC1 (Fig. 3a) and KIF17 (Fig. 3b) corresponding to 37 and 170 kDa, respectively. The intensity of β -actin on the bands was quantified and their values were used to establish a ratio of the KIFC1/ β -actin and KIF17/ β -actin (Fig. 3a and b). As a positive control, normal rat testicular tissue for KIFC1 and brain tissue for KIF17 without any pathological problems were used in order to confirm the bands observed for placental lysates. Altogether, the Western blot results confirm the presence of the KIFC1 and KIF17 in the early placenta with changes in the protein expression levels over the course of the first trimester and support the data obtained from immunohistochemistry.

3.4. Characterization and subcellular localization of KIFC1 in the normal and pathological human-term placentas

Syncytiotrophoblast cells displayed a strong KIFC1 immunoreactivity in all term-placental samples (Fig. 4). Similar to that observed in early placental villi, KIFC1 labelled numerous punctate

structures in the cytoplasm of syncytiotrophoblast cells. KIFC1 revealed a moderate staining in syncytiotrophoblast cells of villi from normal-term placentas (Fig. 4a), whereas a strong immunoreactivity was observed both in preeclamptic (Fig. 4b) and diabetic (Fig. 4c) placentas. No alterations were observed among different types of placental villi. Moreover, a weak KIFC1 immunoreactivity was observed in the endothelium of vessels of stem villi in preeclamptic (Fig. 4b) and diabetic (Fig. 4c) placentas. Stromal cells, Hofbauer cells, and myofibroblasts within the villous core were negative for KIFC1 in all term placentas investigated.

No immunostaining was observed in the sections where mouse IgG was used instead of the KIFC1 antibody (Fig. 4, insets).

3.5. Characterization and subcellular localization of KIF17 in the normal and pathological human-term placentas

KIF17 was predominantly expressed in the endothelium of vessels in all the term placental samples investigated (Fig. 5). KIF17 was moderately stained in the endothelium of villi from normal human-term placentas (Fig. 5a), while strong immunoreactivity was observed in all types of villi of both preeclamptic (Fig. 5b) and diabetic (Fig. 5c) placentas. Endothelium of small vessels that are located in mesenchymal, mature intermediate, and terminal villi revealed a stronger immunostaining when compared to endothelium of larger vessels located in stem villi. Syncytiotrophoblast cells, stromal cells, Hofbauer cells, and myofibroblasts within the villous core were negative for KIF17 in all the placentas investigated.

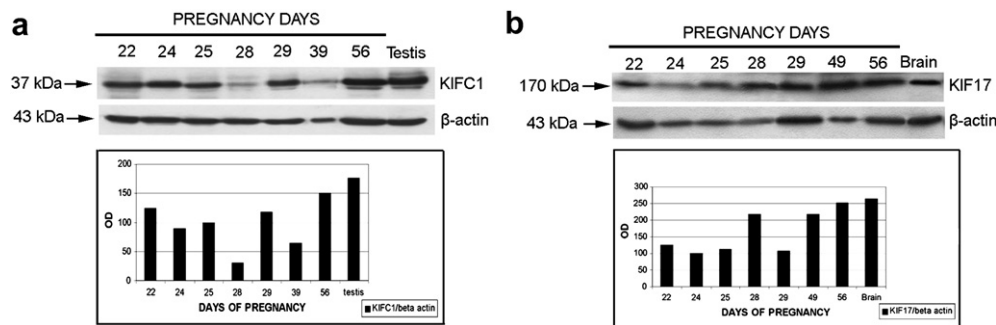


Fig. 3. Western blot analysis of KIFC1 (a) and KIF17 (b) proteins in the early days of human pregnancy. The bands for KIFC1 (37 kDa) and KIF17 (170 kDa) are detected by Western blot. The immunoexpression of β -actin (43 kDa) is used to confirm equivalent amounts of total proteins loaded per lane. The OD (optical density) values of KIFC1 and KIF17 bands are normalized to the OD values of β -actin bands.

No immunostaining was observed in the sections where normal rabbit serum was used instead of the KIF17 antibody (Fig. 5, insets) as a negative control.

3.6. KIFC1 and KIF17 protein expression in normal and pathological human-term placentas

Western blot analysis was performed on tissue extracts from human-term placentas. The Western blot results confirmed the presence of the KIFC1 and KIF17 in term placentas. In accordance with the immunohistochemistry data, both KIFC1 (Fig. 6a) and KIF17 (Fig. 6b) protein expressions were relatively higher in preeclamptic and diabetic placentas, when compared to normal-term placentas according to Alpha Digi Doc 1000 gel documentation unit.

4. Discussion

Here, we report the presence of KIFC1 and KIF17 with different expression patterns in the first trimester, normal, and pathological human-term placenta for the first time with immunohistochemistry and Western blot methods. However, the exact nature of the interaction between the two proteins was not determined in the context of this study.

KIFC1 is a member of a highly related group of C-terminal motor proteins that are very similar to one another, diverging only in their tail domains [18]. Of the tissues examined, KIFC1 was found at its highest level in the testis but was also abundant in ovary, spleen, and liver [18–22]. It has been shown to be associated with membranous organelles [23, 24], Golgi vesicles, and the acrosome in developing spermatids [21]. Since the formation of the acrosome is a major biosynthetic activity of the spermatid, the abundance of

KIFC1 in the testis is consistent with a role for this motor in formation of this organelle. In our study, we have observed that KIFC1 was mainly localized to syncytiotrophoblast cells in all types of placental villi during early, normal, and pathological human-term placentas. The syncytiotrophoblast is the primary barrier for transplacental transfer of nutrients and there is relatively unrestricted transfer of molecules such as glucose and amino acids across the human placental capillary wall [25]. The presence of KIFC1 in these cells might suggest a role for this protein in cellular transport to perform all these important functions. Whether this motor is also involved in trophoblast migration or invasion in human placenta needs to be investigated with further functional experiments.

According to our study, in the early human placental samples the expression of KIFC1 had a strong nuclear-staining pattern in cytotrophoblast cells and trophoblastic cell columns in some of the villi. Staining in syncytiotrophoblast cells, however, was cytoplasmic. It is likely that syncytiotrophoblast cells arise from cytotrophoblast, and during this differentiation KIFC1 becomes more cytoplasmic. As a precedent, it has been previously shown that KIFC1 motor was found in the nucleus of very immature round spermatids just prior to its appearance on the acrosome [21]. However, KIFC1 is not detectable in the nuclei of spermatogonia, spermatocytes, or later-stage spermatids. The authors suggested that perhaps the KIFC1 motor is sequestered in the nucleus in an inactive state until the proper stage of spermatid development [21]. Upon activation, it was proposed that KIFC1 exits the nucleus through nuclear pores. On the other hand, Zhang et al. have shown that disruption of vesicle trafficking by either Brefeldin A or Nocodazole resulted in accumulation of KIFC1 in the nucleus and at the nuclear membrane [24]. Therefore, it would be interesting to investigate whether or not there is a disruption of vesicle trafficking

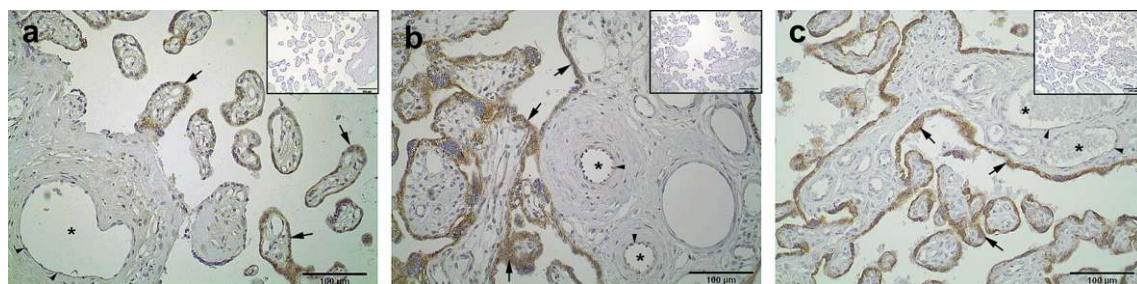


Fig. 4. The distribution of KIFC1 in normal (a), preeclamptic (b), and diabetic (c) placental villi. KIFC1 is mainly expressed in the syncytiotrophoblast cells (arrows) in all the samples investigated. While a very weak KIFC1 immunoreactivity is observed in the endothelium (arrow heads) of larger vessels (asterisk) in stem villi of normal-term placentas, a slight increase is observed in the endothelium (arrow heads) of preeclamptic and diabetic placentas. No staining is seen in the negative controls (insets a–c). Scale bars represent 100 μ m (a–c) and 200 μ m (insets).

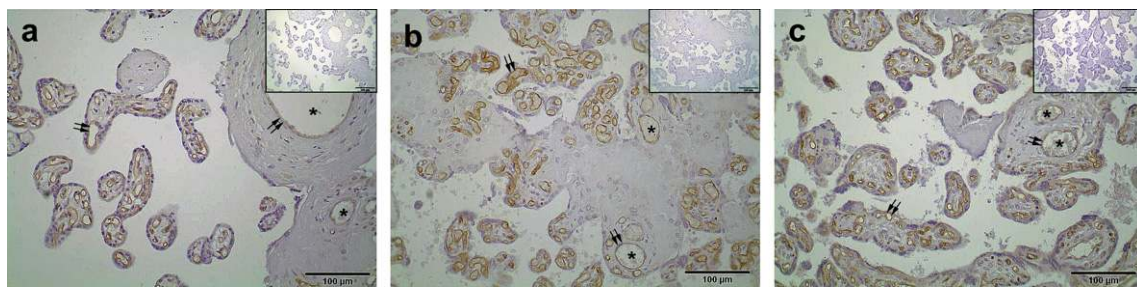


Fig. 5. The distribution of KIF17 in the normal (a), preeclamptic (b), and diabetic (c) placental villi. KIF17 is predominantly expressed in the endothelium (double arrows) of vessels in all types of villi from term placental samples investigated. The endothelium of small vessels shows stronger KIF17 immunostaining when compared to that of larger vessels (asterisks) in stem villi. No staining is observed in the negative controls (insets a–c). Scale bars represent 100 μ m (a–c) and 200 μ m (insets).

or if those cells with nuclear-staining pattern are in an inactive state in the placental villi.

KIF17, a motor protein, belongs to N-kinesin family [26] and is composed of a head domain with ATPase activity used for microtubule binding, whereas the carboxy (C)-terminal tail contains the cargo-binding domains. According to our study, KIF17 was mainly localized to developing vascular endothelium in the early, normal, and pathological term placental villi where intensive placental vasculogenesis and angiogenesis take place.

In addition, Hofbauer cells, the macrophages of the placenta, were also been found to be KIF17-immunopositive in the early human placental samples. Seval et al. have previously shown the relationship between vasculogenesis and angiogenesis with Hofbauer cells [27, 28], and stated that these cells may act in a paracrine manner and influence these processes by expressing angiogenic factors such as Ang-2, Tie-1, and Tie-2. Therefore, we may speculate that Hofbauer cells might play active roles in regulating the placental vascular formation through a motor protein, such as KIF17, since these cells are in close proximity to angiogenic cell cords and vessels. The moderate immunoreactivity in ACCs further supports this idea. In contrast, both normal and pathological term placental samples showed no KIF17 immunoreactivity in Hofbauer cells.

Moreover, we have observed KIFC1 and particularly KIF17 expression in some of the hematopoietic cells in the vessels in the first-trimester placenta even though there was no immunoreaction in the hematopoietic cells of the vessels in the term placenta when the pregnancy progressed. Further studies are needed to elucidate the roles of KIFs in the development of hematopoietic cells and also the maturation and stabilization of vessels in the placenta, and their possible relationship to angiopoietins and their receptors in the early periods of human pregnancy.

Using a yeast two-hybrid screen of a testis cDNA library, Kimmins et al. showed that there was a strong interaction between ACT

(activator of CREM in testis) and a kinesin protein highly similar to a KIF17 isoform found in the brain, which was named KIF17b [29]. The authors also suggested that KIF17b operates in a unique manner that differs from somatic kinesins that are motor-transport molecules normally associated with microtubules and involved in the movement of organelles, vesicles, and proteins [30–33]. Lack of ACT could lead to abnormalities in sperm tail development because of the malfunctioning of KIF17b [34]. As there are several studies on CREM transcripts from decidua and placenta, additional experiments are needed to address this issue in human placenta as well [35–37]. Thus, our study would potentially provide the first evidence of KIF17 in human placenta.

It is known that GLUT1 is the primary transporter responsible for transplacental glucose transport, but it is also present in plasma membranes of placental barriers facing the maternal and fetal sides and on the cells of the placental vasculature [38, 39]. It has been shown that GLUT1 C-terminal-binding protein (GLUT1CBP) was able to bind to native GLUT1 extracted from cell membranes, self-associate, or interact with kinesin superfamily protein KIF-1B [40]. According to our study, KIFC1 revealed a stronger immunoreactivity in syncytiotrophoblast cells of villi both in preeclamptic and diabetic placentas compared to that of normal-term placentas. Whether the KIFC1 subfamily evolves distinct roles in glucose transport in human placenta or can execute a similar function as KIF-1B remains an open question. On the other hand, the pathophysiology of preeclampsia remains poorly understood and there are still many unanswered questions in the development of this disease.

Both preeclampsia and diabetes mellitus are associated with increased fetal morbidity and mortality and may display abnormal placental blood flow velocity waveforms, indicating increased vascular resistance. According to our study, KIF17 showed stronger immunoreactivity in the endothelium of all types of villi from both preeclamptic and diabetic placentas compared to normal placentas,

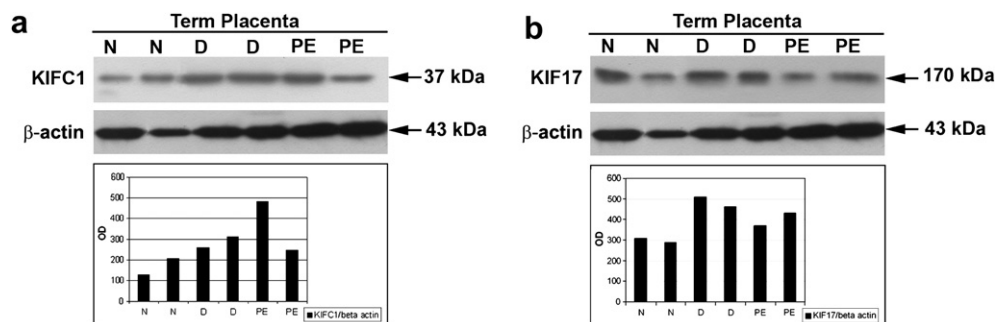


Fig. 6. Western blot analysis of KIFC1 (a) and KIF17 (b) proteins in human-term placentas. The bands for KIFC1 (37 kDa) and KIF17 (140 kDa) are detected by Western blot. The immunoexpression of β -actin (43 kDa) is used to confirm equivalent amounts of total proteins loaded per lane. An increase in both KIFC1 and KIF17 protein expression is observed in diabetic (D) and preeclamptic (PE) placentas when compared to normal (N)-term placentas.

suggesting a possible association with those pathologies. However, further investigations are necessary to determine whether KIF17 is a participant in the pathogenesis of these and other abnormalities observed in diabetic or preeclamptic placentas or changes seen in maternal tissues affected by these conditions.

We have also examined the total protein levels of KIFC1 and KIF17 in placental samples, as early as the 22nd day of pregnancy during first trimester. The slight difference between the total protein levels in Western blot and immunohistochemical scores might be due to the gestational age range of tissues examined.

In conclusion, many recent molecular cell biology and molecular genetics studies reveal that KIFs are fundamental not only for various cellular functions but also for developmental events, and that their functions may underlie some diseases. However, the presence, distribution, and potential function of KIFC1 and KIF17 in placental tissues have not been previously reported. It is hoped that this and the future investigations will elucidate the role of these proteins in human placenta.

Acknowledgements

We would like to thank Sibel Ozer for her excellent technical assistance. This study was partly supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) – Project# SBAG-3267 (105-S460) and The Scientific Research Projects Coordination Unit, Akdeniz University (Project No.: 2007.03.0122.004).

References

- Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta. New York, Berlin: Springer-Verlag; 2000.
- King BF. Comparative anatomy of the placental barrier. *Bibl Anat* 1982;22:13–28.
- Baumann MU, Deborde S, Illsley NP. Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine* 2002;19:13–22.
- Young AM, Allen CE, Audus KL. Efflux transporters of the human placenta. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:125–32.
- Vallee RB, Williams JC, Varma D, Barnhart LE. Dynein: an ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* 2004;58:189–200.
- Hirokawa N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 1998;279:519–26.
- Hirokawa N, Takemura R. Kinesin superfamily proteins. In: Schliwa M, editor. *Molecular motors*. Weinheim: Wiley-VCH; 2003. p. 79–109.
- Sharp DJ, Rogers GC, Scholey JM. Microtubule motors in mitosis. *Nature* 2000;407:41–7.
- Miki H, Setou M, Kaneshiro K, Hirokawa N. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7004–11.
- Vale RD. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 2003;112:467–80.
- Kayadjanian N, Lee HS, Pina-Crespo J, Heinemann SF. Localization of glutamate receptors to distal dendrites depends on subunit composition and the kinesin motor protein KIF17. *Mol Cell Neurosci* 2007;34:219–30.
- Kamal A, Goldstein LS. Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:63–8.
- Nakagawa T, Setou M, Seog D, Ogasawara K, Dohmae N, Takio K, et al. A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell* 2000;103:569–81.
- Setou M, Nakagawa T, Seog DH, Hirokawa N. Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 2000;288:1796–802.
- Novak D, Lehman M, Bernstein H, Beveridge M, Cramer S. SNAT expression in rat placenta. *Placenta* 2006;27:510–6.
- Yamaguchi M, Sakata M, Ogura K, Miyake A. Gestational changes of glucose transporter gene expression in the mouse placenta and decidua. *J Endocrinol Invest* 1996;19:567–9.
- Mathias AA, Hitti J, Unadkat JD. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression in human placenta of various gestational ages. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R963–9.
- Navolanic PM, Sperry AO. Identification of isoforms of a mitotic motor in mammalian spermatogenesis. *Biol Reprod* 2000;62:1360–9.
- Noda Y, Sato-Yoshitake R, Kondo S, Nangaku M, Hirokawa N. KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that transports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. *J Cell Biol* 1995;129:157–67.
- Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, Cleveland DW, Dawson SC, Endow SA, et al. A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* 2004;167:19–22.
- Yang WX, Sperry AO. C-terminal kinesin motor KIFC1 participates in acrosome biogenesis and vesicle transport. *Biol Reprod* 2003;69:1719–29.
- Nath S, Bananis E, Sarkar S, Stockert RJ, Sperry AO, Murray JW, et al. Kif5B and Kif1 interact and are required for motility and fission of early endocytic vesicles in mouse liver. *Mol Biol Cell* 2007;18:1839–49.
- Yang WX, Jefferson H, Sperry AO. The molecular motor KIFC1 associates with a complex containing nucleoporin NUP62 that is regulated during development and by the small GTPase RAN. *Biol Reprod* 2006;74:684–90.
- Zhang Y, Sperry AO. Comparative analysis of two C-terminal kinesin motor proteins: KIFC1 and KIFC5A. *Cell Motil Cytoskeleton* 2004;58:213–30.
- Leach L, Firth JA. Fine structure of the paracellular junctions of terminal villous capillaries in the perfused human placenta. *Cell Tissue Res* 1992;268:447–52.
- Miki H, Okada Y, Hirokawa N. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol* 2005;15:467–76.
- Seval Y, Korgun ET, Demir R. Hofbauer cells in early human placenta: possible implications in vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 2007;28:841–5.
- Demir R, Seval Y, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem* 2007;109:257–65.
- Macho B, Brancorsini S, Fimia GM, Setou M, Hirokawa N, Sassone-Corsi P. CREM-dependent transcription in male germ cells controlled by a kinesin. *Science* 2002;298:2388–90.
- Hogeveen KN, Sassone-Corsi P. Regulation of gene expression in post-meiotic male germ cells: CREM-signalling pathways and male fertility. *Hum Fertil* 2006;9:73–9.
- Kotaja N, Lin H, Parvinen M, Sassone-Corsi P. Interplay of PIWI/argonaute protein MIWI and kinesin KIF17b in chromatoid bodies of male germ cells. *J Cell Sci* 2006;119:2819–25.
- Kimmins S, Kotaja N, Fienga G, Kolthur US, Brancorsini S, Hogeveen K, et al. A specific programme of gene transcription in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2004;8:496–500.
- Saade M, Irla M, Govin J, Victorero G, Samson M, Nguyen C. Dynamic distribution of spatial during mouse spermatogenesis and its interaction with the kinesin KIF17b. *Exp Cell Res* 2007;313:614–26.
- Kotaja N, De Cesare D, Macho B, Monaco L, Brancorsini S, Goossens E, et al. Abnormal sperm in mice with targeted deletion of the act (activator of cAMP-responsive element modulator in testis) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10620–5.
- Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF. Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 1988;242:1430–3.
- Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P. CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 1991;64:739–49.
- Heckert LL, Schultz K, Nilson JH. The cAMP response elements of the alpha subunit gene bind similar proteins in trophoblasts and gonadotropes but have distinct functional sequence requirements. *J Biol Chem* 1996;271:31650–6.
- Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 1990;13:198–208.
- Hahn T, Desoye G. Ontogeny of glucose transport systems in the placenta and its progenitor tissues. *Early Pregnancy* 1996;2:168–82.
- Bunn RC, Jensen MA, Reed BC. Protein interactions with the glucose transporter binding protein GLUT1CBP that provides a link between GLUT1 and the cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 1999;10:819–32.