

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PLASENTA AKREATA SPEKTRUMLU GEBELİKLERDE
GERÇEKLEŞEN AŞIRI TROFOBlast İNVAZYONUNDA
 α V β 3 İNTEGRİN VE CD9 ETKİLEŞİMİNİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Selin KISAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2022-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PLASENTA AKREATA SPEKTRUMLU
GEBELİKLERDE GERÇEKLEŞEN AŞIRI
TROFOBlast İNVAZYONUNDA $\alpha V\beta 3$ İNTEGRİN VE
CD9 ETKİLEŞİMİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Selin KISAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından TYL-2021-5827 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2022-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında y¼ksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 16/06/2022

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Emin T¼rkay KORGUN
Akdeniz niversitesi

ye : Prof. Dr. İbrahim İnanç Mendilcioğlu
Akdeniz niversitesi

ye : Dr. Öğr. Üyesi Sema Avcı
Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Selin KISAR

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN

İmza

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitimin süresince bilgi birikimi ve desteklerini esirgemeyen, tezimin gerçekleşmesinde çok büyük emeği olan danışmanım Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN'a,

Deęerli katkılarından dolayı Dr. Hasan Berkan SAYAL, Prof. Dr. İbrahim İnanç MENDİLCİOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Sema AVCI ve Doç. Dr. Havva Serap TORU'ya,

Tüm bu süreçte deneyimleriyle bana birçok şey katan Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan tüm değerli hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma ve diğer çalışanlarına,

Bana yardıma ihtiyacım olan her an yardım eden ve eğitimimde çok büyük katkıları olan ekip arkadaşlarıma,

Akdeniz Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü'nün tüm kıymetli çalışanlarına,

Tüm bu süreçte arkamda olan çok sevgili arkadaşlarım Zeynep, Gözde ve Berat'a,

Ve eğitim hayatım boyunca benden maddi-manevi desteklerini esirgemeyen, hep inanan ve daima arkamda olan sevgili annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Plasenta Akreata Spektrumu (PAS), aşırı trofoblast hücre invazyonu ile karakterize olup anormal trofoblast hücre migrasyonunu içermektedir. Bu çalışmamızda ekstra villöz trofoblast hücrelerinin invazyonunda $\alpha V\beta 3$ integrin ve CD9 moleküllerinin hücre-hücre etkileşimlerine bağlı rollerini belirlemeyi amaçladık.

Yöntem: Plasenta Akreata Spektrumlu (PAS) gebelikler, Sezaryen doğum gebelikleri ve Kontrol grubu olmak üzere 3 çalışma grubu oluşturuldu. PAS grubu için hastalardan doğumu takiben histerektomi materyalleri veya term plasenta, Sezaryen ve Kontrol gruplarından ise term plasentalar alındı. Doku örneklerinde morfolojik analiz sonrasında Ekstravillöz Trofoblastların (EVT) karakterizasyonu için epitel belirteci olan Sitokeratin 7 (CYT7) ve desidua hücreleri için mezodermal hücre belirteci olan Vimentin kullanılarak $\alpha V\beta 3$ integrin ve CD9 antikorlarıyla çiftli immünfloresan boyamalar gerçekleştirildi. Böylece proteinlerin hücrelerdeki ekspresyon şiddetleri ve lokalizasyonları belirlendi. Ayrıca aynı gruplara ait doku örnekleri ile $\alpha V\beta 3$ integrin ve CD9 için Western Blot analizi gerçekleştirilerek gruplar arasındaki protein ekspresyon farklılıkları kantitatif olarak tespit edildi.

Bulgular: Sezaryen doğum grubunda $\alpha V\beta 3$ integrin protein miktarı PAS grubuyla mukayese edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. Western Blot deneyleri sonucunda CD9 proteinin gruplar arasında anlamlı bir fark içermediği belirlendi. Yapılan çiftli immünfloresan boyanmalarda CD9 proteininin EVT'lerde ve villöz trofoblastlarda yüksek oranda eksprese edildiği tespit edildi. $\alpha V\beta 3$ integrin ise Kontrol ve PAS gruplarının EVT'lerinde yüksek düzeylerde ekspre edilirken villöz trofoblastlarda da immün pozitif reaksiyon gösterdi.

Sonuç: Sezaryen doğum sonucu endometriyumda oluşan skar yapısı, sonraki gebeliklerde EVT hücrelerinde artan $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonunu aracılığıyla PAS gelişiminde rol oynayabilir.

Anahtar Kelimeler: Plasenta Akreata Spektrumu (PAS), Ekstravillöz Trofoblast, Trofoblast İnvazyonu, $\alpha V\beta 3$ -İntegrin, CD9, Plasental İmplantasyon Defektleri

ABSTRACT

Objective: We investigated the hypothesis that $\alpha V\beta 3$ integrin and CD9 tetraspanin molecules, which we think may cause abnormal cell migration in the Placenta Accreta Spectrum (PAS), characterized by excessive trophoblast cell invasion into the uterus, can regulate trophoblast cell migration through cell-cell interactions.

Method: Three study groups were formed; Pregnancies with Placenta Accreta Spectrum, pregnancies resulting in cesarean delivery and Control group (pregnancies resulting in normal delivery). For each group, hysterectomy materials or term placentas were obtained from the patients after delivery. Tissue samples taken from the invasion area were firstly stained with Hematoxylin-Eosin and were examined morphologically. Then, Double Immunofluorescent staining was performed with $\alpha V\beta 3$ integrin and CD9 antibodies using CYT7 for the characterization of Extravilloustrophoblast cells and Vimentin for the characterization of decidual cells. As a result of staining, expression changes and localizations of these proteins were determined. In addition, Western blot analysis was performed for $\alpha V\beta 3$ integrin and CD9 molecules with fresh tissue samples, This analysis quantitatively determined whether there was an increase in protein expression amounts between the groups.

Results: There was a significant decrease in $\alpha V\beta 3$ integrin in the cesarean section group compared to the PAS group. There was no significant difference between the groups in the WB analysis performed for CD9. In double immunofluorescent staining, both proteins showed positive staining in all groups. As a marker, $\alpha V\beta 3$ integrin is more intensely expressed in EVT cells.

Conclusion: Recurrent cesarean scar may play a role in the development of PAS anomaly through rearrangement of $\alpha V\beta 3$ integrin expression, but CD9 is not primarily involved in PAS development and modulation of $\alpha V\beta 3$ integrin.

Key words: Placenta Accreta Spectrum (PAS), Trophoblast Invasion, $\alpha V\beta 3$ -Integrin, CD9, Placental Implantation Disorders

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin temeli ve amacı	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Plasenta	4
2.1.1. İmplantasyon	4
2.1.2. Plasentasyon	9
2.1.3. İnsan Plasentasının Genel Yapısı	11
2.2. Plasenta Akreata Spektrumu (PAS)	13
2.2.1 Risk Faktörleri	15
2.2.2. Tanı	20
2.2.3. PAS'ın Histolojisi	21
2.2.4. Biyobelirteç Çalışmaları	23
2.2.5. Güncel Gelişmeler ve Moleküler Çalışmalar	25
2.3. İntegrinler	29
2.3.1. İntegrin $\alpha V\beta 3$	33
2.4. Tetraspaninler	34
2.5. Tetraspanin-İntegrin İlişkisi	37
2.6. Tetraspanin CD9	38

3. GEREÇ ve YÖNTEM	40
3.1. Deney gruplarının oluşturulması	40
3.2. Dokuların toplanması, takibi ve saklanması	41
3.3. Hematoksilen-Eosin boyanması ve morfolojik analiz	42
3.3.1. Hematoksilen-Eosin boyama Protokolü	42
3.4. Çiftli İmmünfloresan boyama	43
3.4.1. Çiftli İmmünfloresan boyama Protokolü	44
3.5. SDS-PAGE Western Blot analizi	45
3.5.1. Dokuların lizat haline getirilmesi	45
3.5.2. Protein miktarlarının tayini	46
3.5.3 SDS-PAGE Western Blot Protokolü	49
3.6. İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR	52
4.1. Hematoksilen-Eosin boyanması ve morfolojik analiz Bulguları	52
4.2. Çiftli İmmünfloresan Boyama Bulguları	53
4.2.1. Kontrol Grubu için Çiftli İmmünfloresan boyama Bulguları	53
4.2.2. Sezaryen Grubu için Çiftli İmmünfloresan boyama Bulguları	57
4.2.3. PAS grubu için Çiftli İmmünfloresan boyama Bulguları	61
4.3. SDS-PAGE Western Blot Analizi Bulguları	65
4.3.1. İntegrin $\alpha V\beta 3$ için Western Blot analizi Bulguları	66
4.3.2. CD9 proteini için Western Blot analizi Bulguları	67
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	74
KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	92

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1.	Plasenta Akreata Spektrumu (PAS)'nın Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) bulguları	21
Tablo 3.1.	Çalışma grupları ve oluşturulma kriterleri	40
Tablo 3.2.	Hasta Bilgileri	41
Tablo 3.3	İmmü Floresan boyamalarda kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon oranları	44
Tablo 3.4	İmmü Floresan boyamalarda kullanılan sekonder antikorlar ve dilüsyon oranları	44
Tablo 4.1.	İntegrin $\alpha V\beta 3$ ve CD9 proteinlerinin plasenta ve uterus'da farklı bölgelerdeki İmmü Floresan boyanma sonuçları.	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Preimplantasyon embriyolarında hücre pozisyonuna bağlı olarak hücre tipi (hücre soy) ayrımı modeli.	5
Şekil 2.2. İmplantasyon Penceresi, Endometriyal reseptivite ve hormonal değişim	6
Şekil 2.3. İmplantasyonun aşamaları	8
Şekil 2.4. Plasantasyon sürecinde villus yapısının gelişimi	10
Şekil 2.5. İmplante olmuş insan Blastosist Mikrografi	11
Şekil 2.6. Plasantanın genel yapısı	12
Şekil 2.7. Plasental villus tipleri	13
Şekil 2.8. Placenta Akreata Spektrumu (PAS)'nın aşamaları	15
Şekil 2.9. 34 haftalık gebe Placenta Previa İnkrata vakasının histerektomi örneğinin hematoksilin-eosin boyanmış mikrografi.	22
Şekil 2.10. Placenta Akreata Spektrumu örneklerinde histolojik olarak gözlenen spesifik özelliklerin Hematoksilin-eosin boyama ile incelenmesi	22
Şekil 2.11. Ekstravillöz trofoblast hücrelerinin Sitokeratin 7 boyanması	23
Şekil 2.12. Omurgalı'larda integrin reseptör ailesi	30
Şekil 2.13. İntegrinlerin yapısı	31
Şekil 2.14. Tetraspaninlerin Genel Yapısı	34
Şekil 2.15. Tetraspanin ile zenginleştirilmiş Mikroalanlar ve sinyal molekülleri	35
Şekil 2.16. Tetraspanin-İntegrin Kompleksi	37

Şekil 4.1. PAS grubuna ait plasenta perkreta vakasından alınan doku örneklerine yapılan Hematoksilen-Eosin boyaması ve morfolojik incelemelere ait bulgular (10x).	52
Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait Çiftli İmmü floresan boyama bulguları (10x).	53
Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait Uterus ve Plasental kısımların Çiftli İmmü floresan boyama bulguları (10x).	54
Şekil 4.4. Kontrol grubuna ait Uterinal kısımların Çiftli İmmü floresan boyama bulguları (40x).	55
Şekil 4.5. Kontrol grubuna ait Fetal plasental kısmın Çiftli İmmü floresan boyama bulguları (10x).	56
Şekil 4.6. Sezaryen grubuna ait Villöz ve Maternal plasental bölgeninin Çiftli İmmü floresan boyama bulguları (10x).	57
Şekil 4.7. Sezaryen grubuna ait villöz kısmın Çiftli İmmü floresan boyama bulguları (40x).	58
Şekil 4.8. Sezaryen grubuna ait Maternal kısmın çiftli immü floresan boyama bulguları (40x).	59
Şekil 4.9. Sezaryen grubuna ait Fetal kısmın Çiftli İmmü floresan boyama bulguları (40x).	60
Şekil 4.10. PAS grubuna ait İmmü floresan analiz sonuçları (10x).	61
Şekil 4.11. PAS grubuna ait Maternal kısmın Çiftli İmmü floresan boyama bulguları. (40x).	62
Şekil 4.12. PAS grubuna ait Villöz kısmın Çiftli İmmü floresan boyama bulguları. (40x).	63

Şekil 4.13. PAS grubuna ait fetal kısmın Çiftli İmmü floresan boyama bulguları. (40x)	64
Şekil 4.14. $\alpha V\beta 3$ integrin için PAS, Sezaryen ve Kontrol gruplarında yapılan 3 tekrarlı Western Blot analiz sonuçları.	66
Şekil 4.15. Deney gruplarına ait plasenta ve histerektomi materyallerinden alınan dokuların $\alpha V\beta 3$ integrin için sonuç grafiği.	66
Şekil 4.16. CD9 proteini için PAS, Sezaryen ve kontrol gruplarında yapılan 3 tekrarlı Western Blot analiz sonuçları.	67
Şekil 4.17. Deney gruplarına ait plasenta ve histerektomi materyallerinden alınan dokuların CD9 proteini için sonuç grafiği.	68

SİMGELER ve KISALTMALAR

PAS	: Plasenta Akreata Spektrumu
CYT7	: Sitokeratin 7
TE	: Trofektoderm
İHK	: İç Hücre Kitlesi
ECM	: Ekstraselüler matriks
CD	: Cluster of Differentiation
$\alpha V\beta 3$	: Alpha-V beta-3
CDX2	: Kaudal Tip Homeobox Protein 2
dNK	: Desidual doğal öldürücü hücre
LH	: Lüteinize Edici Hormon
MUC1	: Müsin 1
HLA-G	: Major Histocompatibility Kompleks, Class1, G
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
EVT	: Ekstravillöz Trofoblast
CTB	: Sitotrofoblast
STB	: Sinsisyotrofoblast
İEVT	: İnvaziv Ekstravillöz Trofoblast
CSP	: Sezaryen Skar Gebeliği
IVF	: İn vitro Fertilizasyon
KET	: Kriyoprezerve Embriyo Transferi
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
Ark.	: Arkadaşları
cm	: Santimetre

mm	: Milimetre
CDH1	: Kadherin 1
MMP2	: Matriks Metallopeptidaz 2
TGFβ2	: Dönüştürücü büyüme faktörü Beta 2
ZEB2	: Çinko parmak E-Box bağlayıcı homeobox 2
DOCK4	: Sitokenez 4 tahsis eden
MARVELD1	: MARVEL domain-containing protein 1
ILK	: İntegrin-Linked Kinase
FAK	: Fokal adhezyon kinaz
IUGR	: Fetal gelişim kısıtlaması
OPN	: Osteopontin
TM4SF	: Transmembran süper ailesi 4
TM	: Transmembran alan
EC1	: Ekstraselüler loop 1
EC2	: Ekstraselüler loop 2
TEM	: Tetraspanin Zenginleştirilmiş Mikroalan
Rho	: Ras GTPaz ailesinin alt üyesi, GTPaz
Rac	: Rho GTPaz ailesinin alt üyesi, GTPaz
RhoA	: Ras homolog aile üyesi A, RHOA tarafından kodlanan GTPaz
PI4K	: Fosfatidilinositol 4-kinaz
PKC	: Protein Kinaz C
P130Cas	: Meme kanseri anti-östrojen rezistans protein 1
EWI	: İmmünglobülin protein süper ailesi
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

CHO	: Çin-hamsterı ovaryumu
DDR1	: Epitelyal diskoidin alan içeren reseptör 1
HUVEC	: İnsan Umblikal Ven Endotel Hücreleri
PAPP-A	: Gebelikle İlişkili Plazma Protein A
hCG	: İnsan Koryonik Gonodotropin
cffDNA	: Hücre içermeyen fetal DNA
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
TEMED	: Tetrametiletilediamin
APS	: Amonyumpersülfat
DAPI	: 4 6, 6-diamidino-2-fenilindol
TBS	: Tris-buffered Saline
TBS-T	: Polisorbat 20 eklenmiş Tris-buffered Saline
NaCl	: Sodyum Klorür
KCl	: Potasyum Klorür
Na₂HP0₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat
KH₂PO₄	: Potasyum Hidrojen Fosfat
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
Gr	: Gram
GDM	: Gestasyonel Diabetes Mellitus

1. GİRİŞ

1.1 Hipotezin temeli ve amacı

Plasenta, gebeliğin sağlıklı ilerleyişi ve fetüs gelişimi için oldukça önemli bir organdır. Fertilizasyondan sonra gerçekleşen implantasyon sürecinde blastosistin dış hücrelerinden oluşan Trofektoderm'den gelişir. Trofoektoderm hücreleri embriyonun desiduaya implante olmasını sağlar. İmplantasyonu takiben plasental gelişim başlar. Primer villüs, sekonder villüs ve tersiyer villüs aşamalarından sonra plasental villüs gelişimi tamamlanır. Plasentadaki villüslerden kaynak alan ekstra villöz trofoblast hücreleri (EVT) uterustaki vasküler sistemi oluşturan spiral damarlara invaze olarak ve spiral arterleri yeniden şekillendirerek maternal/fetal dolaşımı sağlayıp anne ile bebek arasındaki besin iletimi ve atıkların uzaklaştırılması işlevlerini gerçekleştirir (Turco ve Moffett 2019; Maltepe ve ark. 2015). Doğumla birlikte plasenta uterustan ayrılır ve anne vücudundan atılır. Plasental gelişim ve doğum çeşitli nedenlerden dolayı birçok patolojik süreci de içermektedir. Ciddi oranlarda görülen çeşitli plasental patolojiler de gebelik sürecine eşlik edebilir (Cross 2006). Bunlardan bir tanesi de son yıllarda ülkemizde ve dünya'da insidansı belirgin düzeylerde artan Plasenta Akreata Spektrumu (PAS)'dur.

Plasenta, normal şartlarda desiduaya implante olur ve EVT hücrelerinin invazyonu endometriyum ile sınırlı kalır. Ancak Plasenta Akreata Spektrumu (PAS)'nda, trofoblastların anormal migrasyonu ve invazyonu görülmektedir. EVT hücrelerinin invazyon alanı ve migrasyonu endometriyum ile sınırlı kalmayıp, miyometriyuma hatta serosaya kadar invaze oldukları görülür (Di Mascio ve ark, 2019). Plasenta Akreata ile ilgili uluslararası literatürdeki ilk çalışmalardan birini yayınlayan Irving ve Hertig, desidua bazalisin kısmen ya da tamamen yokluğunun Plasenta Akreata için histopatolojik bir kriter olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Irving ve Hertig, 1937). Günümüzdeki histopatolojik bilgilere göre de PAS'ın belirleyici özelliği desidua ile miyometriyum arasındaki sınırın belirsizliğidir (Hecht ve ark, 2020). Plasenta Akreata Spektrumu, EVT hücrelerinin uterus'daki invazyon sınırlarına göre 3 çeşide ayrılarak sınıflandırılmıştır.

Bunlar sırasıyla Plasenta Akreata, Plasenta İnkreta ve Plasenta Perkreata olarak isimlendirilmektedir.

Plasenta Akreata, adherent plasenta olarak adlandırılıp EVT invazyonu uterusda desidua ile sınırlıdır. Bu durumda genellikle histerektomi gerektirmez. İnvazyon derinliği olarak bir üst derece olan Plasenta İnkreta'da EVT hücreleri miyometriyuma kadar invaze olur. Son olarak Plasenta Perkreata'da ise plasenta uterusun en dış katmanını olan serosaya kadar invazyon gerçekleşebilir. Hatta bazı vakalarda parametrium ve mesane gibi çevre doku ya da organlara kadar invaze olabildiği tespit edilmiştir (Silver ve ark, 2015).

İnkreta ve Perkreata'da plasental ayrılma gerçekleşmez. Sıklıkla aşırı kanama gözlenir ve maternal mortalitenin önüne geçilmek amacıyla histerektomi gerekmektedir. Plasenta Akreata Spektrumu'nun kesin nedeni hala tam olarak bilinmemektedir. Genel inanış iyatrojenik faktörlerden kaynakladığı yönündedir. Araştırmacılar tarafından çeşitli risk faktörleri öne sürülmektedir. Bunlardan ilki ve en önemlisi sezaryen doğum ya da küretaj gibi bir cerrahi müdahale sırasında uterus miyometriyumunda skar yapısı oluşturulması ve buna bağlı olarak da desidua bazalisin hasar görmesidir. Araştırmacılar, trofoblast hücrelerinin skar alanında anormal şekilde invaziv bir karakter gösterdiğini belirmişlerdir (Piñas Carrillo ve Chandrahara 2019).

Dünya çapında sezaryen doğum oranları 1990'lı yıllarda %7 civarında görülürken, 2014 yılında %19 oranına kadar yükseldiği tespit edilmiştir (Betran ve ark, 2016). Günümüzde, Türkiye, Mısır, Brezilya gibi nüfus artış hızı yüksek olan ülkelerde sezaryen doğum oranı %50'nin üstündedir. Bu oran yıllar geçtikçe daha da artmaktadır (Jauniaux ve ark, 2018). Plasenta Akreata Spektrumu için önerilen en büyük risk faktörünün sezaryen skarı olduğu ve ülkemizde de bu hastalığın insidansında önemli oranda bir artış görüldüğü göz önüne alınırsa, PAS konusunun araştırılması klinik açıdan çok önemlidir.

Literatürde yaptığımız araştırmalarda EVT hücrelerinin invaziv karakterinin bir kanser hücresi davranışına benzediği hemen göze çarpmaktadır (Matsuzaki ve ark. 2022; Illsley ve ark. 2020; McNally ve ark. 2020; Long ve ark. 2020; Bartels ve ark. 2018). Genel olarak hücre motilitesi, migrasyonu, invazyonuyla ilgili alanlardaki araştırmalar hücre-hücre/hücre-ekstraselüler matriks etkileşim kompleksleri ile ilgilidir. Birçok kanser ve

anjyogenez çalışmasında integrinler ile ekstraselüler matriks proteinlerinin etkileşimleri yoğun olarak araştırılmıştır (Steiger ve ark. 2021; Li ve ark. 2022; Valdembri ve Serini 2021). Literatüre göre anjyogenez ve kanser mekanizmalarında düzenleyici rolü olduğu bilinen ve ekstraselüler matriks proteinlerinden vitronektin'in reseptörü olan Integrin $\alpha V\beta 3$, anormal trofoblast hücre invazyonunda düzenleyici olmaya iyi bir adaydır.

Bunun yanı sıra Tetraspaninler, diğer hücre yüzey proteinleri ile multimerik kompleksler oluşturan dört transmembran alanına sahip hücre yüzeyi glikoproteinleridir. Hücre farklılaşması, adhezyonu ve sinyal iletimi gibi birçok hücresel süreçte işlev görür. Esas olarak kanser hücresi motilitesinin ve metastazının baskılanmasında kritik rol oynar (Bassani ve Cingolani 2012). Bu ailenin bir üyesi olan CD9'un fonksiyonu, hücre yüzeyinde integrinler ile kompleks oluşturarak hücre motilitesini düzenlenmesine katkı sağlamaktadır (Berdichevski 2001).

Bu çalışmanın amacı normal, sezaryan ve PAS'lı hastaların endometriyal ve miyometriyal dokuya invazyon süreçlerini gerçekleştiren EVT hücrelerinin motilitesinin düzenlenmesinde integrin $\alpha V\beta 3$ ve CD9 proteinlerinin rolünü araştırmaktır. Ayrıca plasental villusu oluşturan hücrelerdeki ekspresyonlarını belirlemektir.

Bu çalışmada, PAS vakalarından alınan doku örneklerine rutin ışık mikroskopi takip işlemleri yapılmış ve parafin bloklar hazırlanarak alınan kesitlere Hematoksilen-Eosin boyaması yapılmıştır. Uterusun genel yapısı, desiduanın durumu, villus yapıları ve invazyon alanındaki trofoblastlar böylece morfolojik olarak belirlenmiştir.

İntegrin $\alpha V\beta 3$ ve CD9 ekspresyonlarının değerlendirilebilmesi için plasental dokulara çiftli immünfloresan boyamalar gerçekleştirilmiştir. Bu proteinlerin ekspresyon düzeyleri, yoğunlukları ve lokalizasyonları bakımından PAS grubu diğer gruplarla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Diğer taraftan gruplardan alınan taze dokular lizat haline getirilerek Western Blot analizi gerçekleştirilmiştir. Böylece İntegrin $\alpha V\beta 3$ ve CD9 proteinlerinin ekspresyonlarının diğer göre PAS vakalarındaki değişimi kantitatif olarak tespit edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

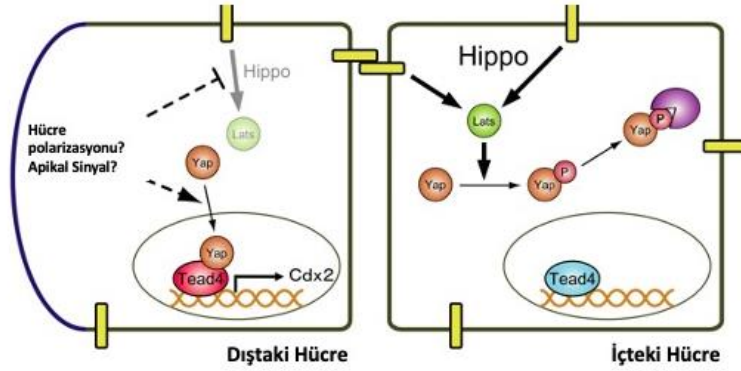
2.1. Plasenta

Plasenta, gebeliğin normal sürecinin tamamlanması ve fetüsün sağlıklı gelişimi için oldukça kritik fonksiyonlara sahip son derece özelleşmiş bir organdır. Sağlıklı plasental gelişim, temelde fetüs ile anne arasındaki besin ve gaz değişiminin sağlanması ve gebelik boyunca uterus ve fetüste homeostazın düzenlenmesi için son derece önemlidir (Maltepe ve ark. 2015). İmplantasyon ve buna bağlı olarak plasentanın gelişimi, maternal ve embriyonik hücrelerin birbirleriyle etkileşimini gerektiren birbirini izleyen bir dizi koordineli süreci içerir. (Gude ve ark. 2004). Maternal immün sistem tarafından gebeliğin tanınması ve sürdürülmesi, kardiyovasküler ve metabolik fonksiyonların parakrin-endokrin araçlarla düzenlenmesi gibi plasentanın direkt görevli olduğu bu süreçlerden herhangi birinde gerçekleşen bir anormallik gebelikle ilişkili çeşitli patolojilere neden olmaktadır (Cross 2006).

2.1.1. İmplantasyon

İnsanda ovulasyondan sonraki 24 ila 48 saat içinde fallop tüpünde sperm ve oositin fertilizasyonu gerçekleşir. Fertilizasyon sonrası oluşan yapı zigot olarak isimlendirilir ve totipotent özelliğe sahiptir. Non-adhesiv bir yapı olan zona pellucida ile çevrili zigotun fallop tüpünden uterus doğru ilerlemesi sırasında bir dizi mitoz gerçekleşerek gelişimin ilk aşamalarından biri olan 12-16 hücrelik Morula yapısının oluşumu gerçekleşir. Morula fertilizasyondan 2-3 gün sonra ancak uterus kavitesine ulaşabilmektedir. Başlangıçta çok hücreli bir yapı olarak görülürken, içi sıvı dolu bir yapı görünümüne kavuşması bir sonraki aşama olan blastosist aşamasına geçişin işaretidir (Norwitz ve ark. 2001, Fragouli ve ark. 2011, Budhwar ve ark. 2017). Blastosist aşamasına geçiş sırasında birçok hücrel farklılaşma mekanizması da sürece eşlik etmektedir. Blastosistin en dışında bulunan ve yapıyı tamamen saran tek sıralı yüzey hücreleri Trofektoderm (TE) tabakası olarak farklılaşır. Trofektoderm tabakası, gelişimin ilerleyen aşamalarında başta plasenta olmak üzere ekstraembriyonik yapıların gelişmesini sağlayan pluripotent kök hücrelerden oluşmaktadır (Fragouli ve ark. 2011, Tocci ve ark. 2020). Blastosistin iç kısmında bulunan

hücreler ise İç Hücre Kitlesi (İHK) olarak adlandırılır, bunlar ilerleyen dönemlerde embriyoyu oluşturacak olan pluripotent embriyonik kök hücrelerdir (Fragouli ve ark. 2011). Blastosistin dış tabakasını oluşturan hücreler trofoblast, iç hücre kitlesini oluşturan hücreler embriyoblast olarak isimlendirilir. Blastosistin iç ve dış yüzey hücreleri arasında polarite ve adhezyon yeteneği farklılıklarına neden olan bu hücre tipi soy ayrımının Hippo sinyallemedeki aktivasyon farklılıklarından kaynaklandığına inanılmaktadır (Nishioka ve ark. 2009, Hirate ve ark. 2013). Özellikle farelerde yapılan çalışmalara göre bu sinyal ağı, hücre tipini düzenleyici genlerinden olan CDX2'nin ekspresyonunu kısıtlar. CDX2, 8-hücreli dönemde genel olarak ifade edilirken sonrasında sadece Trofektoderm'de ekspresyon gösterir. Aynı zaman aralığında trofektodermde Hippo sinyalinin ise inaktif olduğu görülmektedir (Nishioka ve ark. 2008).

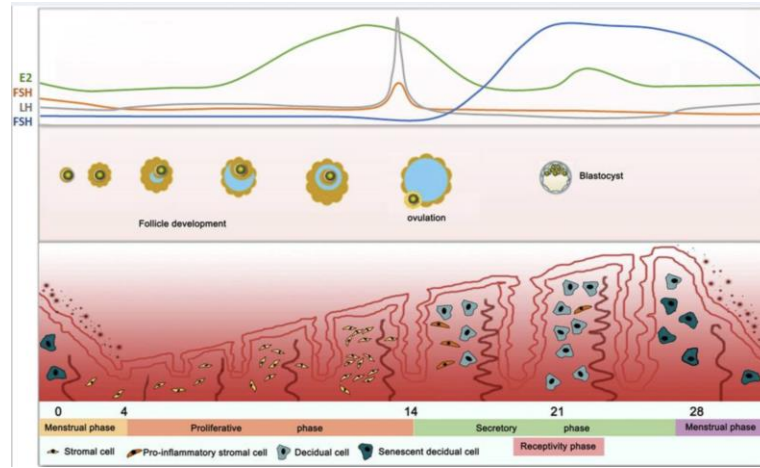


Şekil 2.1. Preimplantasyon embriyolarında hücre pozisyonuna bağlı olarak hücre tipi (hücre soy) ayrımı modeli. Hippo sinyali, Yap molekülü aracılığıyla Tead4 ve CDX2'nin gen ekspresyonu sağlayarak hücre lokalizasyonuna bağlı olarak düzenleme işlemini gerçekleştirir. Bunun sonucunda Trofektoderm tabakasından trofoblast hücreleri ve İç Hücre Kitlesinde Embriyoblast hücreleri dönüşümü (hücre tipi- soy ayrımı) belirlenir (Nishioka ve ark. 2009'dan uyarlanmıştır).

Blastosist uterus kavitesine girdikten 72 saat sonra zona pellucida'sını kaybeder. Böylece dış yüzeyde Trofektoderm tabakasından gelişmekte olan trofoblast hücreleri serbestleşmiş olur. Bu hücreler fertilizasyonun 6 ila 7. Gününde implantasyonun gerçekleşmesi için desidua ile etkileşime girecektir (Norwitz ve ark. 2001).

İmplantasyon, blastosistin uterusun endometriyumuna tutunması ve plasentayı oluşturmak için önce uterus epiteli ardından da maternal dolaşıma invaze olma süreci olarak tanımlanır. Başarılı bir implantasyon için reseptif bir endometrium, normal ve fonksiyonel bir gelişime sahip embriyo ve maternal-embriyonik dokular arasında

senkronize bir diyalog gerekir (Zohni ve ark. 2016, Simon ve ark. 2000). İmplantasyonun başlamasıyla birlikte hem embriyo hem de endometrium karmaşık bir süreci birlikte yürütür (Achache ve ark. 2006). Embriyo uterusun lümen epiteline tutunmaya başladığında uterus; desidualizasyon adı verilen bir süreçle kendisini embriyo implantasyonuna hazırlar. Gözlenen ilk morfolojik değişiklik stromal hücrelerin desidual hücrelere dönüşmesidir. Hücrelerin değişimiyle oluşan desiduada uterus stroması salgısal olarak değişir, özelleşmiş desidual doğal öldürücü hücreler (dNK) desiduaya göç eder ve vasküler yeniden şekillenme gerçekleşir (Ashari ve ark. 2018, Sehring ve ark. 2022). Böylece uterus embriyo için “reseptif” hale gelmiş olur (Ashari ve ark. 2018). Reseptif bir uterus ile normal bir blastosist arasındaki etkileşim, yalnızca "İmplantasyon Penceresi" olarak bilinen bir bölgede ve sınırlı bir zaman aralığında meydana gelebilir (Psychoyos, 1973). Bu pencere 28 günlük normal menstrual siklusun 16-22. günleri ile Lütinize Edici Hormon (LH) artışının 5-10 gün sonrası ile sınırlıdır. Sonrası geç luteal faz olarak adlandırılır ve uterus bir sonraki sıklusa kadar non-reseptif olarak kalır (Kim ve ark. 2017).



Şekil 2.2. İmplantasyon Penceresi, Endometriyal reseptivite ve Hormonal değişim (LH: Lütinize edici hormon, FSH: Folikül stimüle edici hormon, E2: Östrojen) (Wu ve ark. 2021)

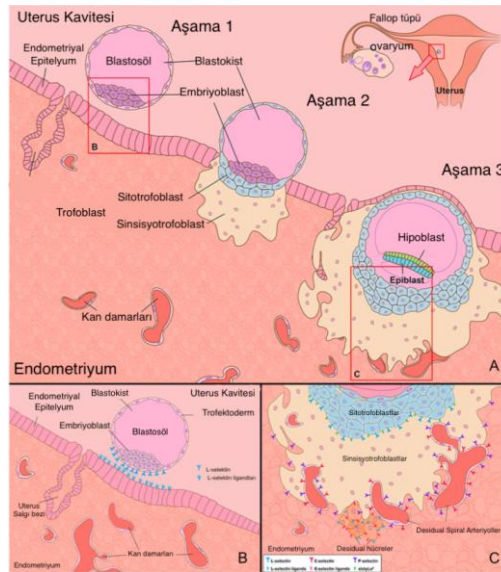
Başarılı bir implantasyon, uterusun ve blastosistin kompleks moleküler bağlantılarını gerektiren bir sürecin sonucudur. 3 aşamada sınıflandırılabilir; (Enders, 1967; Kim ve ark. 2017).

Apozisyon aşaması; blastosist sinyallerinin ve endometriyal sinyallerin etkileşimi büyük oranda rol oynar. Blastosist ve uterusun luminal epiteli arasındaki ilk ve zayıf etkileşimin kurulduğu aşamadır. Bu aşamada ve etkileşimde Selektinler büyük oranda rol oynar. Blastosistten salgılanan büyüme faktörleri ve sitokinler, endometriyal epitelin dönüşerek blastosist için reseptif hale gelmesinde rol oynarlar. Ayrıca bu aşamada lümen epitelinden MUC-1 salgılanması gerçekleşir. Bunların sonucunda Blastosist ve reseptif endometrium arasındaki iletişim kurulmuş olur (Ochoa-Bernal ve ark. 2020; Norwitz ve ark. 2001).

Adhezyon aşaması; başlaması için ilk adım MUC-1 salgısının ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Hemen ardından uterus epiteli blastosisti dıştan sarmaya başlar. Blastosistin temasta olduğu kısım desidualize olmuştur. İç hücre kitlesinde embriyonun spesifik alanlarının gelişimini yönlendirecek bilaminar disk oluşumu gözlenir. Ayrıca plasantasyonu sağlayacak olan primer sinsisyumun oluştuğu ve epiteli geçerek alttaki desiduya invaze olduğu görülebilir. Bu süreç endometriyal glandlardan, kan damarlarından kaynaklanan çeşitli uyarıcı faktörler ile sağlanır. LIF, özellikle adhezyon aşamasında oldukça etkili olduğu bilinen moleküllerden biridir. Büyüme faktörleri, sitokinler, transkripsiyon faktörleri, proteinaz ve inhibitörleri, Oksijen miktarı gibi faktörler çeşitli mekanizmalarla trofoblastların proliferasyon ve farklılaşmasını sağlayarak plasantasyonu destekler. Ayrıca trofoblast hücreleri, desiduanın ekstraselüler matriksini parçalamak ve invazyonu sağlamak için büyük miktarlarda proteaz salgılayıp oldukça aktif oldukları bir süreç içindedirler. (Norwitz ve ark. 2001, Kim ve ark. 2017; Ochoa-Bernal ve ark. 2020). Trofoblastlar, integrin ekspresyonlarını desidual alanda bulunan integrin ligandlarına uyumlu şekilde değiştirirler. Böylece daha sıkı ve daha iyi bir tutunma sağlarlar (Ashari ve ark. 2018). Ayrıca bu integrinler'den $\alpha V\beta 3$ özellikle adhezyon esnasında çok önemlidir. $\alpha V\beta 3$ integrin, insan trofoblast hücrelerinde ve uterus luminal epitelinde eksprese edilerek endometriyal tutunmaya yardımcı olur (Ochoa-Bernal ve ark. 2020).

İnvazyon Aşaması; fertilizasyondan sonra yaklaşık 14. günde blastosistin desiduya tamamıyla gömülü duruma gelmesiyle gerçekleşir. Blastosistin trofoblast hücreleri, maternal kan damarlarına ulaşmak amacıyla uterus epiteli altındaki endometriyal

stromaya penetre olurlar. Primer sinsisyumlar genişleyip prolife olarak desiduada oluşan kan gölcükleri olan lakünleri trabeküller şeklinde ayırır. Bu sırada corpus luteumdan salgılanan progesteron, prostaglandin sekresyonunu uyarırken desiduada immün toleransın gerçekleşmesinde görev alır. Trofoblast hücrelerinde gerçekleşen kompleman aktivasyonu ve HLA-G antijen sunumu da immün tolerans sağlanmasında rol alır. Yine trofoblastlarda eksprese edilen VEGF ve reseptörleri, desiduada maternal anjiyogenez mekanizmasını gebelik için yeniden düzenler (Norwitz ve ark. 2001). Uterusta blastosist trofektoderminin ve endometriyal lümen epitel hücrelerinin adhezyonuna integrinler, kadherinler, selektinler gibi hücre adhezyon molekülleri aracılık eder. Hücre adhezyon molekülleri, invaziv trofoblast hücrelerinin (Ekstravillöz trofoblastlar) yüzeyinde eksprese edilir ve bu moleküller desiduanın ekstraselüler matrisinde eksprese edilen ligandlarla etkileşime girer (Lyll, 2006). Bu tezin ana başlığını oluşturan moleküllerden biri olan İntegrinler, iki farklı α ve β alt biriminin çeşitli kombinasyonları şeklinde bulunan ve hücre yüzey reseptörleri olarak işlev gören transmembran bir glikoprotein ailesidir. Menstrüel döngüye özgü integrinler, insan endometriyumunun orta luteal fazında upregüle edilir ve implantasyon penceresinin belirteçleri olarak kabul edilirler (Lessey ve ark. 1992). Trofoblastların implantasyon esnasında da integrinleri eksprese ettikleri uzun yıllardır bilinmektedir (Sutherland ve ark. 1993).



Şekil 2.3. İmplantasyonun aşamaları. (A)'da 1. Aşama Apozisyon, 2. Aşama Adhezyon ve 3. Aşama İnvazyon olarak şematize edilmiştir. (B) Trofoblast yüzeyinde eksprese edilen L-selektin ve endometriyal

epitel yüzeyinde eksprese edilen L-selektin ligandları, blastosist ve endometriyal epitelin adhezyonunda çok önemli roller oynar. (C) İmplantasyon tamamlandıktan sonra trofoblast hücreleri prolifer olmaya ve endometriyuma invaze olmaya devam ederler. Trofoblast invazyonu boyunca çeşitli Selektin tipleri hücrelerin invazyonunun regülasyonunda rol alır (Feng ve ark. 2017).

2.1.2. Plasentasyon

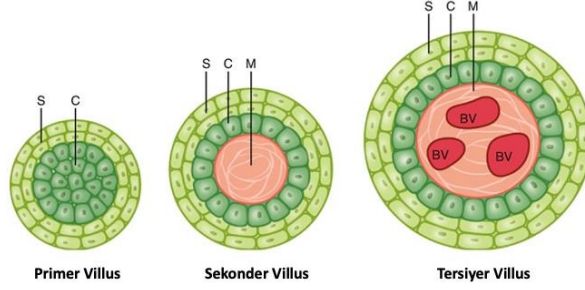
Etik kurallar insanlarda erken gebelik dönemlerinin tam olarak araştırılamamasına neden olmaktadır. Bu yüzden hala gizemini koruyan birçok şey bulunmaktadır. Ancak insandaki gelişime yakın bir süreç izlediği düşünülen primatlardaki çalışmalar bize insan çalışmalarına en yakın sonuçları sunarlar. Aynı zamanda insan erken dönem histerektomi materyalleri de nadir çalışma kaynaklarından biridir. Primat çalışmalarında ve histerektomi materyallerinde karşılaşılan sonuç, blastosistin uterus epiteline adhezyonunun hemen ardından trofektoderm hücrelerinin primer sinsisyumu oluşturduğu yönündedir. Böylece plasental gelişim başlamış olur (Boyd ve Hamilton, 1970).

Plasenta oluşumu 3 aşamada gerçekleşmektedir;

- a- Prelaküner aşama
- b- Laküner aşama
- c- Villöz aşama (Benirschke ve ark. 2012).

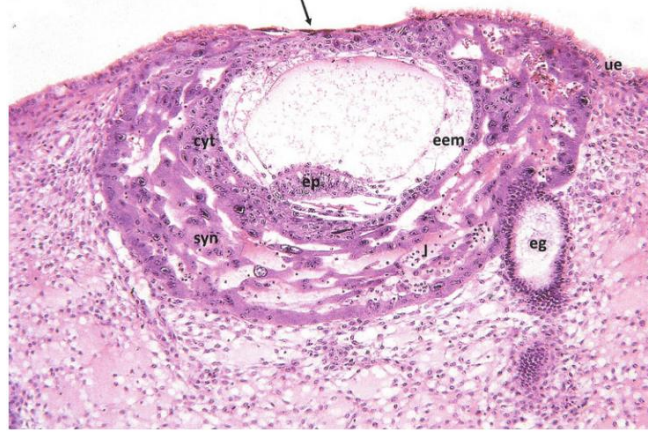
Primer sinsisyum, uterusun yüzey epitelini aşarak alttaki özellemiş desidualize endometriyal alana ilerler. Daha sonra primer sinsisyum içerisinde laküna olarak adlandırılan sıvı dolu boşluklar belirir. Plasental gelişimin laküner aşaması başlamış olur. Yaklaşık 14. güne karşılık gelir ve blastosist tamamen desiduya gömülüp yüzey epiteliyle kaplanmıştır. Sonrasında sinsisyum lakuna yapılarını bir trabekül sistemine dönüştürerek genişlemeye başlar. Aynı zamanda desidual bezleri aşındırarak salgıların sinsisyal kitleyi yıkamasına izin verir (Hertig ve ark. 1956). Sinsisyumun yapısında bulunan trofoblast hücreleri sitotrofoblast hücreleri olarak adlandırılır. Başlangıçta maternal doku ile doğrudan temas halinde değildir. Ancak hızla prolifer olarak dışta Sinsisyotrofoblast tabakası, içte Sitotrofoblast hücrelerini içeren primer villusları oluştururlar. Plasental gelişimin villöz aşaması başlamıştır. Villöz yapı çoğalır ve dallanır. Lakuner aşamada oluşan trabeküler boşluklar intervillöz boşluk haline gelir. 17-18. günlerde, villusun

merkezinde ekstraembriyonik mezenkimal birikim görülmeye başlar, bu birikim sekonder villusun oluştuğunu işaret etmektedir. Hemen sonrasında villus merkezinde görülen fetal kılcal damarlar ise tersiyer villusun gelişmeye başladığını işaret eder (Turco ve Moffett 2019).



Şekil 2.4. Plasentasyon sürecinde villus yapısının gelişimi. Primer, Sekonder ve Tersiyer villuslar. (S: Sinsisyotrofoblast tabakası, C: Sitotrofoblastlar, M: Mezenkim doku, BV: Kan damarları) (Ernst ve ark. 2019).

Villöz ağ, koryon plakasından kademeli olarak dallanarak hızla büyümeye devam eder. Villusun desidua ile temasta olduğu yerde Sitotrofoblast kolonları bulunur. Burada bulunan serbest Sitotrofoblastlar epitelyal-mezenkimal geçişe (EMG) çok benzeyen bir süreç ile EVT olarak farklılaşır. Böylece EVT hücreleri desiduadağı yapıları invaze etmek için sitotrofoblast kolonunu terk eder. Spiral arterlerin EVT'ler tarafından invaze edilmesiyle maternal ve fetal dolaşım arasında değişim sağlanır. İlk trimesterin sonunda plasentanın genel yapısı böylece oluşmuş olur. (Turco ve Moffett 2019, Knöfler ve ark. 2019, Liu ve ark. 2018).



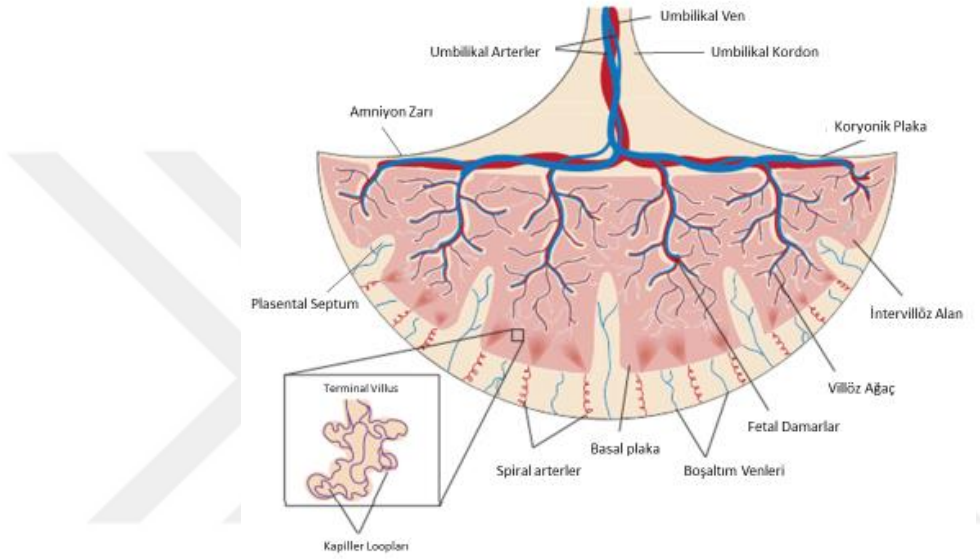
Şekil 2.5. İmplant olmuş insan blastosist mikrofrafı. Şekil; içinde lakünaların geliştiği sinsityotrofoblast (syn) tabakasını içeren neredeyse tamamen implante olmuş bir insan blastosist fotoğraf mikrofrafını göstermektedir. Blastosistin duvarı, sitotrofoblast (cyt) hücreleri ile çevrilidir ve iç kısımda ekstraembriyonik mezoderm (eem) ile kaplanmıştır. Uterus epitelindeki yarıklar (ue) fibrin tıkaçları (ok) ile doldurulmuştur. Sinsisyotrofoblastların (syn) bir endometriyal bezin (eg) duvarını çevrelediğine dikkat edilmelidir. Bezlerin trofoblastlar tarafından aşındırılması, ilk trimesterde histiotropik beslenmeyi sağlar. (ep: epiblast, l: lakün). (Benirschke ve ark. 2012).

Şimdiye kadar implantasyon ve plasantasyon kısımlarında başlıca 2 tip trofoblast hücresi bulunur. Bunlar Sitotrofoblast ve sitotrofoblastların füzyonuyla oluşmuş sinsisyotrofoblast hücreleridir. Ancak son yıllarda yapılan tek hücre analiz çalışmalarında temel olarak bahsedilen bu trofoblast hücrelerinin de çok çeşitli işlevlere sahip alt popülasyonları olduğu gösterilmiştir (Liu Y. vd., 2018).

2.1.3. İnsan Plasentanın Genel Yapısı

Sağlıklı bir insan plasenta disk şeklinde, ortalama 22 cm. çapında, 2.5 cm. kalınlığında ve 470 gram ağırlığındadır. Placenta fetal ve maternal placenta olarak iki kısımdan oluşur. Fetal placenta, umbilikal kordon çıktığı ve fetal yüzü dıştan saran amniyon ile altında koryonik tabakadan oluşur. Maternal placenta ise bazal plaktan oluşmaktadır. Plasentanın maternal kısmı, maternal kanı plasentaya taşıyan yaklaşık 50-120 spiral arterden ve kanı drene eden yaklaşık 30 desidual venden oluşmaktadır. Fetal kısım ise intervillöz boşluğa doğru yaklaşık 30 kez dallanmış ve anne kanıyla direkt olarak temasta olan villus ağaçlarından oluşmaktadır. İnsan plasentasının maternal kısmı birbirinden tamamıyla ayrılmamış yaklaşık 3.5 cm çapında 40-60 fonksiyonel birimden oluşmaktadır ve her biri “kotiledon” olarak adlandırılır. Plasentadaki maternal dolaşım, trofoblastların maternal

spiral arterleri invaze ederek ve spiral arterlerin yeniden düzenlenmesini sağladıktan sonra, gebeliğin 10-12. haftası civarında başlar. Maternal dolaşımın bu gecikmeli başlangıcının gelişmekte olan fetal dokuları maternal kan akışının yüksek hızından ve yüksek kısmi oksijen basınçlarından koruduğuna inanılmaktadır (Benirschke 2004, Serov ve ark. 2016, Benirschke ve ark. 2012).

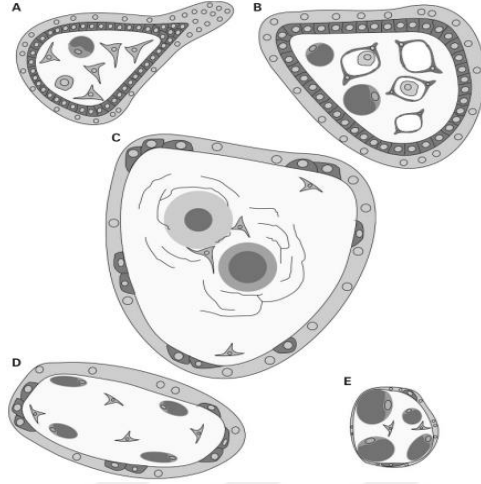


Şekil 2.6. Plasentanın genel yapısı. (Plitman Mayo ve ark. 2016 referansından alınan görsele eklemeler yapılarak alıntılanmıştır).

Plasental Villus Tipleri

Plasental gelişim sürecinde anlatıldığı üzere villöz ağaç, intervillöz boşlukta serbestçe yüzen birçok kez dallanmış bir yapı olarak bulunur. Ayrıca bazıları trofoblastik hücre kolonlarını içeren “ankraj (çapa)” villuslar olarak bazal plak’a ulaşabilir. Serbestçe yüzen villuslar stromal özellikleri, damar yapıları ve morfolojik özellikleri dikkate alınarak beş villus tipine ayrılmıştır: (Castellucci ve ark. 1990, Huppertz 2008)

- A- Mezenkimal villus (100-150 μm çapında)
- B- İmmature intermediate villus (100-400 μm çapında)
- C- Stem (kök) villus (100-3000 μm çapında)
- D- Mature intermediate villus (80-120 μm çapında)
- E- Terminal villus (yaklaşık 80 μm çapında)



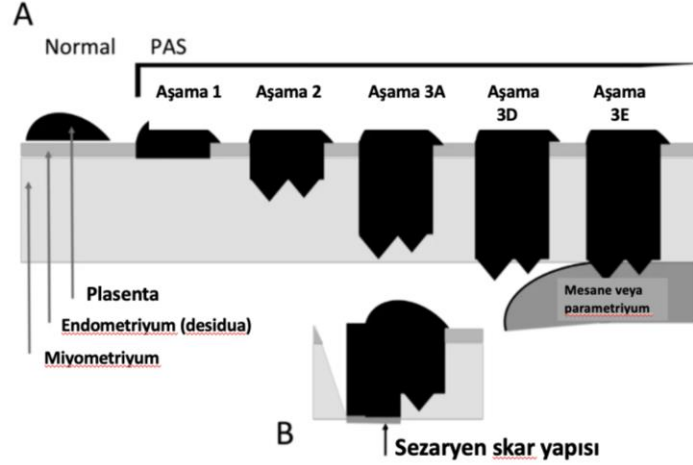
Şekil 2.7. Plasental Villus tipleri. Villusu çevreleyen açık gri yapı sinsisyotrofoblast tabakasını; sinsisyotrofoblastlara bitişik bulunan tek sıralı koyu gri hücreler sitotrofoblastı; merkezdeki beyaz kısımlar villus stromasını; stroma içerisindeki gri ve koyu gri hücreler stromal hücreleri; (B)'deki stromal kanallardaki açık gri hücreler makrofajları; koyu gri daireler ve çeperindeki oval hücreler endotel hücreleri içeren plasental kan damarlarını; (C)'de stromanın merkezindeki gri daireler stem villusun merkezi damarlarını (arter ve ven) temsil etmektedir. (Huppertz 2008).

Stem villuslar en büyük villuslardır ve merkezi damarlarının çevresinde perivasküler bir kontraktıl sistem görünmektedir (Demir ve ark. 1997). Mezenkimal villuslar mezenkimal hücrelerce zengindir ve sinsisyal tabaka belirgindir. İmmatür intermediate villuslar fetal makrofaj hücreleri olan Hofbauer hücrelerini içeren stromal kanallarla karakterizedir. Matür intermediate villuslar sadece gevşek bir stroma içerisinde daha küçük damarlar ve kılcal damarlar içerir. Son olarak Terminal villus ise, ince bir vaskülo-sinsisyal membrana sahip sinüzoidlere ve kılcal damarlara sahiptir. Gaz, besin ve metabolit değişimleri villöz ağacın en ucunda bulunan terminal ve mature intermediate villuslarda gerçekleşir (Huppertz 2008, Serov ve ark. 2016).

2.2 Plasenta Akreata Spektrumu (PAS)

Plasenta Akreata Spektrumu (PAS), anne sağlığını dünya çapında ciddi oranlarda etkileyen ve görülme sıklığı yıllar içinde katlanarak artan gebelikle ilişkili bir hastalıktır. Normal şartlarda doğumdan sonra plasenta uterustan kendiliğinden ayrılır. Plasenta Akreata Spektrumu'nda ise bu ayrılma gerçekleşemez (Hobson ve ark. 2019). Normal bir gebelikte, desidua invazyonu gerçekleştiren intertisyel ekstra villöz trofoblastların (iEVT) migrasyonu ve dolayısıyla invazyonu desidua bazalis ile sınırlıdır. iEVT'ler

miyometriyuma kadar invaze olup daha fazla ilerlemez. Ancak PAS'ta invazyon endometriyumda durdurulamaz ve trofoblast invazyonu miyometriyum, hatta serosa ile çevre doku ve organlara kadar ilerler. Bu da doğum sırasında kan kaybına bağlı olarak maternal mortalitenin önemli nedenlerinden biridir (Matsuzaki ve ark. 2022; Di Mascio 2019). Irving ve Hertig, 1937 yılında PAS için uluslararası literatürdeki ilk kohort çalışmasını yayınlamışlardır. Bu yayın 20 vakanın kapsamlı klinik ve histopatolojik anlatımını ve 1935'ten önce yayınlanmış 86 vakanın literatür incelemesini içermektedir. Araştırmacılar hastalığı klinik olarak "Plasentanın doğumdan 60 dakika sonra kendiliğinden ayrılma olmaksızın uterus duvarına tamamen veya kısmen anormal adhezyonu" şeklinde tanımlamışlardır. Histolojik olarak ise "villus ve miyometriyum arasındaki desidua bazalisin tamamen veya kısmen yokluğu " olarak belirtmişlerdir (Irving ve Hertig 1937). Ancak günümüzde araştırmacılar hastalık üzerine daha ayrıntılı ek klinik kriterlere odaklanmaktadırlar. 1966 yılında PAS, anormal plasentasyon bozukluklarının bir spektrumu olarak yeniden tanımlanmıştır. Bu tanım kapsamında patologlar, plasental villusların miyometriyuma kadar ilerlemiş olma durumunu plasenta akreta olarak sınıflandırmışlardır. Plasenta Akreata'da plasenta invaziv kabul edilmez, yalnızca adherent olarak betimlenir. Sınıflandırılan bir sonraki aşamada ise villusun miyometriyumu invaze olduğu ve uterus serozasına kadar ilerlediği görülür. İnvaziv olarak kabul edilen bu aşama Plasenta İnkreata'dır. Son olarak invaziv villusların uterus serozasına ulaştığı ve hatta çevre doku, damar ve organlara ulaşabildiği plasentasyon anomalisi Perkreta olarak tanımlanmıştır. Ayrıca aynı çalışma grubu, alınan tek bir örnekte Plasenta Akreata Spektrumunun (PAS) farklı derecelerinin bir arada bulunabileceğini göstermişlerdir. Bu da Akreta alanının fokal ya da diffüz olabileceği anlamına gelmektedir (Luke ve ark. 1966). Araştırmacıların 1966 yılında yaptıkları sınıflandırma günümüzde de geçerliliğini korumaktadır.



Şekil 2.8. Placenta Akreata Spektrumu (PAS)'nın aşamaları. Placenta normal şartlarda desidualize endometriyuma tutunur, miyometriyuma kadar ilerlemez. Ancak PAS'ın belirleyici özelliği bu desidual tabakanın kaybıdır çünkü plasental villuslar desidua'yı aşır ve miyometriyuma invaze olur ve aradaki sınır belirsizleşir. PAS, uterus duvarının bozulma derecesine göre derecelendirilir. Derece 1'de (Akreata), uterus duvarında büyük bir incelme olmaz. Adherent olarak değerlendirilir ve noninvazivdir. Derece 2'de (İnkreata), plasentanın yerleştiği uterus duvarının incelmesi görülür ancak normal uterus duvarına kıyasla duvar kalınlığının en az %25'i korunur. Derece 3A'da, plasentanın yerleştiği uterus duvarının incelmesi görülür ve normal uterus duvarına kıyasla duvar kalınlığının %25'inden daha azı korunmaktadır. Derece 3D uterus serozasının da invaze edildiğini gösterir. Derece 3E, ekstrauterin yapılara invazyonu göstermektedir. Derece 2-3 sıklıkla sezaryen skarı varlığında ortaya çıkar. Placenta skar izine tutunmuş olabilir (B), ancak patolojik PAS tanısı için miyometrial invazyon gösteren alanlardan histopatolojik tanı için kesit alınması gerekir (Hecht ve ark. 2020).

Patolojik çalışmalara göre 2018 yılında Akreata görülme oranı tüm PAS vakaları içinde 69.5% iken diğer invaziv tiplerin oranı 30.5% olarak hesaplanmıştır. Fakat sezaryenin primer risk faktörü olduğu düşünülen PAS'ta invaziv formların insidansı son 20 yılda belirgin şekilde artmıştır (Jauniaux ve ark. 2019) ve yıllar geçtikçe artmaya devam edecektir.

2.2.1. Risk Faktörleri

Skar oluşumu

Onlarca yıl PAS'ın plasental trofoblastların anormal davranışından dolayı ortaya çıktığı savunulmuştur. Buna karşın özellikle son dönemlerde birçok araştırmacı özellikle inkreata ve perkreatanın uterus duvarındaki ekstrasvillöz trofoblastın daha invaziv karakterde olmasından kaynaklanmadığını savunmaktadır. Bunun yerine koryonik villusun bir skar yapısı nedeniyle uterus duvarının daha derinlerine ulaşabildiğini ve böylece ekstrasvillöz trofoblastların derin miyometriyuma invaze olmasına neden olduğunu düşünmektedirler (Timor-Tritsch ve ark. 2019, Einerson ve ark. 2020, Badr ve ark. 2020). Villöz dokunun

miyometrium içine penetrasyonunun derecesinin desidual-miyometriyal hasarın derecesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Uterusta tüm katmanları kapsayan bir cerrahi skar izinin, hem endometriyal re-epitelizasyonun olmaması hem de skar alanı çevresindeki vasküler yapının yeniden modellenmesinin olmaması ile ilişkili olduğu ve anormal derecede invaziv plasentasyona (increta/percreta) yol açabileceği bildirilmiştir (Morlando ve ark. 2020). Anormal trofoblast davranışı hipotezini şiddetli bir şekilde savunanların sayısı azımsanmayacak kadar fazla olsa da artan sezaryen oranı nedeniyle plasenta akreata spektrum sıklığının da dramatik şekilde arttığı göz önüne alındığında skar konusu PAS söz konusu olunca mutlaka değerlendirilmelidir.

Sezaryen skar gebeliği (CSP: Cesarean Scar Pregnancy), bir ektopik gebelik türü olarak düşünülmekle birlikte implantasyonun önceki skar izi üzerinde gerçekleşmesi durumu olarak özetlenebilir (Timor-Tritsch ve ark. 2019). CSP durumunda uterus rüptürü, aşırı kanama, doğurganlığın kaybı ve hatta maternal mortalite gibi önemli riskler ortaya çıkar. Ayrıca eğer gebelik 3. Trimestere kadar devam etse bile tüm vakalarda kan transfüzyonu, mesane hasarı ve aşırı kanamanın eşlik ettiği PAS gelişimi gözlenmektedir (Wang ve ark. 2018). Sezaryen skar gebeliği bulunan hastalarda PAS görülme insidansının 1:500 civarlarında olduğu tahmin edilmektedir (Panaitescu ve ark. 2021). Sezaryen skar gebeliği bulunan 52 adet hastayla yapılan bir meta-analiz, gebeliklerde %76 oranla 3. trimesteri tamamlandığını, 40 hastanın tümünde canlı doğum gerçekleştiği bildirilmiştir. Ancak canlı doğum gerçekleşen 40 hastanın %75'inde doğum sırasında anormal invaziv plasenta teşhisi konulmuş olup ve yarısından fazlası Perkrea derecesinde olduğu tespit edilmiştir. Vakaların %57'sine zorunlu olarak histerektomi uygulanmıştır, %5.8'inde ise uterus rüptürü olduğu görülmüştür (Cali ve ark. 2018). Bunun yanı sıra skar dolayısıyla desidua bazalis'e verilen hasarın, trofoblastik dokunun anormal invazyonunu çeşitli koşullar yoluyla etkileyebileceğini öne süren yayınlar bulunmaktadır. Örneğin; skar sebebiyle ortamda oluşan hipoksinin trofoblast invazyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir (Piñas Carrillo ve Chandharan 2019). 2010-2011 yılları arasında İngiltere'de PAS tanısı konan 134 kadın ve 256 kişilik kontrol grubuyla ulusal bir vaka kontrol çalışması yapılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre PAS insidansı ülke geneli 10.000 doğumda 1.7 olarak bulunmuştur. Ancak hem öncesinde sezaryen öyküsü bulunan hem de plasenta previa tanısı almış kadınlar incelendiğinde oran 10.000'de 577 olarak görülmüştür

(Fitzpatrick ve ark. 2012). Çalışmalar sezaryenin uterusu olan hasarı üzerinde odaklansa da aslında uterusu skar oluşturabilecek miyomektomi, küretaj veya in vitro fertilizasyon gibi birçok cerrahi müdahale PAS gelişiminde etkili olabilir. Cerrahi müdahaleler sebebiyle de PAS, 20. yüzyılın iyatrojenik hastalığı' olarak değerlendirilmektedir (Ali ve ark. 2021). Tüm bunlar göze alındığında ülkemiz gibi doğum artış hızı yüksek olan, sezaryen doğum oranı %50'nin üzerinde ve uterus cerrahisi sıklıkla uygulanan ülkelerde PAS hastalığı ve tedavisi ile ilgili çalışmaların artması son derece önemlidir.

Plasenta Previa

Plasenta Previa'nın uzun bir süre PAS tanısı için gerekli olduğu düşünülmüştür. Alt uterin segmentte ve servikte uterus duvarı incedir ve buna bağlı olarak desidualizasyon normal şartlarda oluşmaz. Araştırmacılar implantasyonun alt uterin segmente ya da servikte gerçekleşmesinin plasentanın daha fazla adhezyonuna yatkınlık oluşturabileceğini önermektedirler (Carusi 2018). Fitzpatrick ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ingiliz ulusal vaka kontrol çalışmasına göre 134 PAS tanılı hastanın 86'sında Plasenta Previa'nın patolojiye eşlik ettiği bildirilmiştir. Total hasta sayısına bakıldığında %65'lik bir dilime sahip olan bu oran oldukça yüksektir (Fitzpatrick ve ark. 2012). Amerika'da 2010-2019 yılları arasında histerektomi yapılmış PAS vakaları ile retrospektif bir kohort çalışması gerçekleştirilmiştir. Deneye dahil edilen 351 PAS vakasından 106'sında (%30) Previa gözlenmezken 251 vakada Plasenta Previa belirlenmiştir. Ayrıca, PAS (Previa -) grubundaki plasentaların yaklaşık yarısı invaziv derecede iken (inkreata veya perkreta), PAS (Previa +) grubunda PAS (Previa -) grubuna kıyasla daha yüksek oranda inkreata veya perkreta tanı olduğu bildirilmiştir (Carusi ve ark. 2020). Bir diğer retrospektif çalışma 2021 yılında Romanya'da tamamlanmıştır. Çalışmada 2017-2021 yılları arasında Filantropia Klinik Hastanesi'ne başvuran, PAS ve Previa tanısı almış 12 hasta incelenmiştir. Tüm hastalar plasenta previa ve sezaryen doğum gibi anormal derecede invaziv plasenta için önemli risk faktörlerine sahiptir. Doğumları planlı sezaryen ile gerçekleştirilen 12 hastadan 11 tanesine histerektomi uygulanırken sadece 1'inde (%8.33) uterus korunabilmiştir. Araştırmacılar cerrahi müdahale sırasındaki deneyimlerine dayanarak Previa'yı PAS için ciddi bir risk faktörü olarak değerlendirerek doğum sırasında mutlaka histerektomi yapılması gerektiğini savunmuşlardır (Varlas ve ark.

2021). Tüm bu çalışmalar Previa'nın PAS patolojisinin derecesini arttırdığı yönünde yorum yapmamıza olanak sağlayabilir.

In Vitro Fertilizasyon (IVF)

In vitro Fertilizasyon birçok plasental anomali için önemli bir risk faktörü olarak düşünülmektedir. Ancak özellikle son zamanlarda IVF gebeliği, PAS için bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. Embriyo transferi sırasında gerçekleştiği düşünülen bir takım cerrahi etmenler dolayısıyla bu anomalilerin ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Badr ve arkadaşları PAS gelişimini birçok risk faktörünü içeren bir araştırmayla mercek altına almışlardır. Yaptıkları araştırmada 1949–2019 yılları arasında çalışılmış 109 vaka raporu, 7 vaka serisi ve 1 retrospektif çalışmayı incelemişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre, 133 hastadan 9'u (%6,8) 1-10 kez IVF tedavisi geçirmiştir. (Badr ve ark. 2020). Esh-Broder ve arkadaşları ise yayınladıkları retrospektif çalışmada IVF gebeliği olan hastalar ile spontan gebeliği olan hastalarla karşılaştırmışlardır. Çalışmaya 2004-2009 yılları arasında IVF tedavisi gören 752 hasta dâhil edilmiştir. Karşılaştırma sonucunda IVF gebeliklerinde PAS gelişiminde 13 kat artış bulunmuştur (Esh-Broder ve ark. 2011). Benzer şekilde İngilterede yapılan ulusal bir çalışmada IVF ile gebe kalan kadınların da PAS geliştirme oranının arttığı bulunmuştur (Fitzpatrick ve ark. 2012). Kesin mekanizma açık değildir, hastalığın gelişiminde iyatrojenik ya da biyolojik faktörler rol oynuyor olabilir. Embriyo transferi sırasında endometriyal kavitede oluşan lokal travma, endometriyal skarlaşmaya ve plasentanın anormal şekilde myometriumu invaze ettiği defektlere neden olabilir (Shim ve ark. 2013). Özellikle Kriyoprezerve Embriyo Transferinin (KET) PAS için risk faktörü olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur (Kaser ve ark. 2015, Salmanian ve ark. 2020, Matsuzaki ve ark. 2021). Bunun yanı sıra ovaryum stimülasyon protokollerinin kullanımı sonucunda endometriumda ilgili genlerin ekspresyonunda değişim gerçekleşebilir. Böylece morfolojik değişikliklerin indüksiyonu PAS'a neden olabilir (Horcajadas ve ark. 2007). PAS için bir risk faktörü olarak in vitro fertilizasyonun rolünü araştıran çalışmalarda yakın zamanda ek bir mekanizma önerilmiştir. IVF ile oluşturulmuş implantasyon ve plasantasyon sırasındaki karakteristik bir hormonal ortamın trofoblast invazyonunu arttırarak PAS'a neden olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca anormal plasantasyon, embriyo implantasyonu sırasında yükselen

serum östrojen seviyelerinin etkisi olabilir ve aşırı trofoblastik invazyona yol açabilir. Son olarak desidualize bir endometriyum maternal serum estradiol seviyelerini yükseltmektedir. Ancak IVF'te değişen koşulların sonucuna bağlı olarak daha ince bir desidualize endometriyumun oluşumu serum estradiol seviyelerinin düşmesine neden olmaktadır. Araştırmacılara göre IVF'te gerçekleşen bu durum PAS'a yol açan anormal trofoblastik büyümeye neden olabilir (Morlando ve ark. 2020).

Son olarak 2022 yılında yayınlanmış güncel bir makalede Endometriozis ile PAS arasındaki ilişkiyi mercek altına almıştır. Verilen bilgilere göre Endometriozisi olan hamile kadınların IVF ile gebe kalmış olma olasılığının daha yüksek olduğu bilinmektedir (Matsuzaki ve ark. 2022). Sonuç olarak IVF artan PAS prevalansı ile ilişkilidir (Matsuzaki ve ark. 2021). Ayrıca, son sistematik incelemeler endometriozisi olan kadınların endometriozisi olmayanlara göre plasenta previaya sahip olma olasılığının daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Plasenta Previa da PAS için en önemli risk faktörlerinden biridir. Bu nedenle, endometriozisi olan kadınların, endometriozisi olmayanlara göre daha yüksek bir PAS prevalansına sahip olmaları mümkündür (Matsuzaki ve ark. 2022).

Maternal Yaş

Hastalık epidemiyolojik olarak incelendiğinde hasta yaşlarının ortalaması 34 olarak bulunmuştur (Garmi ve Salim, 2012). 2003 ve 2012 yılları arasında, Avustralya'da doğum yapan 595.597 anneyi içeren popülasyon bazlı bir çalışma yürütülmüştür. Çalışmadaki 595.597 hastanın 865'ine PAS tanısı konulmuştur. Bu PAS'lı hastaların sadece %38'i ilk gebeliğinde PAS tanısı almıştır. Yapılan bu çalışmada PAS tanısı kadınların yaş ortalamasının daha yüksek olduğu ve daha yüksek sosyoekonomik duruma sahip oldukları tespit edilmiştir (20 yaş altı 23 hasta, 20-34 yaş arası 577 hasta, 35 yaş ve üstü 254 hasta). Araştırmacılar ayrıca, daha yüksek sosyoekonomik statüyü daha önce daha çok cerrahi müdahale geçirebilme imkânıyla bağımsız olarak ilişkilendirmişlerdir. Araştırmacılar PAS gebeliklerindeki doğumların daha erken gerçekleştiğini, yani gestasyonel yaşın daha kısa olduğunu ve istatistiksel olarak anlamlı olmasa da doğan bebeklerin gestasyonel yaşa göre daha düşük doğum ağırlığına sahip olduklarını belirtmişlerdir (Baldwin ve ark. 2018). 2021 yılında birçok çalışmanın incelendiği bir meta analiz yayınlanıp çalışmanın

sonuçlarına göre araştırmaya dâhil edilen hastaların %48.4'ü ileri yaştadır (Tinari ve ark. 2021).

PAS'ın risk faktörlerine dair araştırmalarda öncelikli olarak skar oluşumu, Plasenta Previa ve IVF gibi etkenler değerlendirilse de hemen hemen tüm çalışmalarda istatistiksel olarak maternal yaş da değerlendirmeye alınmaktadır. Direkt olarak bir etkisi olup olmadığı net değildir ancak yine de araştırmacılar tarafından göz ardı edilmemektedir.

2.2.2 Tanı

Plasenta Akreata Spektrumunda doğum öncesi konulan doğru tanı, sürecin anne ve bebek açısından minimum risk ile tamamlanmasında kritik önem taşır. Beklenen kan kaybını ve doğumun diğer olası komplikasyonlarını uygun şekilde öngören bir cerrahi plan yapma fırsatını verir. Ayrıca komplikasyonların önlenmesi, multidisipliner ve alanında deneyimli bir cerrahi ekibin varlığını gerektirdiğinden işlemin efektif olarak zamanlanmasına olanak tanır (Garmi ve Salim, 2012).

Ultrason Görüntüleme

Ultrason görüntüleme, PAS tanısını koymak ve klinik tedaviyi yönlendirmek için en çok tercih edilen tekniklerden birisidir. Genel olarak %91 oranında bildirilen duyarlılık ve %97 oranında bildirilen özgüllük ile PAS bozukluklarını teşhis etmede iyi bir seçenektir (D'antonio ve ark. 2018). Akreata gelişiminin ilk trimesterde dahi görülebileceği belirtilmektedir ancak ilk trimester ultrasonografinin prediktif gücü tartışmalıdır. Bu nedenle sonrasında da akreata gelişimi olduğu düşünülen hastalar detaylı takip altına alınmaktadırlar (Doulaveris ve ark. 2020; Garmi ve Salim, 2012). Comstock, histopatolojik olarak da PAS tanısı kesinleşmiş hastaların 10. haftaya kadar yapılmış ultrason görüntüleriyle retrospektif bir çalışma yapmıştır. Araştırmacılar, uterus skarına açık bir şekilde tutunmuş olan alçak yerleşimli gebelik keselerini ve normal gebeliklere kıyasla skar alanındaki daha ince miyometriyumunu net şekilde gözlemlemişlerdir (Comstock 2005). Bununla birlikte alçak yerleşimli gebelik kesesinin yani Plasenta previa'nın ilk trimesterde prenatal tanısı güvenilir değildir. Çünkü plasentanın önemli bir kısmı gebeliğin ikinci ve üçüncü trimesterinde serviksten uzaklaşacaktır. (D'antonio ve

ark. 2018). İkinci ve üçüncü trimesterin sonografik özellikleri arasında uterus duvarının devamlılığının kaybı, plasenta içinde çoklu düzensiz vasküler boşluklar (lakunalar), plasental implantasyon bölgesinde “İsviçre peyniri” görüntüsü ve plasenta ile miyometriyum arasında hipoekoik sınırın olmaması bulunur (Garmi ve Salim, 2012).

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI)

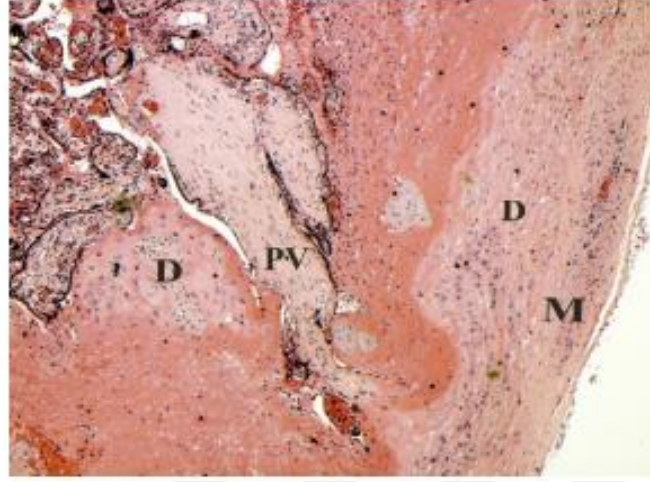
Ultrason, PAS bozukluklarını taramak için kullanılan birincil araçtır ancak ultrason değerlendirmesinin kesin olmadığı durumlarda tanıyı doğrulamak için Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) kullanılır (D’Antonio ve ark. 2018).

Tablo 2.1. Plasenta Akreata Spektrumu (PAS)’nın MRI bulguları (Srisajjakul ve ark. 2021).

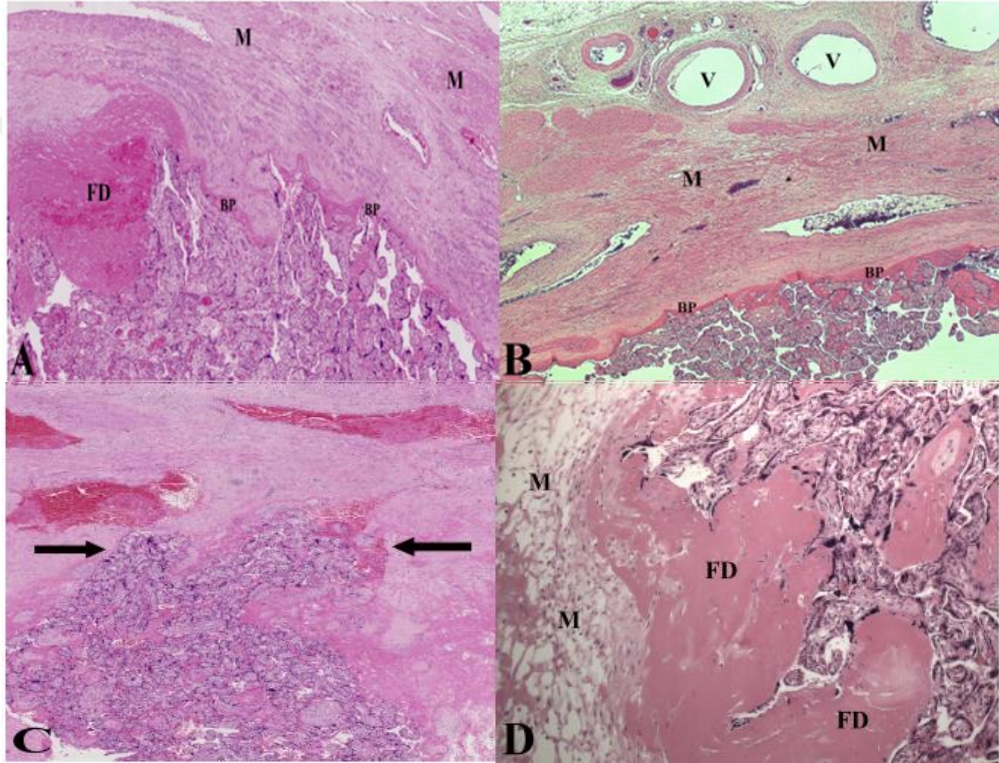
Plasenta Akreata ve İnkreata		Plasenta Perkreata	
Plasenta	Plasental-miyometriyal arayüz	Miyometriyum	Extrauterin İnvazyon
✓ Laküna varlığı ✓ Heterojen Plasental yapı ✓ Plasental çıkıntılar ✓ Anormal/deorganize plasental vaskülarite ✓ Yuvarlak plasental kenarlar ve şekil bozukluğu	✓ Plasental-miyometriyal arayüzdeki koyu renkli görüntünün incelenmesi ve kaybı	✓ Miyometriyumda incelme ✓ Miyometriyumda fokal bozulma	✓ Mesane ve diğer komşu yapılara invazyon ✓ Ekzofitik kitle varlığı

2.2.3 PAS’ın Histolojisi

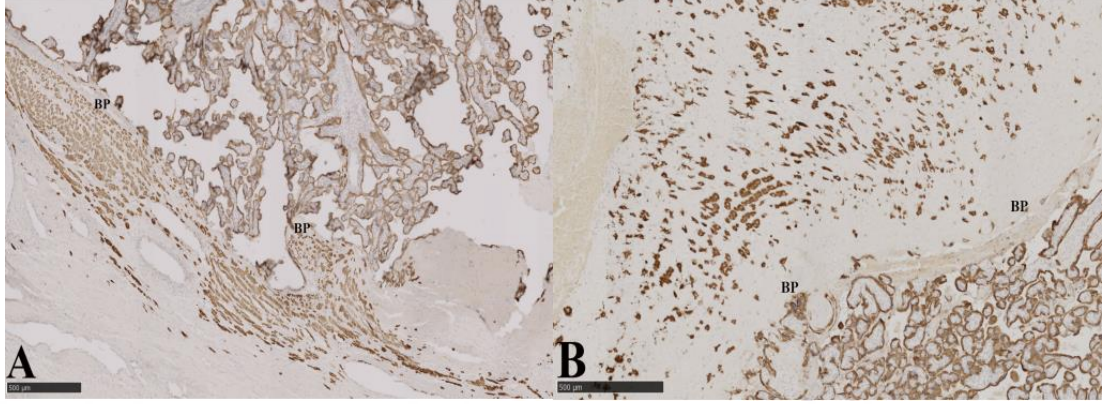
Plasenta Akreata Spektrumunun kesin tanısı genellikle doğum sonrası histerektomi örneklerindeki invazyon alanı incelenerek konulmaktadır. Koryonik villusların miyometriyum ile doğrudan temasta olduğu ve desiduanın yokluğu ya da kısmi varlığı net bir şekilde söylenebiliyorsa PAS doğrulanır (Garmi ve ark. 2012).



Şekil 2.9. 34 haftalık gebe bir Plasenta Previa İnkreta vakasının histerektomi örneğinin hematoksilen-eosin boyaması şekildeki gibidir. Desiduanın (D) plasental villuslar tarafından bozunumu ve miyometriyumun oldukça ince olduğu görülmektedir. PAS'ın en belirgin özelliği, villusların miyometriyum ile direkt temas halinde olmalarıdır (Jauniaux ve ark. 2018).



Şekil 2.10. Plasenta Akreata Spektrumu örneklerinde gözlenen spesifik özelliklerin Hematoksilen-eosin boyama ile incelenmesi. A ve B: PAS'ta desidua sınırları net şekilde belirlenemez, plasental villus direkt olarak bazal plaka ile temastadır. Miyometriyumun miyofiber düzensizliğine ve büyük damarlara (V) dikkat edilmelidir. İnvaziv villüslerle çevrili dalgali bazal plak (BP) ve çevresinde kalın fibrin birikimi görülmektedir. C: Plasental villuslar uterus duvarının derinlerine doğru ilerlemektedirler (Oklar). D: Fibrin birikimi (FD: Fibrin Deposition) invaziv villus ve ödemli miyometriyumu birbirinden ayırmaktadır (Jauniaux ve ark. 2020).



Şekil 2.11. Bazal Plakağı geçerek invaze olan ekstravillöz trofoblast hücrelerinin Sitokeratin 7 boyanması görülmektedir. A’da EVT’ler birleşerek bir tabaka gibi düzenlenmişlerdir. B’de ise EVT’ler bazal plakadan çok daha derine doğru invaze olmuşlardır (Jauniaux ve ark. 2020).

2.2.4 Biyobelirteç Çalışmaları

PAS tanısı için kullanılan teknikler yıllar içinde oldukça gelişmiştir. Bununla birlikte, birçok başka hastalıkta da olduğu gibi zahmetli ve zaman alacak tekniklerin yanı sıra özellikle de kandan kolayca incelenebilecek belirteç arayışı PAS için de sürmektedir. Bu belirteçler aynı zamanda tanıyı güçlendirmek için oldukça önemlidir. Bu doğrultuda ilk akla gelen, diğer plasental anomaliler için tanımlanmış belirteçlerin PAS için de incelenmesi olmuştur. Bu araştırmalara göre rutin plasental biyobelirteçlerinin anormal sonuçları PAS riskini arttırmaktadır.

Anöploidi taramasında rutin olarak kullanılan birkaç plasental ve fetal molekülün PAS’lı kadınların serumunda farklı şekilde eksprese edildiği bulunmuştur. Gebelikle ilişkili Plazma Protein A (PAPP-A), Alfa-fetoprotein ve hCG (İnsan Koryonik Gonadotropin) gibi moleküller en çok çalışılan belirteçlerdir ve maternal serumdaki yüksek seviyelerinin artan PAS riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Cahill ve ark. 2018; Garini ve ark. 2012; Zelop ve ark. 1992). Yakın zamanlarda ise PAS’ın teşhisi için cell-free fetal DNA’nın (cffDNA) ve cell-free plasental mRNA’nın rolüne dair ilgi oldukça artmıştır (Cahill ve ark. 2018; Bartels ve ark. 2018).

Gebelikle ilişkili Plazma Protein A (PAPP-A), plasental sinsisyotrofoblastların bir belirteçidir ve azalmış serum seviyelerinin erken plasental disfonksiyon için bir belirteç olabileceği bildirilmiştir. Düşük PAPP-A seviyeleri Preeklamps, IUGR ve gebelik kaybı ile ilişkilendirilmiştir. Bilindiği üzere tüm bu hastalıklar anormal trofoblastik invazyon ve plasental gelişim ile bağlantılıdır. Ek olarak birinci trimester PAPP-A düzeylerinin PAS ile ilişkili olduğunu gösteren çok fazla yayın bulunmaktadır (Desai ve ark. 2014, Bartels ve ark. 2018, Wang ve ark. 2021). Wang ve arkadaşlarının yaptığı güncel bir retrospektif çalışmada 35 Plasenta Previa (+PAS), 30 Plasenta Previa (-PAS) ve 112 kontrol olmak üzere 177 hasta arasında serum PAPP-A seviyeleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda araştırmacılar, Plasenta Previa (+PAS) grubunun serum PAPP-A seviyelerinin diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Wang ve ark. 2021). Bu veriler PAPP-A'nın PAS riskini belirlemedeki rolünü düşündürmektedir.

İnsan Koryonik Gonadotropini (hCG), sinsisyotrofoblastlar tarafından üretilen ve korpus luteum tarafından progesteron sentezini uyararak hamileliğin sürdürülmesini sağlayan bir glikoproteindir. hCG, bir alfa (α) alt biriminden ve bir beta (β) alt biriminden oluşan heterodimerik bir yapıdadır. Bu yapı makrofajlar tarafından proteolitik bölünmeye uğrarsa molekülün yapısı bozulur ve maternal dolaşıma salgılanan serbest β -hCG oluşmuş olur. Maternal serumda maksimum düzeye 8-10. gebelik haftalarında ulaşır ve plasental steroid sentezi başladıkça azalır. Korpus luteumun işlevini sürdürmesinin yanı sıra serbest β -hCG anjiyogenezi, sitotrofoblast farklılaşmasını ve immünosupresyonu destekler ve invaziv trofoblast hücrelerinin fagositozunu bloke eder. İlk trimesterdeki düşük serbest β -hCG seviyeleri düşük doğum ağırlığı ve artan spontan düşük riski ile ilişkilendirilmiştir. Fakat yüksek seviyeler herhangi bir olumsuz obstetrik sonuçla ilişkilendirilmemiştir. İkinci trimesterde ise düşük seviyelerin herhangi bir etkisi gözlenmezken, yüksek hCG gebelik yaşına göre büyük plasenta ve retroplasental hematomlar gibi komplikasyonlarla ilişkilendirilmiştir (Hung ve ark. 1999; Bartels ve ark. 2018). PAS hastalarının serumları alınarak yapılan hCG analizlerinde kontrollere kıyasla daha yüksek seviyelere rastlanmıştır (Büke ve ark. 2018; Dreux ve ark. 2012). Buna karşın Desai ve arkadaşlarının Plasenta Previa (PAS+) ve Plasenta Previa (PAS-) gruplarının serum biyobelirteçlerini karşılaştırdıkları çalışmada β -hCG bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır (Desai ve ark. 2014). Einerson ve arkadaşları ise hiperglikolize hCG'yi PAS hastaları ve kontroller

arasında karşılaştırmıştır. Sonuçlarında da, buldukları farkın hCG'yi tanı belirteci olarak kullanmak için yeterli olmayacak seviyelerde olduğunu belirtmişlerdir (Einerson ve ark. 2019).

Alfa-Fetoprotein (AFP), fetal gelişim sırasında yolk kesesi ve fetal karaciğer tarafından üretilir. AFP'nin yetişkin insanlardaki işlevi bilinmemektedir. Ancak ikinci trimesterdeki açıklanamayan yüksek maternal serum AFP seviyelerinin gebeliği olumsuz etkilediği bilinmektedir. Buna ek olarak PAS hastalarındaki AFP seviyelerine dair birçok çalışma yapılmıştır. Yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre ise AFP, PAS hastalarının serumunda anlamlı olarak daha yüksek seviyelerdedir. Bu yüzden PAS için bir biyobelirteç adayı olarak sıkça değerlendirilmektedir (Zelop ve ark. 1992; Kupfermanc ve ark. 1993; McDuffie ve ark. 1994).

Son olarak, cell-free fetal DNA'nın (cffDNA) ve cell-free plasental mRNA'nın rolüne dair ilgi son yıllarda yoğunlaşsa da henüz genel bir kanı oluşturacak kadar net bir sonuç yoktur. 1997 yılında maternal plazma ve serumda cell –free fetal DNA saptanmıştır (Lo ve ark. 1997). Çalışmanın sonucunda birçok hastalıkta bu fetal DNA'nın rolüne dair çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bunlardan biri olan PAS'ta şimdiye kadarki veriler birbirleriyle tutarlı değildir (Bartels ve ark. 2018).

Yukarıda bahsedilen tüm bu biyobelirteç adayları PAS'ın zayıf birer öngörücüsüdür ve klinik olarak yararlı olacak kadar spesifik değildirler.

2.2.5. Güncel Gelişmeler ve Moleküler Çalışmalar

İnsanlarda gebeliğinin erken dönemleri etik kaygılar sebebiyle tam olarak araştırılamamaktadır. Bu nedenle gebeliğin erken dönemindeki literatür bilgileri sınırlıdır. “Bebeğin eşi/ikizi” olarak tabir edilen plasentanın gelişimindeki bazı anormallikler de bazı insan etiği sınırlandırmaları sebebiyle gebeliğin başından itibaren takip edilememektedir. Bilim insanları bu durum karşısında, insan gebeliğini en iyi şekilde taklit edebilecek hayvan modellerini oluşturmaya çalışmışlardır. Bu şekilde benzer mekanizmalar yoluyla erken gebelik dönemlerinin anlaşılması sağlanmaktadır.

PAS hastalığında gerçekleşen aşırı trofoblast invazyonu, gebeliğin erken dönemlerinde ortaya çıkan ve 1. trimesterden itibaren takibi yapılabilen bir anomalidir. Hastalığa neden olan mekanizma henüz tam olarak açıklanmamıştır. Belirli risk faktörleri öne sürülse de tam olarak anlaşılabilmesi için hayvan modeline ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla, Burke ve arkadaşları PAS için bir hayvan modeli oluşturduklarını açıklamışlardır. Çalışma bir çeşit sezaryen ve kürtaj taklidini amaçlamaktadır. Araştırmacılar yeni doğum yapmış peripartum farelerin uterusuna çizik atarak sezaryen stimülasyonu gerçekleştirmişlerdir. Diğer yandan gebe olmayan dişi fare uteruslarına çizik atmışlar ve kürtaj olmuş ya da bir uterus cerrahisi geçirmiş olmalarını taklit etmişlerdir. Cerrahi sonrası farelerin iyileşmesi beklenmiştir ve ardından çiftleştirilmişlerdir. Farelere gebeliğinin 16. gününde ötenazi uygulanmış ve uterusları alınarak gerekli takip işlemleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan çeşitli boyanmaların sonucunda cerrahi olarak skar oluşturulmuş farelerde trofoblast hücresi invazyonunun sham grubuna göre daha derin (ileri) olduğu görülmüştür. Dolayısıyla araştırmacılar oluşturdukları cerrahi protokolün PAS oluşumunu fare modeli üzerinde gerçekleştirebildiğini savunmuşlardır (Burke ve ark. 2020). 2022 yılında yapılan bir çalışmada benzer bir cerrahi protokolü uygulayan araştırmacılar PAS için hayvan modeli oluşturulduğu ve bu modelde trofoblast hücrelerinin aşırı invazyonunu gösterebildiklerini bildirmişlerdir (Zhou ve ark. 2022). Bu çalışmalar aynı zamanda güçlü bir risk faktörü olan skar oluşumunu da doğrular niteliktedir.

İnvaziv karakter kazanan trofoblastların anormal davranışı birçok hücrel mekanizma yönünden incelenmektedir. Bunlardan bir tanesi –belki de en muhtemel olanı– trofoblastların bir kanser hücresi gibi saldırgan bir davranışa ve engellenemez bir motiliteye sahip olmalarıdır. Bu yüzden kanser hücreleri ve tümör gelişimiyle alakalı bazı mekanizmalar PAS gelişimi ve trofoblast hücreleri için de mercek altına alınmıştır.

Erken dönem gebeliğin belki de en çok merak süreçlerinden biri plasental villuslardaki sitotorofoblast (CTB) hücrelerinin invaziv EVT'lere dönüşüm sürecidir. Bilindiği kadarıyla CTB-EVT farklılaşması, kanser hücrelerinin de uğradığı bir Epitelyal-Mezenkimal Geçişin (EMT) sonucunda gerçekleşmektedir. Epitelyal- Mezenkimal geçiş sonrasındaki hücreler adhezyon ve invazyon özelliği kazanmaktadırlar. Günümüzde bu farklanmanın nasıl indüklendiği ve nasıl sona erdiği, hatta EVT invazyonunun desidua

sınırlarında hangi mekanizmayla durdurulduğu bilinmemektedir (Duzyj ve ark. 2015, Illsley ve ark. 2020). Bu konuyu açıklığı kavuşturmak için yapılan çalışmalardan birisi Duzyj ve arkadaşlarına aittir. Yaptıkları çalışmada PAS tanılı kadınların serumunda ve plasenta örneklerinde EMT’de rol oynadığı bilinen Epitelyal Kadherin (E-Cadherin) ‘in protein miktarını araştırmışlardır. E-Kadherindeki azalmanın epitelyalden mezenkimale geçişin işareti olduğu bilinmektedir. Araştırmacılar çalışma sonunda PAS hastası kadınların serum örneklerinde kontrole kıyasla herhangi bir değişim tespit etmemişlerdir. Aksine, yapılan histolojik boyamalara göre plasental-miyometriyal ara yüze daha yakın olan EVT, miyometriyumda daha derine invaze olmuş EVT’lerden daha az E-Kadherin immuno boyanmalar belirlemişlerdir. Ayrıca literatüre uygun olmamakla birlikte araştırmacılar invaziv EVT’lerde EMT’nin bir özelliği olan hem sitokeratin 7 hem de vimentin boyanması gözlemlendiğini tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda araştırmacılar, E-Kadherinin trofoblastların EMT mekanizmasını düzenleyebileceği sonucunu önermişlerdir (Duzyj ve ark. 2015).

Yapılan başka bir çalışmada araştırmacılar trofoblastların EMT mekanizmasını daha ayrıntılı incelemişlerdir. Anormal invaze olmuş bir plasantanın EMT sürecindeki gen ekspresyon değişimlerinden kaynaklandığı hipotezini araştırmışlardır. Çalışmada 1. trimester ve 3. trimester normal gebeliklerden izole edilen CTB’ler ve EVT’ler, EMT geçişinde fonksiyonel olan 84 genin ekspresyonu bakımından karşılaştırılmışlardır. Araştırmacılar böylece CTB ve EVT arasında gerçekleşen bu sürecin EMT ile ilişkili genler aracılığıyla olduğunu doğrulamışlardır. Sonrasında araştırmacılar Plasenta Previa vakalarından izole edilen 3. trimester CTB ve EVT’ler ile PAS (PAS+ Plasenta Previa) vakalarından izole edilen 3. trimester CTB ve EVT’leri gen ekspresyonları bakımından karşılaştırmışlardır. Her iki grubun CTB’leri arasında anlamlı gen ekspresyon farklılıkları bulunmazken EVT’leri arasında birçok fark bulunmuştur. Bunlardan en önemlileri ise CDH1 ekspresyon azalması ve MMP2, TGFβ2 ve ZEB2 ekspresyonlarındaki artışlardır. Araştırmacıların yorumlarına göre PAS vakalarının EVT’leri kontrollere göre daha fazla mezenkimal bir karakter göstermektedir (Illsley ve ark. 2020).

PAS’ın tümör oluşum mekanizmasına benzerliğinden yola çıkılarak yapılan bir başka çalışmada McNally ve arkadaşlarına aittir. PAS vakalarının CTB’lerinin global gen

ekspresyon patternlerini incelemişlerdir. Çalışmada PAS vakalarının CTB hücreleri, kontrol olarak erken doğum gebeliklerinden elde edilen normal invazyona sahip hücrelerle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak birçok gen ve biyobelirtecini PAS'ta ekspresyon farklılıkları gösterdiği tespit edilmiştir. En yüksek düzeyde upregüle olan molekülün DOCK4'ü kodlayan mRNA olduğu belirlenmiştir. DOCK4, guanin nükleotid değişim faktörü olarak görev almaktadır ve mutasyonları kanser hücresi invazyonunu ve anjiyogenezi teşvik etmektedir. Araştırmacılar DOCK4'ün aşırı ekspresyonunun, PAS fenotipi ile tutarlı olarak CTB invazivliğini arttırdığını belirtmekle birlikte PAS CTB'lerinin, kanser benzeri bir proinvazyon mekanizmasını upregüle ettiğini belirtmişlerdir (McNally ve ark. 2020). Bu tür yayınlar hem kanser hem de PAS olmak üzere iki patolojide de moleküler ve fenotipik benzerlikler olduğunu düşündürmektedir.

Kanser mekanizmasına benzerlik konusu içinde çalışılan bir diğer olgu ise hücre adhezyon molekülleridir. Hücre motilitesi ve invazyonu üzerinde direkt olarak görevli olan adhezyon moleküllerinden olan integrinler, hemen hemen tüm kanser türlerinde çalışılmıştır. PAS'ın kansere benzerliğinden dolayı da integrinlerin trofoblast invazivliği üzerindeki etkisi yeni bir çalışma sorusu haline gelmiştir.

İnsanlarda ve farelerde plasentanın yapısında farklılıklar olsa da fare modellerinin kullanımı trofoblast migrasyonunu kontrol eden mekanizmaların anlaşılması açısından son yıllarda oldukça önemli ilerlemeler sağlamıştır. Yapılan bir fare çalışmasında normal insan dokularında yaygın olarak eksprese edilen ancak karsinomlarda downregüle edilen bir tümör supresör olan MARVELD1 incelenmiştir. MARVELD1 hücre migrasyonunu baskılayan nükleer bir proteindir ve integrinleri düzenleyerek hücre adhezyonunu ve migrasyonunu regüle ettiği bilinmektedir. MARVELD1 knockout edildikten sonra gebelik gerçekleştirilen dişi farelerin %45.95'inde ilginç bir şekilde PAS fenotipi gözlenmiştir. Yapılan immünohistokimyasal boyamalarda kontrole kıyasla desiduaya trofoblast hücre invazyonunda 3.83 kat artış tespit edilmiştir. Bulunan anlamlı sonuçlar sonucunda bir EVT hücre hattı olan HTR8/SVneo hücre hattı ile in vitro model oluşturulmuştur. Hücre hattında MARVELD1'in susturulması gerçekleştirildiğinde integrin $\beta 4$ 'ün mRNA ekspresyonunda da bir azalma gerçekleştiği belirlenmiştir. Araştırmacılar sonuç olarak MARVELD1'in baskılanmasının integrin $\beta 4$ ekspresyonunu

azaltarak trofoblast hücre invazyonunun artmasına neden olduğunu savunmaktadır. Ayrıca invazyon sürecinin EMT sürecine benzerliği düşünülerek EMT belirteçleri de test edilmiştir. İncelenen belirteçlerden E-Kadherinin ekspresyonu, invaziv karakter arttıkça azalmıştır (Chen ve ark. 2018). Bu sonuçlar Duzyj ve arkadaşlarının çalışmasının sonucunu desteklemektedir (Duzyj ve ark. 2015).

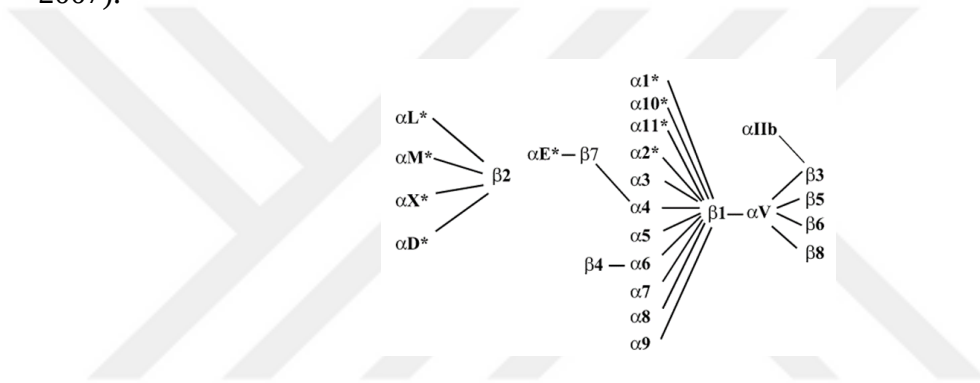
Bu tezde yer alan integrinlerden biri olan $\alpha V\beta 3$ integrin, kanser gibi birçok invaziv patolojik hastalıkta rol alan merkezi bir adezyon molekülüdür ancak PAS ile ilgili veriler oldukça eksiktir. Öyle ki, PAS için hali hazırda yalnızca bir çalışma mevcuttur.

2021 yılına ait güncel bir çalışmada $\alpha V\beta 3$ integrinin ekspresyon düzeyleri Western Blot ve İmmünohistokimya teknikleri ile analiz edilmiş ve kontrollerle kıyaslanmıştır. Çalışmaya Placenta Percreata tanısı almış 10 kadın ve normal gebelik geçirmiş 10 kadından oluşan kontrol grubu dâhil edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre PAS hastalarının EVT hücreleri kontrol grubuna göre $\alpha V\beta 3$ integrin bakımından artış olduğu tespit edilmiştir (Weitzner ve ark. 2021).

2.3. İntegrinler

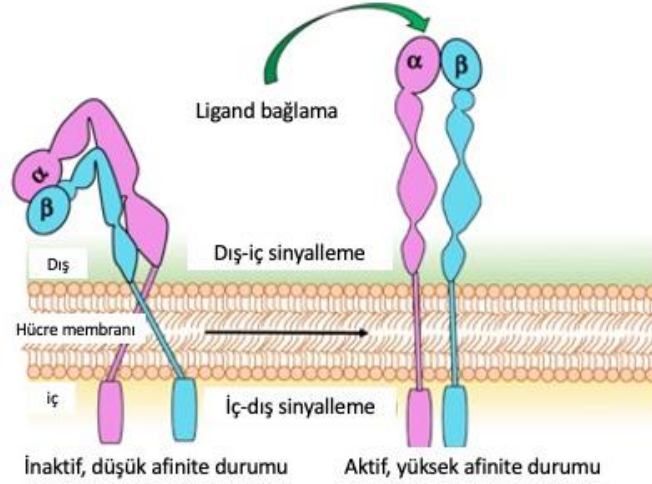
İntegrinler hemostaz, immün cevap, hücre gelişim ve kanser gibi birçok biyolojik süreçte önemli rolleri olan hücre adhezyon molekülüdür. Adhezyon, integrinler aracılığıyla içten dışa ve dıştan içe sinyalizasyon olarak adlandırılan bir süreç aracılığıyla dinamik olarak düzenlenir. Bu süreçte özellikle sekonder lipid habercilerin salınması, protein kinazların aktivasyonu, hücre içi pH ve Ca^{2+} değişimi gibi süreçlerin aktivasyonu gerçekleşir. Bu değişiklikler ekstraselüler matriks aracılığıyla hücre hareketinin düzenlenmesi için mekanik bir ilişki sağlamaktadır (LaFlamme ve Auer, 1996). Ayrıca sinyal regülasyonunda talinler, kindlinler, filaminler, migfilin, FAK ve ILK (Integrin-Linked Kinase) gibi çeşitli moleküller rol oynamaktadır (Barczyk ve ark. 2010). Özellikle talinler, integrinlerin tartışmasız en önemli sitoplazmik bağlanma ortağı ve ilk karakterize edilmiş integrin aktivatörüdür. İntegrinler ve aktin hücre iskeleti arasında doğrudan bir bağlantı sağlayarak adhezyon sürecini regüle ederler. (Tadokoro ve ark. 2003).

İntegrin adhezyon reseptörleri α ve β heterodimerlerinden oluşmaktadır. Ekstraselüler matriksteki kollajen, fibronektin, laminin gibi ligandlar ve sinyal molekülleri ile intraselüler hücre iskeleti bileşenlerini bağlayarak ekstraselüler ve intraselüler alanları birleştirirler. Böylece sinyalleri plazma membranından çift yönlü olarak iletirler. Hücre-hücre, hücre-ekstraselüler matriks ve hücre-patojen etkileşimlerine aracılık etmektedirler. İntegrinler tüm çekirdekli hücrelerde bulunurlar. Omurgalılarda bulunan integrinlerde 18- α ve 8- β alt birim bulunmaktadır. Kombinasyon halinde ise 24 farklı heterodimer oluştururlar (Weitzner ve ark. 2021, Chen ve ark. 2018, Fu ve ark. 2012, Takada ve ark. 2007).



Şekil 2.12. Omurgalı integrin reseptör ailesi şekilde özetlenmiştir. (Fu ve ark. 2012).

Çoğu integrin reseptörünün karakteristik özelliği çok çeşitli ligandları bağlayabilmeleridir. Aynı zamanda birçok ekstraselüler matriks proteini ve hücre yüzey adhezyon proteini de birbirinden farklı integrin reseptörlerine bağlanabilir (Campbell ve ark. 2011). **Şekil 2.12.**'de de görüldüğü üzere integrin alt birimlerinin bu kadar çeşitli olması ligand tanıma, hücre iskeleti bileşenlerine bağlanma ve sinyal yollarına bağlanmadaki çeşitliliği sağlar. Ara filamentlere bağlantı yapan $\alpha 6\beta 4$ dışında tüm integrinler hücre iskeletinin aktin filamentlerine bağlanmaktadır (Nievers ve ark. 1999).



Şekil 2.13. İntegrinlerin yapısı (Mezu-Ndubuisi ve ark. 2021).

α ve β integrin alt birimleri yapısal olarak tip 1 transmembran proteinleridir. Her alt birim büyük bir ekstraselüler kısım, bir transmembran sarmal ve 750 aminoasitlik kısa bir sitoplazmik kuyruktan oluşur. Hücre dışı bölge ekstraselüler matriks ligandları ile etkileşime girer. Sitoplazmik alan ise ekstraselüler kısma göre daha kısadır, hücre iskeleti ve sinyal proteinleri ile etkileşimlere aracılık eder (Gille ve ark. 1996).

İntegrinlerin aktivasyonu, hücre içi veya hücre dışı uyaranlara yanıt olarak yani ligand bağlanması veya sitoplazmik alanlardaki değişiklikler sonucunda meydana gelir. Hücreler sürekli olarak perisellüler ortamlarını örnekleyerek ve konumlarını, farklılaşma durumlarını hızla değiştirerek cevap oluştururlar. Dolayısıyla adhezyon oldukça dinamiktir ve bu nedenle oldukça duyarlı bir reseptör aktivasyon mekanizması gereklidir (Campbell ve ark. 2011). Sinyal mekanizmaları, integrinler enzimatik aktiviteye sahip olmadığı için sinyal komplekslerinin plazma membranının sitoplazmik yüzünde toplanmasıyla indüklenir (Gille ve ark. 1996).

Bu komplekslerin oluşumu iki şekilde sağlanır;

- 1- Moleküler etkileşimlerin aviditesini arttıran ve böylece de efektör moleküllerin bağlanma oranını arttıran reseptör kümelenmesiyle,

- 2- Efektör bağlanma bölgelerini oluşturan reseptörlerde konformasyonel değişikliklerin indüklenmesiyle. (Sanchez-Mateos ve ark. 1996, Fernandez ve ark. 1998, Campbell ve ark. 2011).

Mevcut kanıtlar, konformasyonel değişikliklerin integrinlerin afinite düzenlemesinin ilk aşaması olduğunu göstermektedir. Integrinlerin aktivasyonu, integrin yapısının uzaması ve transmembran sarmalın ayrılması ile sonuçlanır. **Şekil 2.13.**'de de görüldüğü gibi hücrelerdeki "bükülmüş" konformasyonda bulunan integrinler düşük affiniteye sahip durumdadır (Kadry ve ark. 2020). Çeşitli araştırmalar sonucunda bükülmüş bir konformasyondaki integrinin, ligand bağlama bölgesini hücre yüzeyine yaklaşık 5 nm yaklaştırdığı belirlenmiştir. Böylece α ve β alt birimlerinin merkezindeki bu kapalı durum düşük ligand bağlama afinitesine sebep olur. Bununla birlikte, konformasyon açıkken her iki alt birim de ligand için yüksek afiniteye sahiptir (Mezu-Ndubuisi ve ark. 2021).

Matriks proteinleri ilk tanımlanan integrin ligandlarıdır ve fibronektin reseptörü olan integrin $\alpha 5 \beta 1$, integrin ailesinin ilk tanımlanan matrikse özgü reseptörüdür. Fibronektin ve polipeptit fragmanlarının belirli alanlarının karşılaştırmalı analizi, $\alpha 5 \beta 1$ ile bağlanması için gerekli olan "anahtar" ligand bölgesini ortaya çıkarmıştır. Bu alan, Arg-Gly-Asp tripeptit (RGD peptit) olarak tanımlanmıştır. Daha sonrasında ise birçok integrinin ligandlarını RGD bölgeleriyle bağlandığı gösterilmiştir. Günümüzde matriks proteinlerinde RGD bölgesinin yanı sıra belirli integrinlerle bağlanmadan sorumlu DGEA, EILDV, KQAGDV gibi başka oligopeptit bölgelerinin varlığı bilinmektedir (Berman ve ark. 2003). Örneğin, kollajen bağlayıcı integrinler ($\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 10 \beta 1$ ve $\alpha 11 \beta 1$) "G-F-O-G-E-R" motifini tanımaktadır (Kadry ve ark. 2020). Güncel bilgilerimize göre yalnızca bir integrin alt kümesi (24'ten 8'i) doğal ligandlardaki RGD bağlanma dizisini tanır. Kollajen ve belirli laminin izoformları gibi bazı ekstraselüler matriks moleküllerinde bulunan bu RGD dizileri denatürasyon veya proteolitik bölünme sonucunda açığa çıkar. Hücreler bazı integrin tipleri gibi RGD-bağlayıcı reseptörleri kullanarak ligandları bağlarlar (Barczyk ve ark. 2010). Ligand spesifikliği ile ilgili gruplama yapmak gerekirse memeli integrinleri,

- 1- Laminin bağlayıcı integrinler ($\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 1$, $\alpha 7 \beta 1$ ve $\alpha 6 \beta 4$),
- 2- Kollajen bağlayıcı integrinler ($\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 10 \beta 1$, $\alpha 11 \beta 1$)

- 3- Lökosit integrinleri (α L β 2, α M β 2, α X β 2 ve α D β 2)
- 4- RGD-bağlayıcı integrinler (α 5 β 1, α V β 1, α V β 3, α V β 5, α V β 6, α V β 8 ve α IIb β 3).
- 5- Bireysel integrinler (Benzersiz ligand özelliklerine sahiptirler.)

Şeklinde sınıflandırılabilir (Takada ve ark. 2007).

2.3.1 İntegrin α V β 3

Uterus boyunca gerçekleşen trofoblast invazyonu plasentasyonun temel mekanizmasıdır. Başarılı bir gebelik için trofoblast hücrelerinin maternal desiduaya uygun şekilde invazyonu gereklidir. Sıkı bir şekilde kontrol edilen bu sürecin bozulması Düşük, Preeklampsi, IUGR (fetal gelişim kısıtlaması) ve PAS gibi gebelik komplikasyonlarına yol açabilir. İnvazyon süreci boyunca integrinler de birçok görev üstlenmiştir. Örneğin invazyon sürecinde integrin α 1 β 1 ve α 5 β 1'in upregüle, integrin α 6 β 4'ün downregüle olduğu bilinmektedir (Chen ve ark. 2018).

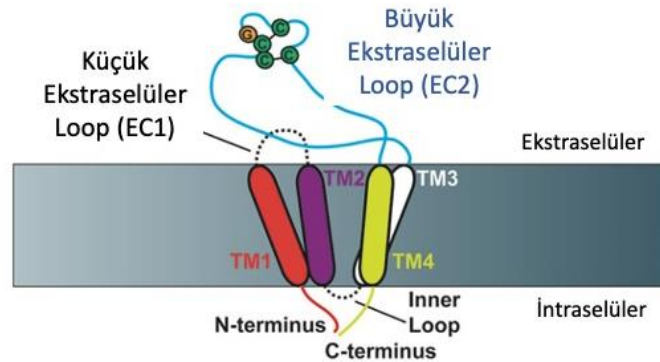
α v β 3 integrin, integrin reseptör ailesi arasında en çok çalışılan alt tiplerden biridir. Bazı ekstraselüler matriks proteinlerinin korunmuş Arg-Gly-Asp (RGD) dizilerini tanıyarak hücre adhezyonuna aracılık ederler (Sonnenberg 1993). Başlıca ligandlarından biri ekstraselüler matriks proteini olan Vitronektindir. α v β 3 integrin hücrelerin vitronektin'e adhezyonunu sağlamaktadır. Ayrıca fibronektin gibi diğer ekstraselüler matriks proteinleriyle de etkileşim kurabildiği bilinmektedir. Yayımlanan birçok çalışmada hücre migrasyonunu desteklediği ve hücre proliferasyonu ve farklılaşması arasındaki dengenin düzenlenmesinde anahtar sinyaller sağladığı gösterilmiştir (Horton 1997). İntegrin α v β 3, tümör gelişimini etkileyen rolleri nedeniyle kanser tedavisi için çekici bir terapötik hedef haline gelmiştir (Valdembri ve Serini 2021; Steiger ve ark. 2021; Desgrosellier ve ark. 2010, Carduner ve ark. 2014).

Gebeliğin başlangıcında integrin ekspresyonundaki değişiklikler implantasyon ve plasentasyon ile senkronize ilerler (Merviel ve ark. 2001). Endometriyumun luminal yüzeyindeki en iyi karakterize edilen hücre adezyon molekülü α v β 3 integrindir. Ligandı osteopontin (OPN), α v β 3 ile birlikte yüzeyde lokalize olarak bulunur. OPN ve α v β 3'ün ko-lokalizasyonunun endometriyum- embriyo iletişiminde rol oynayabileceği ve

invazyon öncesinde embriyonun apikal yüzeye adhezyonunu kolaylaştırabileceği belirtilmektedir (Lessey 2002). Buna paralel olarak Keramidas ve arkadaşlarının yayınladıkları 2014 tarihli yayında neovaskülarizasyon sırasında endotelial hücreler tarafından ve invazyon sırasında trofoblast hücreleri tarafından yüksek oranda $\alpha\beta 3$ integrin ekspresyonu tespit edilmiştir (Keramidas ve ark. 2014). Daha yakın bir tarihte ise Keramidas ve arkadaşlarının sonuçlarını doğrulayan bir çalışma yayınlanmıştır. PAS vakalarında $\alpha\beta 3$ integrin'in ekspresyon durumunu inceleyen araştırmacılar, Placenta Percreata vakalarındaki trofoblast hücrelerinin anormal invazyonunda $\alpha\beta 3$ integrin'in rolü olabileceği sonucuna ulaşmışlardır (Weitzner ve ark. 2021).

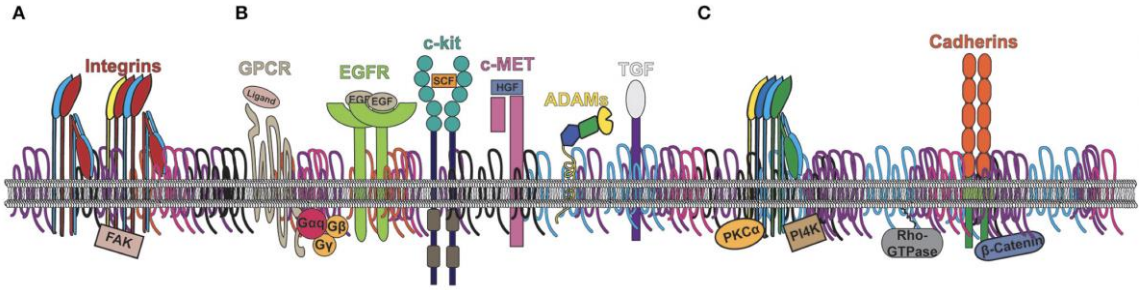
2.4. Tetraspaninler

Transmembran 4 süper ailesi (TM4SF) olarak da bilinen Tetraspaninler, çoğu ökaryotik organizmada bulunan evrimsel olarak korunmuş membran proteinleridir. Başlangıçta lökositlerin yüzeyinde tümör belirteçleri olarak keşfedilmişlerdir. Ancak daha sonrasında hemen hemen tüm hücre ve doku tipinin binlerce kopya tetraspanin içerdiği belirlenmiştir (Bassani ve Cingolani 2012). İnsan genomunda toplam 33 çeşit tetraspanin bulunur (Berditchevski ve Odintsova 2007). 4 transmembran alan (TM) bulundurulur. 20 – 28 amino asit içeren küçük bir ekstraselüler loop (EC1) ve 76 – 131 amino asit içeren büyük bir ekstraselüler loop (EC2) içerirler. Sitoplazmik N-terminal ve C-terminal kuyrukları 19 amino asitten daha kısadır (Boucheix ve Rubinstein 2001).



Şekil 2.14. Tetraspaninlerin Genel Yapısı (Termini ve Gillette 2017). EC2, sabit kısımlardan ve tetraspaninler arasında değişkenlik gösteren bir bölgeden oluşur. Değişken bölgede, her zaman bir CCG motifi ve molekül içi disülfid bağları (nuktalı çizgiler) oluşturan 2-6 ek sistein kalıntısı bulunur. (Bassani ve Cingolani 2012).

Tetraspaninler, hücre membranının ana düzenleyicileri olarak bilinirler (Lang ve Hochheimer 2020). Tetraspaninlerin en iyi bilinen özelliği, birbirleriyle ve diğer birçok hücre yüzey proteini ile etkileşime girme yetenekleridir. 'Tetraspanin ağı' olarak adlandırılan bir moleküler etkileşim ağı organize ederler (Rubinstein 2011). “Tetraspanin ağı” aynı zamanda birbirleriyle etkileşime giren tetraspaninlerin oluşturduğu alanları belirten “Tetraspanin ile zenginleştirilmiş mikro alanlar” (TEM’ler: Tetraspanin Enriched Microdomains) olarak da bilinir (Berditchevski ve Odintsova 2007). Birbirleriyle ve diğer proteinlerle etkileşime girerek integrinler, hücre yüzeyi reseptörleri ve sinyal molekülleri gibi çok çeşitli proteinleri regüle ederler. Böylece hücre adhezyonu, migrasyonu, proliferasyonu ve farklılaşması gibi çeşitli hücresel süreçlere katılırlar. Özellikle de hücre-hücre adhezyonu, hücre-ECM adhezyonu, hücre iskeleti yapısal değişimlerinin düzenlenmesi ve proteolitik ECM re-modellemesi gibi hücre migrasyonunu doğrudan etkileyen proteinlerin işlevini modüle ederler (Jiang ve ark. 2015).



Şekil 2.15. Tetraspanin ile zenginleştirilmiş mikroalanlar ve sinyal molekülleri şematize edilmiştir. Tetraspaninler tarafından modüle edilen anahtar sinyal molekülleri şunları içerir: (A) Adhesion Aracılı Sinyalleme (Integrinler/FAK), (B) Reseptör Aracılı Sinyalleme (GPCR'ler, EGFR, c-kit, c-Met, ADAM'ler, TGF) ve (C) Hücre içi sinyalleme (PKC, PI4K, Rho-GTPazlar ve β-katenin) (Termini ve Gillette 2017).

TEM'lerin oluşumu etkileşimler hiyerarşisi ile gerçekleşmektedir. İlk aşamada, bir tetraspanin ile spesifik bağlanma ortağı arasında oldukça kararlı etkileşimler gerçekleşir. İkincil etkileşimler daha zayıftır ve örnek olarak iki farklı tetraspanin arasında oluşan etkileşim örnek verilebilir. Bu etkileşimler muhtemelen ilk adımda oluşan kararlı kompleksleri daha büyük kümelerle çapraz bağlamaktadırlar. Son olarak tetraspaninlere bağlı palmitat zincirlerinin aracılık ettiği zayıf etkileşimler oluşur ve ağı daha da stabilize eder. Mikroskopik olarak incelendiğinde farklı tetraspaninler yaklaşık 100 nm'lik farklı nanokümeler oluşturur. Bu nanokümelerin birbirleriyle etkileşerek çeşitli biyokimyasal

süreçleri yöneten Tetraspanin ağlarını oluşturdıkları düşünülmektedir (Stipp ve ark. 2003, Lang ve Hochheimer 2020).

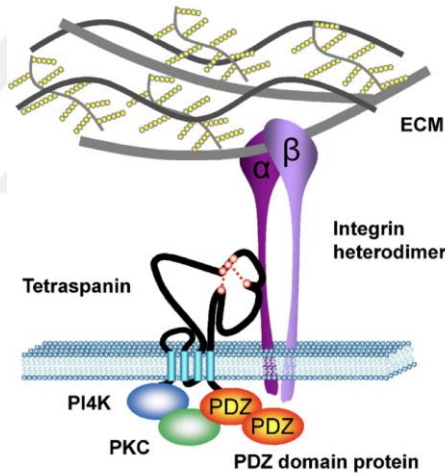
Tetraspaninlerin rol aldığı süreçlerde görev alan proteinler arasında kadherinler (hücre-hücre adhezyonu), integrinler (hücre-ekstraselülmatriks adhezyonu), Rac/Rho (hücre-iskelet düzenlenmesi) ve MMP'ler (periselüler proteoliz/proteolitik ekstraselülmatriks yeniden şekillenmesi) bulunur. Tetraspaninler ayrıca E-kadherin aracılı hücre-hücre bağlantılarında da rol oynar. Tetraspaninlerin İntegrinler ve MMP'ler ile birlikte çeşitli süreçlerde rol aldığını bildiren birçok çalışma bulunmaktadır (Jiang ve ark. 2015). Yara iyileşmesi, hücrelerin hareketsiz bir fenotipten göç eden bir fenotipe geçtiği ilginç bir hücre migrasyonu modelidir. Bu fenotip değişikliğinde tetraspanin- $\alpha 3\beta 1$ -integrin komplekslerinin görevli olduğu bilinmektedir. Ayrıca $\alpha 3\beta 1$ -integrin, tetraspaninler ve metalloproteinaz MMP-2 ve MMP-9 sekresyonu arasında doğrudan bir ilişki bildirilmiştir. İmmortalize keratinositlerde MMP-9 ekspresyonu için $\alpha 3\beta 1$ integrinin ekspresyonu gereklidir. Bunların yanı sıra, $\alpha 3\beta 1$ integrinin bağlanma bölgesini içeren bir trombospondin fragmanı anjiyogenezin indüksiyonu ile birlikte endotel hücrelerinde MMP-2 üretimine aracılık edebilir. Stromal hücreler tarafından eksprese edilen tetraspaninler CD9 ve CD81'in hematopoez sırasında adhezyonda görev aldığı bilinmektedir. Ayrıca farklı tetraspaninlerin T-hücreleri için uyarıcı moleküller olarak hareket ederek lenfosit aktivasyonunda görev aldığını bildiren yayınlar bulunmaktadır (Yáñez-Mó ve ark. 2001). Bunların yanı sıra dikkat çeken bir başka noktada ise, tetraspanin ekspresyonunun arttırılması veya baskılanması Rac/Rho aktivitesini düzenleyerek hücre motilitesini değiştirebilir. Örneğin 2009 yılında yapılan bir çalışmaya göre, epidermal karsinom hücrelerinde CD151'in susturulması aşırı RhoA aktivasyonuna ve de aktin düzenlenmesinin gerçekleşememesine yol açmaktadır. Bunun sonucunda ise destabilize hücre-hücre etkileşimine bağlı olarak tümör hücreleri daha fazla migrasyon gerçekleştiriler (Johnson ve ark. 2009).

Kanser, immün regülasyon ve inflamasyonla ilgili oldukları için terapötik uygulamalarda tetraspaninlerin kullanımı dikkat çekmektedir. Çoğu terapötik yaklaşım, büyük ekstraselüler loop'u (EC2) bir antikör veya başka bir bağlayıcı molekül ile hedeflemeyi amaçlar. Amaç EC2 aracılığıyla tetraspaninin uyarılması veya işlevsiz hale getirilmesidir.

EC2'nin hücre dışı lokalizasyonu göz önüne alındığında terapötik ajanın hücreye girmesine de gerek yoktur. Güncel olarak, anti-CD37 antikorunun tekrarlayan/dirençli kronik lenfositik lösemi tedavisi için klinik deneylerde test edildiği bilinmektedir (Lang ve Hochheimer 2020).

2.5. Tetraspanin-İntegrin İlişkisi

Birçok çalışma, tetraspaninlerin integrin aracılı adhezyona bağlı sinyallemedeki rolüne dair çeşitli kanıtlar sağlamıştır. Tetraspanin-İntegrin ilişkisine dair ilk çalışmalardan olan CD9'un uyarılmış trombositlerdeki $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin ile ilişkisini açıklayan yayından sonra (Slupsky ve ark. 1989) birçok farklı hücre tipinde çeşitli integrin-tetraspanin protein kompleksleri tanımlanmıştır.



Şekil 2.16. Tetraspanin-İntegrin Kompleksi (Bassani ve Cingolani, 2012).

Çeşitli tetraspaninlerin C-terminal kuyrukları, hücre içi PDZ proteinleri (Zardaki reseptör proteinlerinin hücre iskelet bileşenlerine sabitlenmesini sağlar) ile etkileşime girebilen sınıf I, II veya III PDZ alanı bağlama motiflerini barındırır. CD151 gibi birçok tetraspanin integrin heterodimerleriyle doğrudan etkileşime girer (Yauch ve ark. 2000). PDZ bölgesi bağlanma motifi bulunmayan bu tetraspaninler, PDZ bölgesinden bağımsız doğrudan protein-protein etkileşimi sağlarlar. Ancak CD9, CD63 gibi tetraspaninler PDZ proteinleri ile bağlantı kurabilirler. Örneğin CD9, sınıf III PDZ alan motifini barındırır. Diğer transmembran proteinleri ile kompleks bağlantılar kurup TEM bölgesi oluşturmanın yanı

sıra, birçok tetraspanin tip II fosfatidilinositol 4-kinazlar (PI4K) ve PKC gibi sinyal molekülleriyle etkileşime girer. Bu sinyal moleküllerini bağlayarak, bu sinyal moleküllerini hücre adezyon moleküllerine ve sinyal reseptörlerine getirebilir. Böylece biyokimyasal yolları organize edebilirler. Örneğin TEM'lerdeki PKC, integrinleri fosforile ederek hücre adezyonunu düzenleyebilirler (Zhang ve ark. 2001). Bu çoklu etkileşimler sayesinde tetraspaninler, birçok hücre tipinin adezyonu, morfolojisi, hareketliliği, proliferasyonu ve farklılaşması, tümör invazyonu, ekstraselüler matriks degradasyonu ve yeniden düzenlenmesi gibi hücre fizyolojisinin çeşitli yönlerinden düzenler (Berditchevski ve Odintsova 2007; Hemler, 2001, 2003, 2005; Levy ve ark. 2005; Yanez-Mo ve ark. 2011).

2.6. Tetraspanin CD9

Tetraspanin CD9'la ilgili olarak, spesifik anti-CD9 monoklonal antikörlerin kanser hücre dizilerinin migrasyonunu inhibe ettiği belirlenmiş ve motiliteyle ilişkisi ortaya konulmuştur (Ikeyama ve ark. 1993). Daha sonra, CD9'un $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ ve $\alpha IIb\beta 3$ gibi çeşitli integrinlerle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Böylece bu integrin komplekslerine yönelik bir modülatör işlev gösterdiği bildirilmiştir (Berditchevski, 2001). CD9'un integrin konformasyonunu ve aktivasyonunu FAK (Fokal Adezyon Kinaz)'ın fosforilasyonu, Fosfoinositid 3-kinazın aktivasyonu ve integrin sinyallemede kritik rol oynayan bir adaptör protein olan p130Cas'ın fosforilasyonu gibi integrin bağımlı yolları modüle ederek gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Aynı zamanda CD9 İmmünglobülin protein süper ailesi (EWI), EGFR ve Epitelyal diskoidin alan içeren reseptör 1 (DDR1) gibi başka transmembran proteinler aracılığıyla da integrin fonksiyonlarını düzenleyebilir (Downer ve ark. 2011). Örneğin CD9'un EWI proteinleri ile etkileşimleri, hücre migrasyonu sırasında plazma membranındaki integrinlerin TEM alanına kümelenmesini düzenlemektedir (Kolesnikova ve ark. 2004). CD9'un, EGFR'nin yüzey ekspresyonunu destabilize ettiği ve ligandla etkileşimini azalttığı düşünülmektedir. Bu nedenle, CD9'un EGF'e bağlı kemotaktik migrasyonu etkilemesi de muhtemeldir (Murayama ve ark. 2008). DDR1, kollajenler için bir tirozin kinaz reseptörüdür ve DDR1'in veya CD9'un baskılanmasının meme kanseri hücrelerinin kollajen üzerindeki migrasyonunu inhibe

ettiği gösterilmiştir (Castro-Sanchez ve ark. 2010). Ayrıca CD9'un ekstraselüler matriks proteinlerinden biri olan fibronektin ile doğrudan etkileştiği bildirilmiştir ve CD9 tetraspanini aşırı eksprese eden CHO (Çin-hamsteri ovaryumu) hücrelerinin haptotaktik migrasyonunun artması için CD9-fibronektin etkileşiminin gerekli olduğu öne sürülmüştür (Longhurst ve ark. 2002). Yapılan bir çalışmaya göre CD9'un ekspresyonunun azalması meme kanseri hücrelerinin fibronektine doğru $\alpha 5 \beta 1$ integrin aracılı migrasyonu artırır (Powner ve ark. 2011). Aynı zamanda hücre-hücre ve hücre-bazal membran etkileşim bölgelerinde yoğunlaştığı bilinen hücre iskeleti proteini olan talinler, integrinler ile kompleks oluşturarak adhezyon kompleksleri oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalara göre CD9, hücre adhezyonunun ilk aşamalarında integrin-talin1 ve integrin-talin2 kompleksleri arasındaki moleküler değişimi kontrol eden ve integrin bazlı adhezyon yapıları oluşturan yardımcı bir protein olarak işlev görür (Berdichevski ve Odintsova 1999).

Trofoblast hücrelerindeki CD9'un invazyona yönelik işlevleri ise özellikle de son yıllarda araştırılmıştır. Başlangıçta başlıca trombositlerin bir hücre yüzeyi belirteci olarak bilinen ve integrin fonksiyonunun bir düzenleyicisi olduğu anlaşılan CD9'un, EVT'lerde de eksprese edildiği bildirilmiştir. Araştırmalara göre, CD9'un gen düzeyindeki azalmanın EVT invazyonunu arttırmıştır (Fujiwara ve ark. 2018). Ayrıca başka bir çalışmada ekplant kültürden izole edilen EVT'ler çeşitli oksijen düzeylerinde HUVEC ile ko-kültür yapılmış olup anti CD9 antikorlarıyla muamele edilmiştir. Araştırmacıların sonuçlarına göre CD9, ortamdaki oksijen düzeyine ve endotel hücrelerinin etkisine bağlı olarak EVT'lerin invazyonunu azaltmaktadır (Matsumoto ve ark. 2016). Bir diğer çalışmada ise koryokarsinoma hücre hatları olan BeWo hücreleri üzerindeki CD9 fonksiyonu incelenmiştir. Kültür ortamında Anti-CD9 antikorlarıyla muamele edilen hücrelerin ekstraselüler matriks aracılı invazyonu, yapılan blokajın dozuna bağlı olarak artmıştır. Aynı çalışmada çeşitli integrin tipleri bloke edilerek monoklonal antikorlar kültür ortamına verildiğinde ise BeWo hücrelerinin invazyonu engellenmiştir (Hirano ve ark. 1999a).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney gruplarının oluşturulması

Çalışmaya 3 deney grubu dahil edilmiştir. Gruplar ve çalışmaya dahil edilme kriterleri Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışma grupları ve oluşturulma kriterleri

Kontrol Grubu (n=6)
Sağlıklı gebe kadınlardan doğumu takiben plasenta örnekleri alınmıştır. Hastaların tümü daha öncesinde hiçbir uterus cerrahisi geçirmeyen ve yalnızca normal doğum öyküsü bulunan hastalardır.
Sezaryen Grubu (n=6)
Gebe kadınlardan sezaryen doğumu takiben plasenta örnekleri alınmıştır. Grubu oluşturan kadınlar daha önce en az 1 kez sezaryen doğum geçirmiş çoklu sezaryen öyküsü bulunan kadınlardır.
PAS Grubu (n=6)
PAS tanısı konulmuş olan gebe kadınların doğumlarını takiben PAS derecelerine bağlı olarak plasenta ya da histerektomi materyali örneği alınmıştır. Akreata derecesinde bulunan hastalara histerektomi uygulanmamıştır ve tümünün plasenta örnekleri alınmıştır. İnkreta ve Perkreta derecelerindeki hastalara histerektomi uygulandığından uterus ve plasentadan örnekleme yapılmıştır. Hastalara doğum öncesinde ve doğum sırasında klinik olarak tanı konulmuştur. Sonrasında yapılan histopatolojik incelemeler ile tanı doğrulanmıştır.

Toplanan plasentaların hasta bilgileri Tablo 3.2’deki gibidir.

Tablo 3.2. Hasta Bilgileri (GDM: Gestasyonel Diabetes Mellitus, HBV: Hepatit B Virüs Taşıyıcısı, S.S.:Standart sapma)

	Kontrol Grubu (n=6) (Ortalama $\pm$ S.S.)	Sezaryen Grubu (n=6) (Ortalama $\pm$ S.S.)	PAS Grubu (n=6) (Ortalama $\pm$ S.S.)
Gebelik Haftası	40,3 $\pm$ 0,51	40	36 $\pm$ 1,2
Fetal ağırlık	3378,3 $\pm$ 683,3 gr	3290 $\pm$ 430,5 gr	2590,5 $\pm$ 184,1 gr
Bebek cinsiyeti %	%50 erkek %50 kız	%16,6 erkek % 83,4 kız	%33,4 erkek %66,6 kız
Anne yaşı	26 $\pm$ 3,4	33,3 $\pm$ 5,16	30,8 $\pm$ 4,1
Akraba Evliliği %	-	-	%16,6
Sezaryen doğum %	-	%100	%100
Sezaryen doğum sayısı	-	2,6 $\pm$ 0,81	3 $\pm$ 0,89
Ek tanı %	-	-	%83,3 Plasenta previa Totalis %16,6 GDM %16,6 Polihidramniyozis %16,6 HBV

3.2. Dokuların toplanması, takibi ve saklanması

Dokular buza alınarak steril koşullarda laboratuvara getirildi. Sonrasında Serum Fizyolojik ile doku üzerindeki fazla kan ve parçalar temizlendikten sonra Western Blot analizi için taze dokular kriyotüplere örneklendi. Kriyotüpler 1 gün -80°C’de bekletildikten sonra sıvı nitrojen tankına yerleştirildi. İmmünfloresan analiz ve Hematoksilen-Eosin boyamalar için rutin ışık mikroskopi rutin doku takibi yapıldı.

Doku Takibi Protokolü

- Dokular 1 gün boyunca %4'lük Formalinde çalkalayıcı üzerinde fiksede edildi.
- Sonraki gün akan suda 4 saat yıkanarak fiksatifin uzaklaşması sağlandı.
- Yıkama sonrası dehidrasyon işlemi için sırasıyla %70, %80 ve %90'lık artan alkol serilerinde 1'er gün bekletildikten sonra %100'lük alkolde 4 saat bekletildi.
- Sonrasında dokular şeffaflaştırma için sırasıyla Ksilol I, II ve III'e alınarak yaklaşık 3x2 dakika boyunca bekletilerek dokulardan alkol uzaklaştırıldı.
- Sonraki aşamada dokular parafine alınarak 3 defa 1'er saat 56 °C'ye ayarlanmış etüvde parafin serilerinden geçirildi. Böylece ksilolün dokulardan uzaklaşması sağlandı.
- En son basamakta ise dokular temiz parafin içine kesit düzlemine uygun şekilde gömüldü.

3.3. Hematoksilen-Eosin boyanması ve morfolojik analiz

Elde edilen parafin bloklardan plasental invazyonun gerçekleştiği ve diğer alanların belirlenmesi için Hematoksilen-Eosin boyama gerçekleştirildi.

3.3.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Protokolü

- Parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alınıp 1 gece boyunca 56 °C'ye etüvde bekletildi.
- Sonrasında kesitler 10'ar dakika sırasıyla Ksilol I ve Ksilol II'de işleme tabi tutularak dokuların parafinden uzaklaştırılması sağlandı.
- Dokular Ksilol işlemini takiben sırasıyla %100, %90, %80 ve %70'lik alkol serilerinde 5'er dakika bekletildi.
- 5 dakika distile su ile yıkandı.
- Yıkama sonrasında kesitler ilk olarak 10 saniye hematoksilen ile boyandı ve mikroskopta boyanma durumu incelendi. Yeterince boyanmadığı görüldüğünde 4-5 saniye daha bekletildi.
- Kesitler distile su ile yıkandı.
- Su ile yıkama sonrasında Eosin boyasına batırıp çıkarılarak boyanması sağlandı.

- Kesitler tekrar distile suda yıkandı.
- Tekrar alkol serilerine dönülerek %70, %80, %90'luk alkollerle işleme tabi tutuldu. %100'lük alkolde 5 dakika bekletildi.
- Sırasıyla Ksilol II ve Ksilol I'de 10'ar dakika bekletildikten sonra kesitler entallan ile kapatıldı.

3.4. Çiftli İmmüno Floresan boyama

Kontrol grubu, sezaryen grubu ve PAS hasta grubu olmak üzere 3 grubun parafin kesitlerine $\alpha V\beta 3$ integrin, CD9, sitokeratin 7 ve vimentin proteinlerinin lokalizasyonunu belirlemek için çiftli immüno floresan boyamalar yapıldı.

Kullanılan Solüsyonlar:

- Sitrik asit Solüsyonu
2,1 gr Sitrik asit ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)
900 ml distile su

Sitrik asit tartıldı ve distile suda çözüldü. NaOH ile pH= 6,0'ya ayarlandı.

- 1x PBS (Phosphate Buffer Saline) Tamponu
8 gr NaCl (Sodyum Klorür) (Son konsantrasyonu 137 mM)
0,2 gr KCl (Potasyum Klorür) (Son konsantrasyonu 2.7 mM)
1,44 gr Na_2HPO_4 (Disodyum Hidrojen Fosfat) (Son konsantrasyonu 10 mM)
0,24 gr KH_2PO_4 (Potasyum Hidrojen Fosfat) (Son konsantrasyonu 1.8 mM)
800 ml distile su

Tüm kimyasallar birleştirilip 800 ml distile suda çözüldü. HCl ile pH=7.4'e ayarlandı. Ayarlama sonrası son hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

- Bloklama Solüsyonu (UltraVision Protein Block, Thermo; #TL-125-PBQ)
- DAPI'li kapatma Solüsyonu; (VECTASHIELD Antifade Mounting Medium; #H-1200)

3.4.1. Çiftli İmmünofloresan Boyama Protokolü

- Deparafinizasyon için parafin kesitler 2 defa 10'ar dakika ksilolden geçirildi.
- Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinin her birinde 5'er dakika (%100, %90, %80, %70) bekletildi.
- Distile su ile 5 dakika muamele edildi.
- Dokudaki antijenik maskelenmenin ortadan kaldırılması için kesitler sitrik asit solüsyonu içinde mikrodalga fırında 800 watt'ta 2 kez 5 dk kaynatıldı. İlk kaynatma sonrasında eksilen sitrik asit ilave edildi.
- Solüsyon içerisinde oda ısısında 20 dakika soğuması beklendi.
- Kesitler 4x5 dk. PBS ile yıkandı.
- Dokuların çevresi hidrofobik kalemle çizildi.
- UV blok solüsyonu ile 10 dk bloklama yapıldı.
- Primer antikorlar ile +4°C de gece boyu inkübasyon yapıldı.

Tablo 3.3. İmmünofloresan boyamalarda kullanılan Primer Antikorlar ve dilüsyon oranları

CD9	CD9 Rabbit anti Human Polyclonal Antibody BT-AP01560 (BTLab) 1/100 dilüsyon
$\alpha V\beta 3$ integrin	İntegrin Alpha V+Beta 3 Rabbit anti Human Polyclonal Antibody BS-1310R (Bioss) 1/100 dilüsyon
CYT7	Sitokeratin 7 Mouse anti human Antibody M7018 (DAKO) 1/100 dilüsyon
Vimentin	Vimentin Mouse anti human antibody M0725 (DAKO) 1/100 dilüsyon

- İkinci gün 3x5 dk PBS ile yıkandı.
- Kesitler Florokrom işaretli sekonder antikorlar ile 45 dakika inkübe edildi. Tüm işlem karanlık odada gerçekleştirildi.

Tablo 3.4. İmmünofloresan boyamalarda kullanılan Sekonder Antikorlar ve dilüsyon oranları

Mouse primer Antikor için (CYT7 ve Vimentin)	Alexa Flour 568 Donkey anti Mouse, (Life Technology), 1/500
Rabbit Primer Antikor için ($\alpha V\beta 3$ integrin ve CD9)	Alexa Flour 488 Donkey Anti Rabbit, (Life Technology), 1/500

- Kesitler karanlık odada 3x5 dk PBS ile yıkandı.

- Dapi'li kapatma solüsyonu ile slaytlar kapatıldı ve Floresan mikroskop altında incelendi.
- Negatif kontrollerde Primer antikor eklenmesi aşamasına kadar tüm işlemler aynıdır. Primer antikor yerine ise PBS eklenmiştir. Sekonder ile 45 dk inkübe edildikten sonra slaytlar Dapi ile kapatılıp ve incelenmiştir.

3.5. SDS-PAGE Western Blot analizi

Oluşturulan 3 çalışma grubuna ait 18 doku örneğinde $\alpha V\beta 3$ ve CD9 proteinlerinin miktarlarının kantitatif olarak analizi gerçekleştirildi.

3.5.1. Dokuların lizat haline getirilmesi

Kullanılan solüsyonlar:

- Lizis Buffer
 - 10 ml 0,1 M Tris (pH: 7,4) (BioRad #1610716)
 - 1 ml Sodyum Orthovanadate (Sigma Aldrich S6508)
 - 1 gr SDS (BioRad #1610302)
 - 90 ml distile su

0,6 gr Tris 40 ml distile suda çözüldü ve HCl ile pH= 7,4'e ayarlandı. Son hacim 50 ml'ye tamamlandı (0.1 M Tris).

0,184 gr Sodyum Orthovanadate 10 ml 0.1 M Tris içerisinde çözdürüldü (100x Sodyum orthovanadate).

Son olarak da 10 ml 0,1M Tris 90 ml suda çözülüp 1 gr SDS ve 1 ml 100x Sodyum Orthovanadate eklenerek Lizis Buffer elde edildi.

- Proteaz inhibitör Kokteyli (25x)
 - 1 tablet Roche PIK (Proteaz İnhibitör Kokteyli tablet)
 - 1 ml distile su

Tablet suda çözülerek 25x PIK hazırlandı. Kullanılacağı zaman distile su le 1x'e dilüe edilerek kullanıldı.

Sıvı nitrojende kriyotüplerde muhafaza edilen dokular buz içerisine alındı ve tüm aşamalar buz içerisinde gerçekleştirildi. Örnekler sırasıyla bistüri yardımıyla ezilerek mekanik olarak olabilecek en akışkan hale getirildi. Sonrasında eppendorflar numaralandırılarak darası alındı ve örnekler içlerine aktararak ağırlıkları tartıldı. 0,2 gram örnek başına 600µl Lizis Buffer ve 10µl Proteaz İnhibitör Kokteyli eklendi. Her 15 dakikada bir vortekslenerek 1 saat boyunca +4°C’de inkübe edildi. Sonrasında dokunun iyice parçalanıp proteinlerin en iyi şekilde ayrışması için sonikatör uygulandı. Dokular son kez vortekslendi ve 15.000 rpm’de 4°C’de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatantlar üst kısımdan alınarak yeni eppendorflara aktarıldı, pelet kısmı atıldı. Süpernatant kısmı yani hazırlamış olduğumuz lizatlarımız -20°C’de muhafaza edildi.

3.5.2. Protein miktarlarının tayini

Hazırlanan lizatların içerdiği protein miktarlarının tayini için BCA kit (Bicinchoninic Acid Kit) kullanıldı.

Kullanılan Solüsyonlar

- BCA Protein Assay Kit

Yöntemde standart protein olarak BSA (Bovine Serum Albumin) kullanıldı. Toplamda 8 farklı standart hazırlandı. S0 için 1 mg/ml BSA hazırlandıktan sonra lizat hazırlamada kullanılan lizis buffer ile her seferinde yarı oranda dilüe ederek diğer standart protein konsantrasyonları hazırlandı.

Lizat hazırlamada kullanılan Lizis Tamponu blank olarak kullanıldı. Örnekler Lizis Buffer ile 1:50 oranında dilüe edilerek vortekslendi ve 96 well plate kuyucuklarına sırasıyla çift tekrar olacak şekilde 24’er µl eklendi. Standartlar da aynı şekilde belirli sıralarla çift tekrar olarak kuyucuklara 24’er µl eklendi. Diğer yandan kit solüsyonları Reagent A’dan 10 ml ve Reagent B’den 200 µl alınarak bir falkon içerisinde karıştırıldı. Hazırlanan kit solüsyondan her bir kuyucuğa 200 µl eklendi. Örnekler 15 dakika boyunca 60 °C’lik etüvde (Nüve EN 500 İnkübatör) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plate spektrofotometre cihazına (µQuant BioTek Spektrofotometre, MQX200) yerleştirilerek

562 nm dalga boyunda okutuldu. Standartlar ile karşılaştırılarak lizatlarda bulunan protein miktarları tespit edildi. Numunelerdeki protein miktarları laemmli solüsyonu ve distile su kullanılarak eşitlendi. Western Blot analizinde kullanıma hazır hale getirildi.

Kullanılan Solüsyonlar:

- Ayırma Solüsyonu

18,17 gr Tris

0,4 gr SDS

Her ikisi 800 ml distile suda çözüldü. pH=8,8'e ayarlandı ve son hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

- Toplama Solüsyonu

6,06 gr Tris

0,4 gr SDS

Her ikisi 800 ml distile suda çözüldü. pH=6,8'e ayarlandı ve son hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

- 5x Yürütme Solüsyonu

9 gr Tris

43.2 gr Glisin

3 gr SDS

600 ml Distile su

Kullanım sırasında distile su ile 1x şeklinde dilüe edilerek kullanıldı (100 ml 5x Yürütme Solüsyonu+ 400 ml distile su).

- Blotlama Solüsyonu

14.3 gr Glisin

3 gr Tris

700 ml distile su

Oluşturulan solüsyona 200 ml metanol eklendi ve toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

- Bloklama Solüsyonu (%5'lik süt tozu)
5 gr süt tozu (Applichem A0830,0500)
100 ml TBS-T

Bu solüsyon hazırlandıktan sonra +4'te maksimum 1 gün bekletildi. Genel olarak taze hazırlanarak kullanıldı.

- 10x TBS Tamponu
60.55 gr Tris
87.66 gr NaCl (Merck 1.06404.1000)
800 ml distile su

Solüsyon HCl ile pH:7.4'e ayarlandı. pH ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

- TBS-T Solüsyonu
1000 ml 1x TBS içerisine 1000 µl Polisorbat 20 (Amresco Tween 20-0777) eklendi ve kullanıldı.
- Akrilamid-Bisakrilamid
7,5 gr Akrilamid-Bisakrilamid (37,7:1) (Sigma Aldrich- Fluka Analytical 100928870)

Akrilamid-Bisakrilamid falkona alındı ve 25 ml'ye tamamlanana kadar distile su ekleyip çözüldü. Falkon aliminyum folyo ile sarılı şekilde muhafaza edildi.

- %10'luk APS (Amonyum persülfat)
1 gr APS (Sigma Aldrich- Fluka Analytical 100928870)
10 ml distile suda 1 gr APS çözüldü.
- Ayırma Jeli (%10'luk, 2 jel için)
4950 µl Distile su
3000 µl Ayırma solüsyonu

3960 µl Poliakrilamid

15 µl TEMED (Sigma Aldrich T7024-100)

90 µl %10'luk APS

Belirtilen solüsyonlar sırasıyla bir falkon içerisinde birleştirildi. Jel donmadan hızlıca camlar arasına aktarıldı.

- Toplama Jeli (2 jel için)

2310 µl Distile su

1000 µl Toplama solüsyonu

660 µl Poliakrilamid

5 µl TEMED

30 µl %10'luk APS

3.5.3. SDS-PAGE Western Blot Protokolü

1.Gün

- İlk olarak proteinlerin yürütüleceği jeller hazırlandı. Jel için gerekli olan ayırma ve toplama solüsyonu yüzde içeriği incelenecek olan proteinlerin kilodalton (kDa) ağırlığına uygun olarak seçildi.
- Toplama ve ayırma jelleri belirli oranlardaki Ayırma solüsyonu, Toplama solüsyonu, Poliakrilamid, Distile su, TEMED ve APS kullanılarak hazırlandı. Jel hazırlama standında sabitlenmiş camlar arasına önce ayırma jeli, sonrasında üzerinde toplama jeli eklendi. 10'lu tarak toplama jeli döküldüğü anda camlar arasına yerleştirildi ve kuyucuklar açıldı.
- Her iki jelin yaklaşık 15 dakika donması için beklendi.
- Stanttan çıkarılan jeller yürütme tankına yerleştirildi. Üzerine 1x yürütme solüsyonu eklendi.
- Laemmli (Sigma Aldrich S-3401) ile hazırlanmış örnekler -20'den çıkarıldı ve 95°C'de 5 dk boyunca kaynatıldı.
- Camlar arasına yerleştirilen tarak yürütme solüsyonu içerisinde çıkarıldı. Böylece kuyucuklar içerisinde hava kabarcığı oluşumu minimuma indirildi.

- Örnekler kuyucuklara yüklendi. Her bir kuyucuğa 20 µl örnek yüklendi.
- Önce 140 Voltta 15 dk, sonra 160 voltta 1 saat boyunca yürütüldü.
- Yürütme sonrasında jeldeki proteinler Blotlama yapılarak Nitroselüloz (Amersham Hybond ECL nitrocellulose membranes (RPN303D)) membrana aktarıldı. Bu işlem için jel, Nitroselüloz membran, Blotlama kâğıtları ve destek materyalleri ile sandviç hazırlanarak blotlama tankına yerleştirildi. Tankta ayrıca buz yerleştirilerek oda sıcaklığında 1 saat boyunca 350 mA'de blotlanması sağlandı.
- Proteinlerin membrana aktarılıp aktarılmadığı Poncaeu boyaması (Sigma Aldrich P7170) ile kontrol edildi.
- Poncaeu boyası membrandan 3x5 dk TBS-T yıkaması ile temizlendi.
- Yıkama sonunda membranlar çalkalayıcı üzerine alındı ve non-spesifik bağlanmaların önlenmesi için TBS-T ile hazırlanmış yağsız süt tozunda 1 saat boyunca bloklama gerçekleştirildi.
- Bloklama sonrasında yağsız süt tozunda dilüe edilmiş Primer antikorlar (CD9 1:1000, α V β 3 integrin 1:500) membrana eklendi ve soğuk odada gece boyunca inkübe edildi.

2. Gün

- Primer antikorlar membrandan uzaklaştırıldı ve 3x5 TBS-T yıkaması yapıldı.
- Yıkama sonrasında yağsız süt tozunda dilüe edilmiş sekonder antikorlar (Keçi anti-tavşan sekonder antikor, 1/5000) membranlara eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- 3x5 TBS-T yıkaması yapıldı.
- Membran karanlık odada 5 dk boyunca shaker üzerinde açılımı yazılımalı ECL (Advansta K-12045-D50) ile inkübe edildi.
- Görüntüleme cihazında (Azure c280) bantlar incelendi.

3.6. İstatistiksel Analiz

Western Blot bantlarının yoğunlukları İmage J programı ile ölçüldü. Elde edilen CD9 ve α V β 3 integrin bant yoğunlukları Beta aktin bant yoğunluklarına göre normalize edildi. Normalizasyon sonrası elde edilen veriler, GraphPad programı kullanılarak One way ANOVA testinde Tukey metodu ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

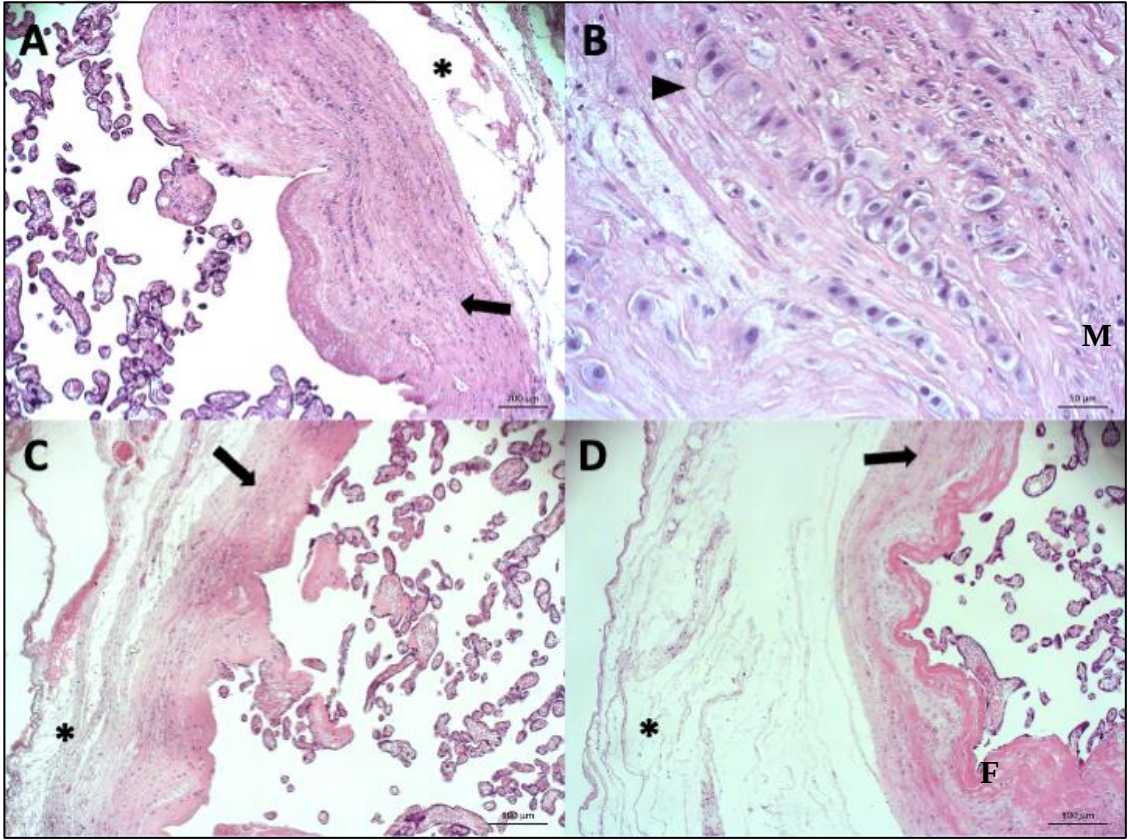
Analizlerin sonucunda $p < 0,05$ (*) ve $p < 0,01$ (**) olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Bu çalışmada Plasenta Akreata Spektrum’lu gebeliklerde gerçekleşen anormal trofoblast invazyonu mekanizmasında, hücrelerin migrasyon ve invazyonunda etkili olabileceği düşünülen CD9 ve $\alpha V\beta 3$ integrin’in protein miktarları Western Blot deneyleri ile analiz edilmiştir. Bu proteinlerin ekspresyon şiddeti ve lokalizasyonları ise çiftli immünfloresan boyamalar ile incelenmiştir. Ayrıca yapılan morfolojik incelemeler için yapılan Hematoksilen-Eosin boyamalar da bulgular arasında yer almaktadır.

4.1 Hematoksilen-Eosin Morfolojik İnceleme Bulguları

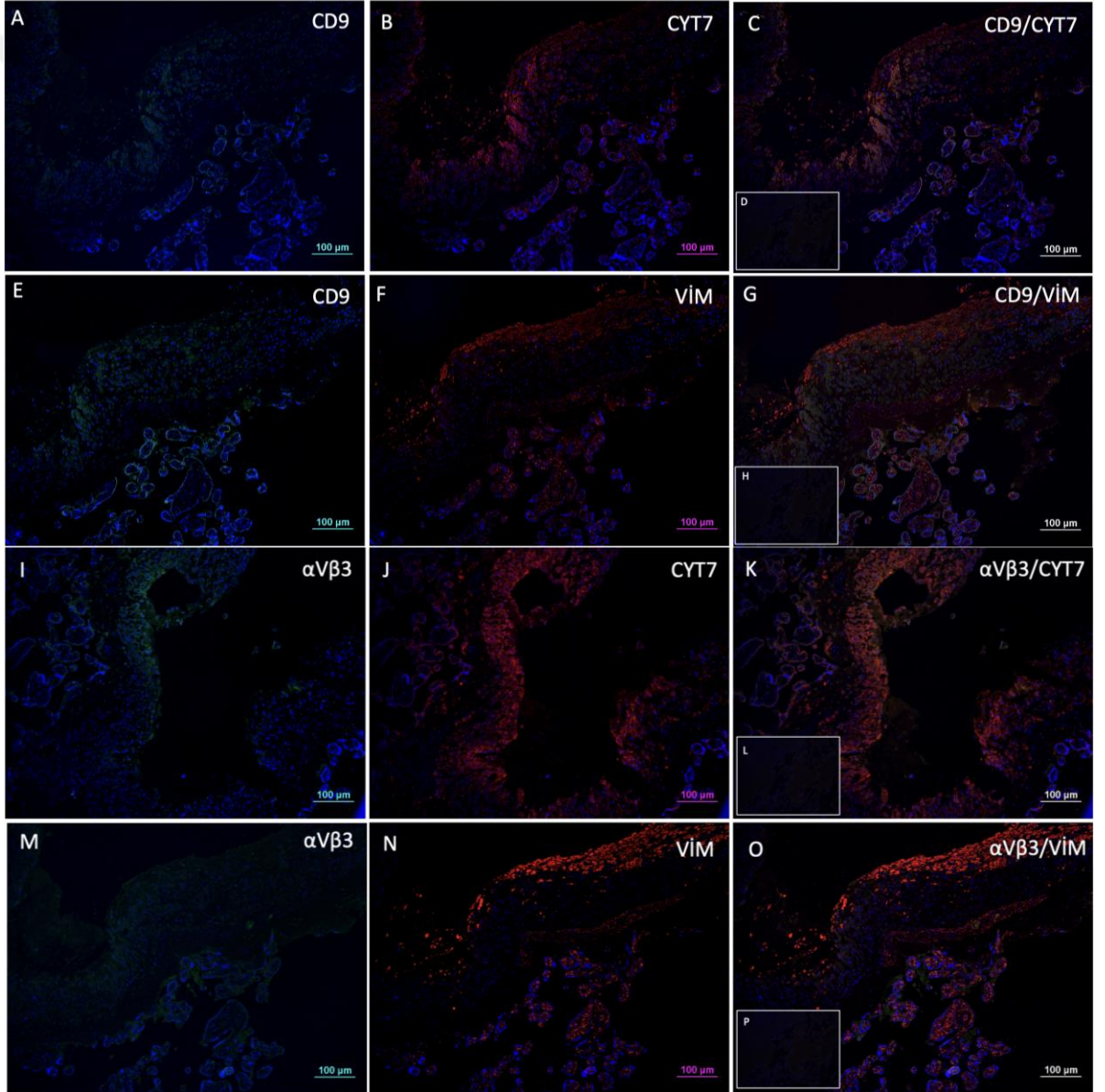


Şekil 4.1. PAS grubuna ait perkreta vakasından alınan doku örneklerine yapılan Hematoksilen-Eosin boyaması ve morfolojik incelemelere ait bulgular. (A) En dıştaki serosa tabakası (yıldız) ve altındaki miyometriyum (ok) görülmektedir. Villuslar direkt olarak miyometriyum ile temas halindedir (5x). (B) A’daki şeklin büyütülmüş halidir. Miyometriyuma invaze olmuş Ekstravillöz Trofoblast (EVT) hücreleri (ok başı) ve çevresindeki düzensiz Miyofiber yapılar (M) görülebilmektedir (20x). (C) Dışta serosa (yıldız), içte miyometriyum (ok) ve derin miyometriyuma invaziv haldeki villus yapısı görülebilmektedir. (D) Şekilde kesintili ve dalgalı desidua, ince miyometriyum yapısı ve yoğun fibrin birikimi (F) görülmektedir.

4.2. Çiftli İmmü Floresan Boyama Analizi Bulguları

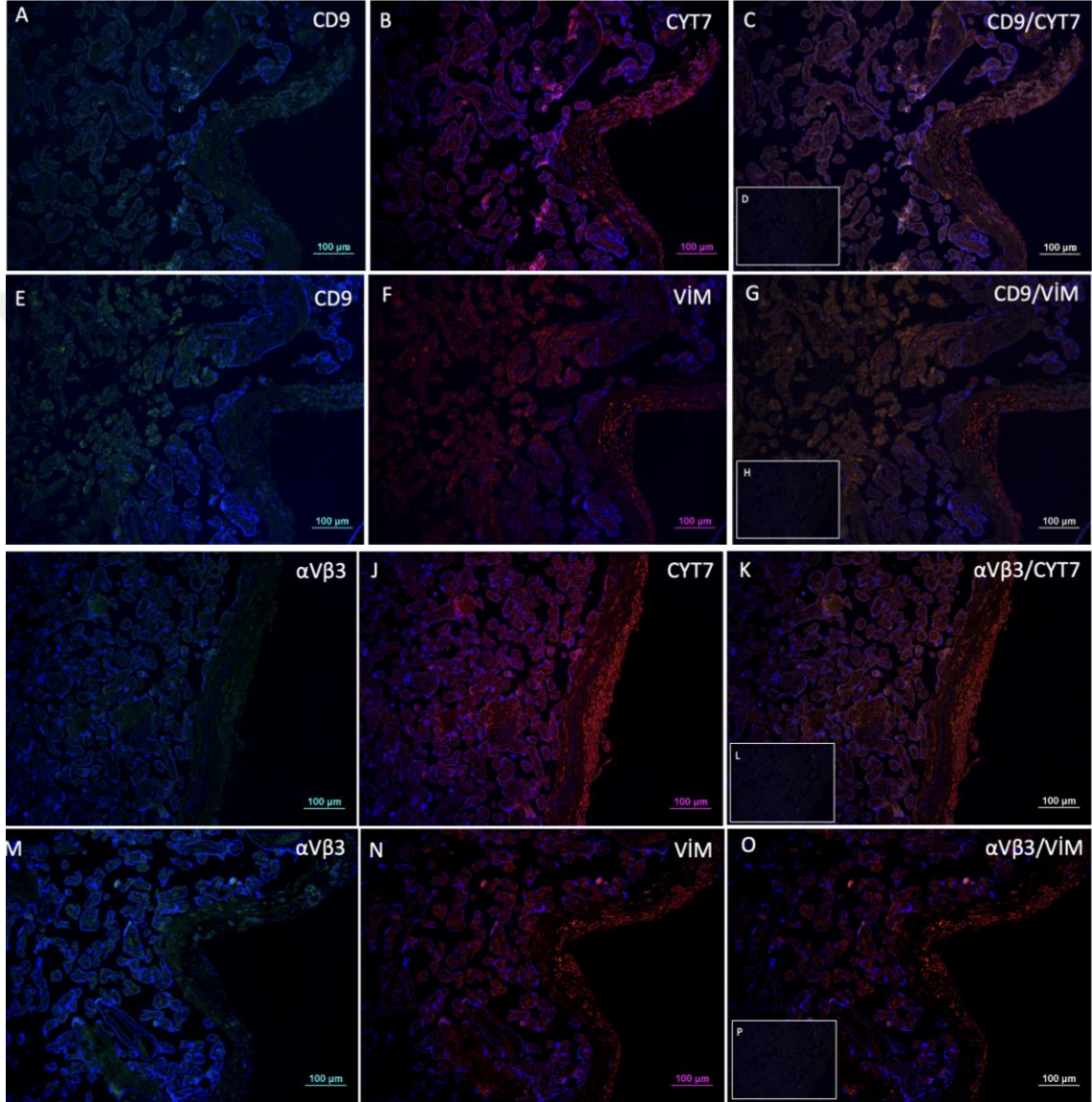
Plasenta Akreata Spektrumlu gebelikler, herhangi bir patoloji gözlenmemiş Sezaryen doğum hastaları ve Kontrol grubu olarak normal doğum yapmış hastalardan alınan ve takibi yapılan dokuların kesitleri alınıp CD9 ve $\alpha V\beta 3$ integrin için Çiftli immü floresan boyamalar gerçekleştirildi.

4.2.1. Kontrol grubu için Çiftli İmmü Floresan Boyama Analizi Bulguları

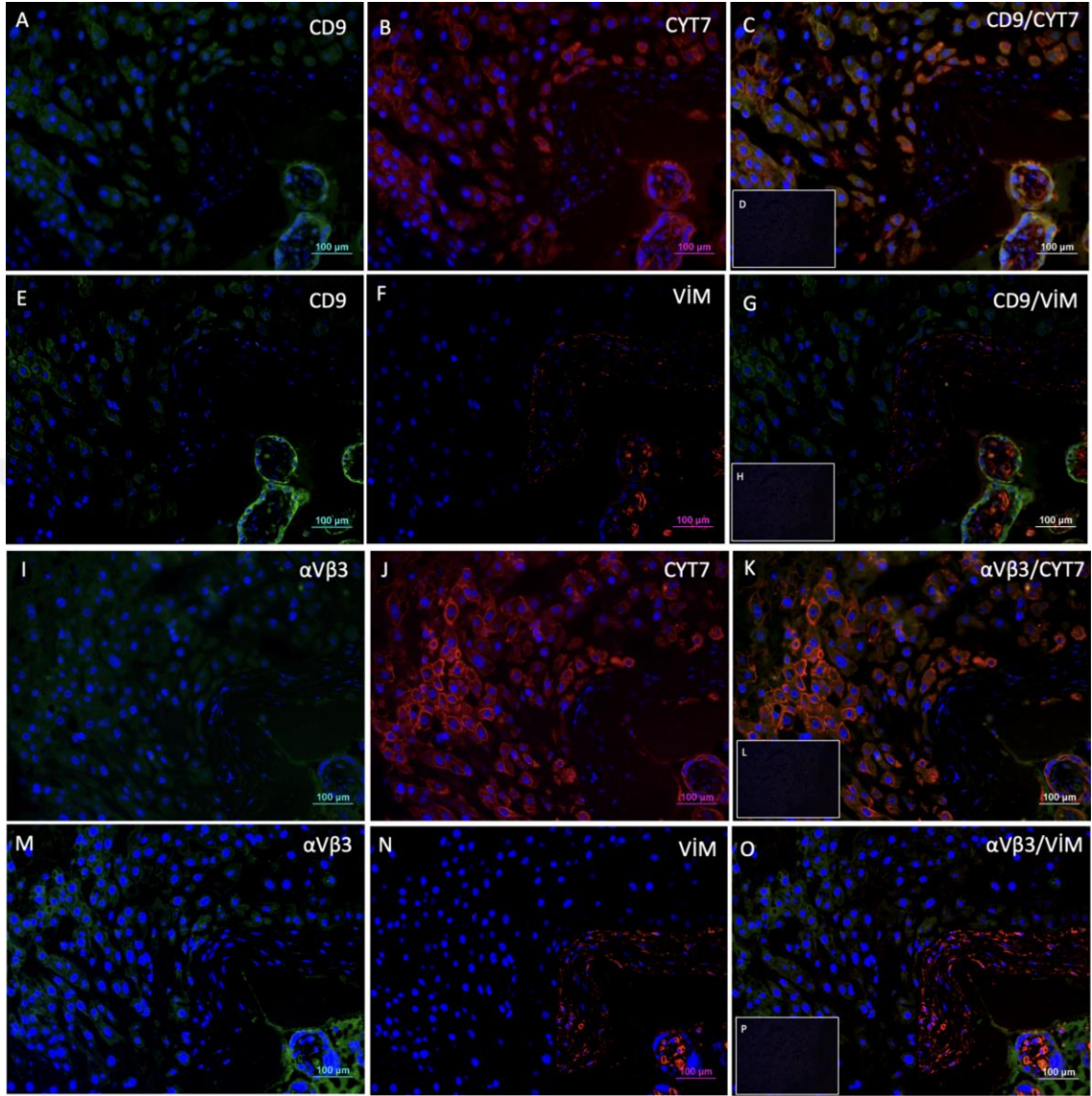


Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait Çiftli İmmü Floresan boyama bulguları. Dokular hem CD9 hem de $\alpha V\beta 3$ integrin bakımından pozitif boyanma gösterdi. Her iki protein, Trofoblast belirteci olan Sitokeratin 7 ve

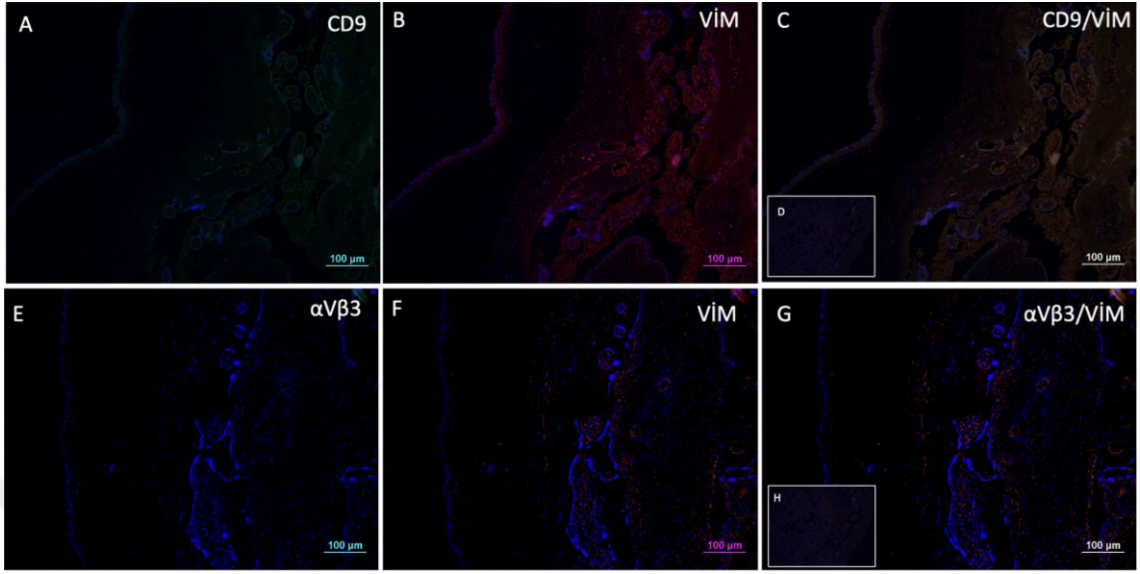
desidual hücre belirteci olan Vimentin ile çiftli boyanarak lokalizasyonları ve farklı bölgelerdeki ekspresyon yoğunlukları bakımından incelendi (CYT7: Sitokeratin 7, Vim: Vimentin) (10x).



Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait Maternal ve villöz kısımların Çiftli İmmünfloresan boyama bulguları. (CYT7: Sitokeratin 7, Vim: Vimentin) (10x).

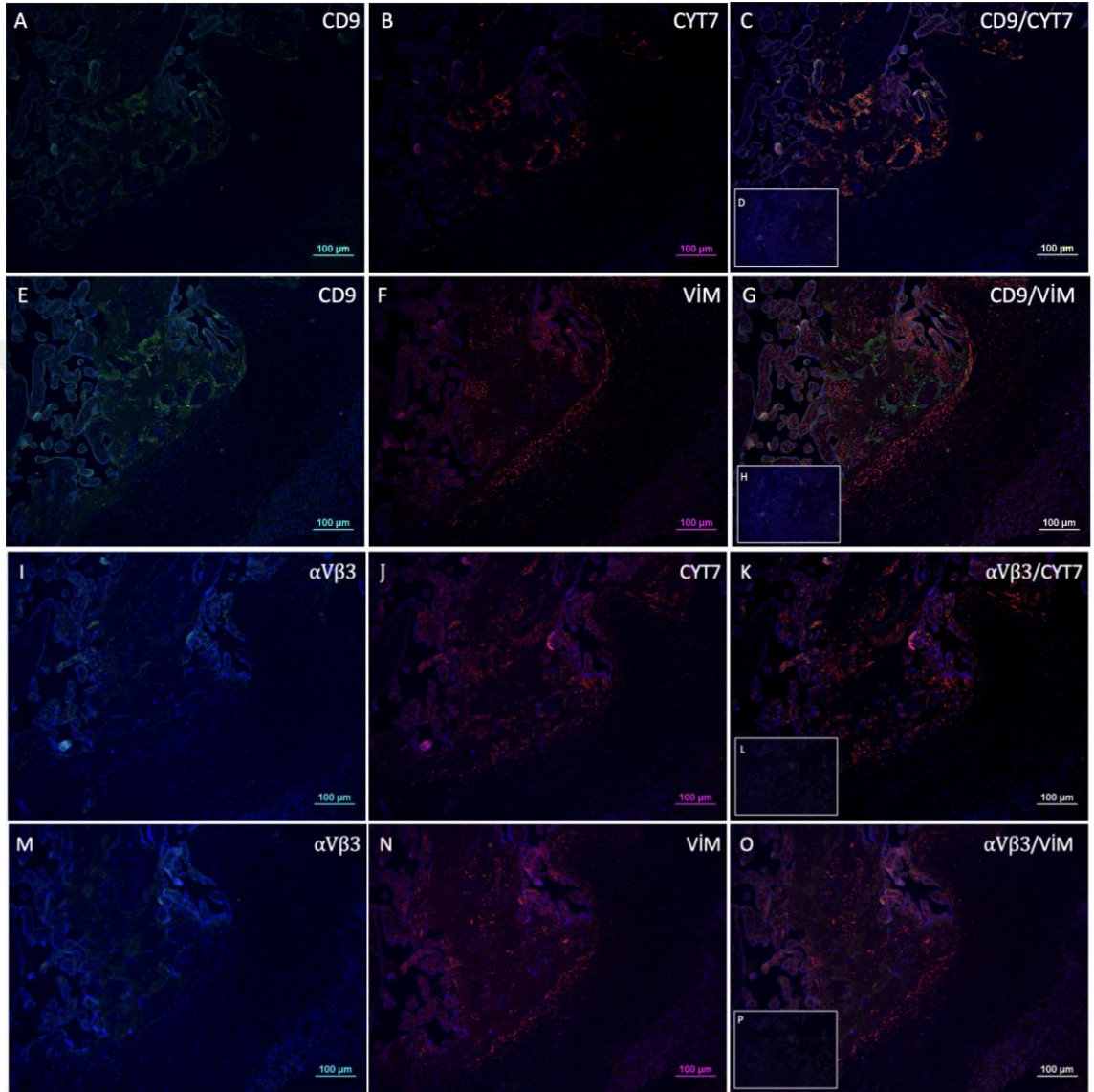


Şekil 4.4. Kontrol grubuna ait invazyon alanı. Maternal kısım ile birkaç adet plasental villusun Çiftli İmmünfloresan boyama bulguları. (CYT7: Sitokeratin 7, Vim: Vimentin) (40x).

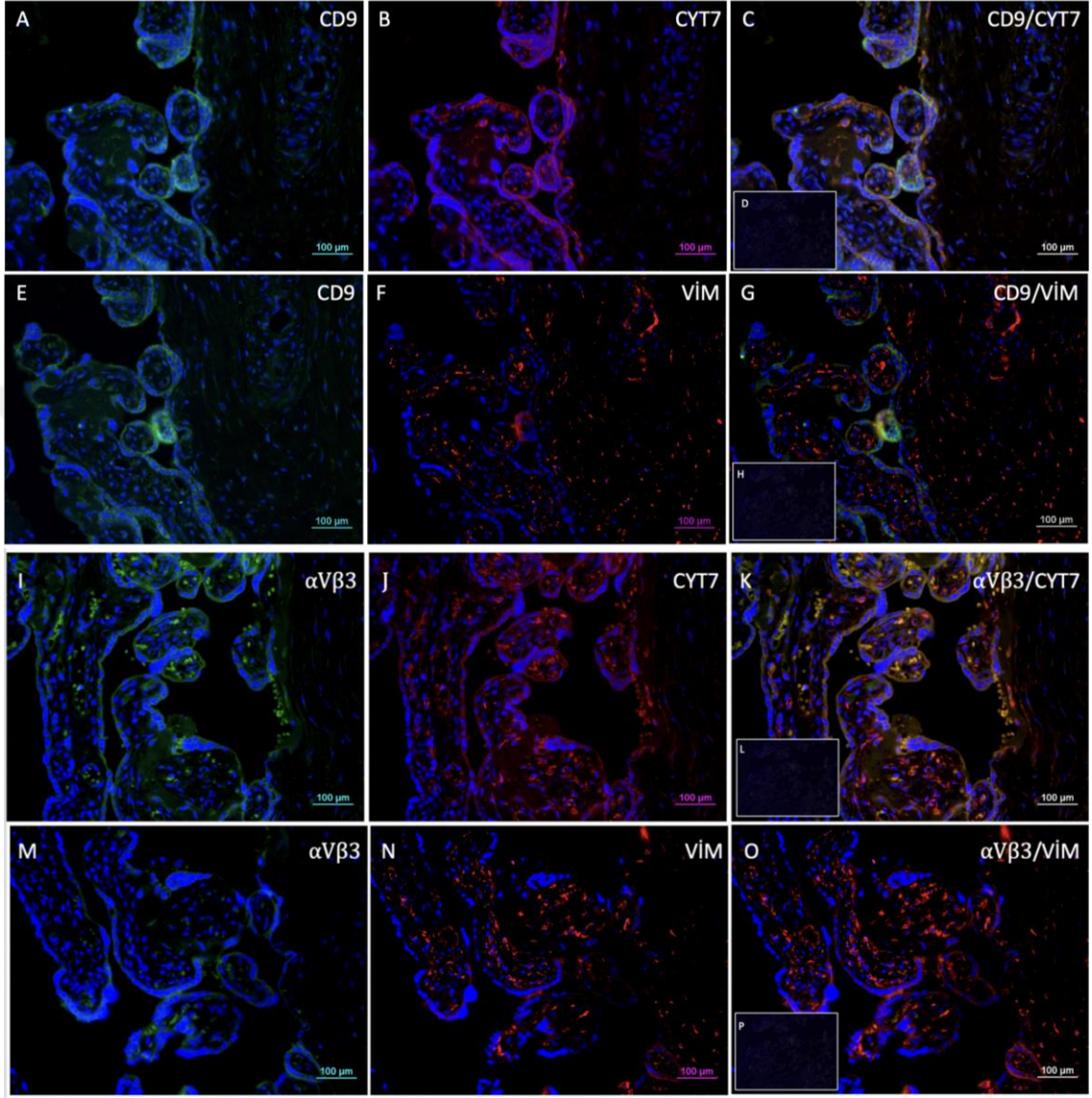


Şekil 4.5. Kontrol grubuna ait Amniyon epitelinde içeren Fetal kısmın Çiftli İmmünfloresan boyama bulguları. (Vim: Vimentin) (10x).

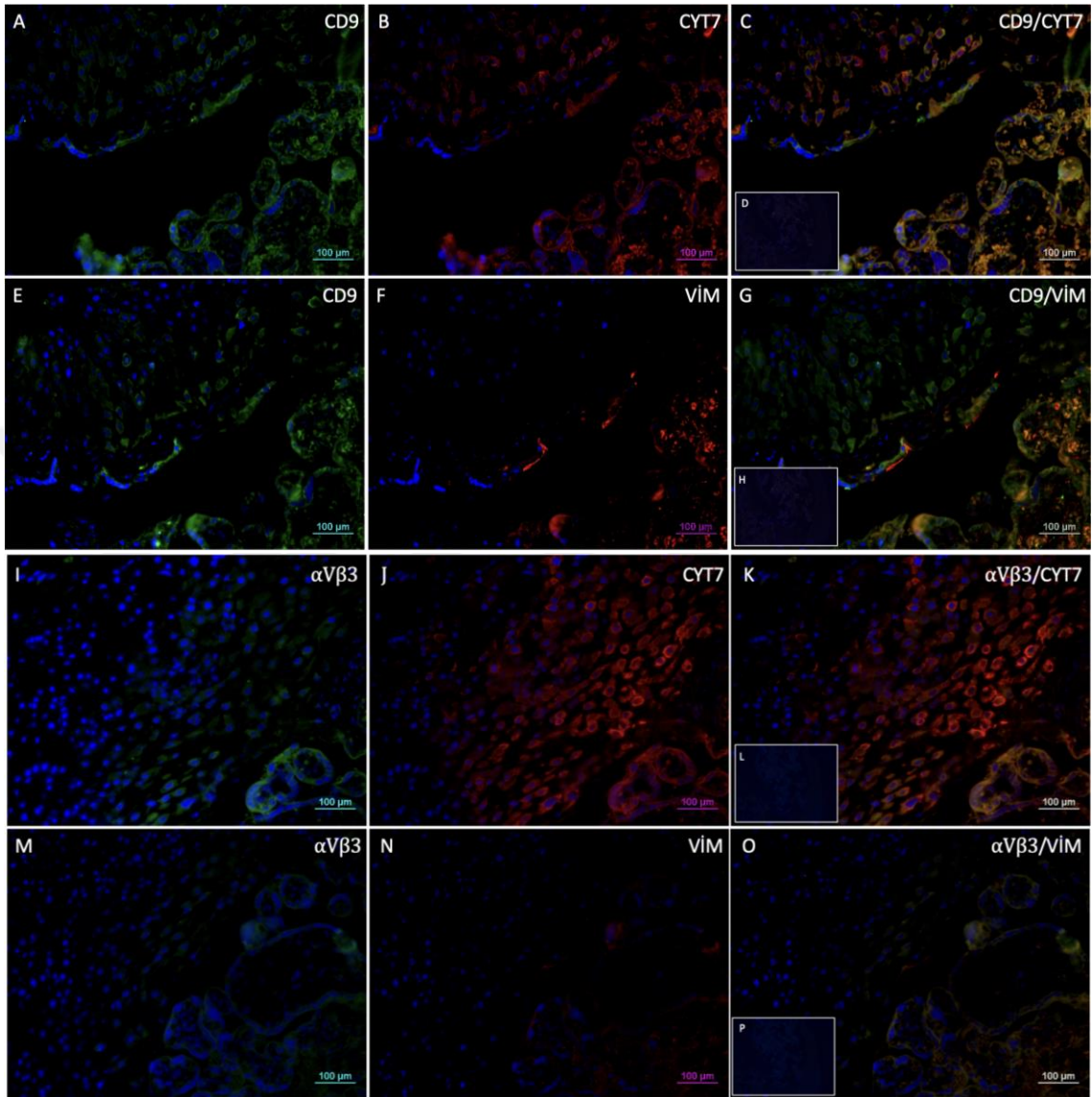
4.2.2. Sezaryen grubu için Çiftli İmmü Floresan Boyama Analizi Bulguları



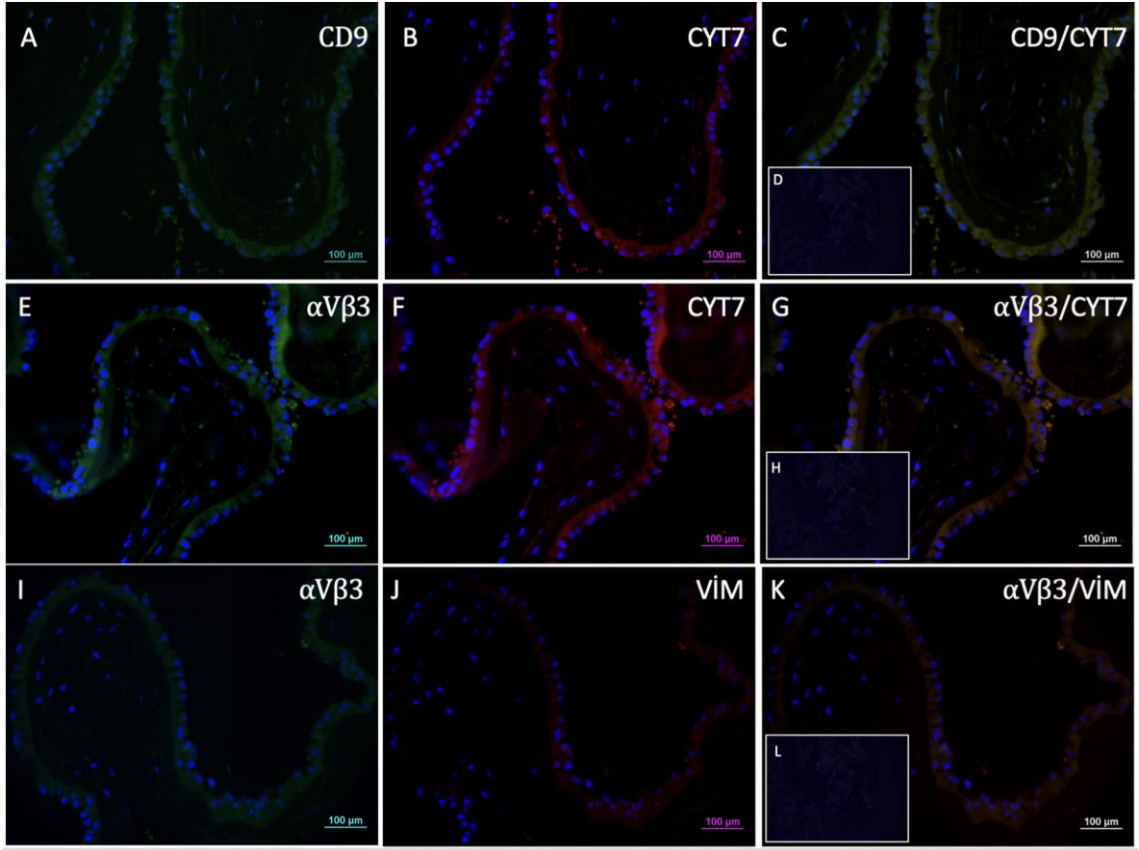
Şekil 4.6. Sezaryen grubuna ait invazyon alanındaki Çiftli İmmü Floresan boyama bulguları. Dokular hem CD9 hem de $\alpha V\beta 3$ integrin bakımından pozitif boyanma gösterdi. Her iki protein, Trofoblast belirteci olan Sitokeratin 7 ve desidual hücre belirteci olan Vimentin ile çiftli boyanarak lokalizasyonları ve farklı bölgelerdeki ekspresyon yoğunlukları bakımından incelendi (CYT7: Sitokeratin 7, Vim: Vimentin) (10x).



Şekil 4.7. Sezaryen grubuna ait villöz kısmın Çiftli İmmünfloresan boyama bulguları. Sağ kısımda stem villus sol kısımda ise değişik tipte villuslar gözlenmektedir (CYT7: Sitokeratin 7, Vim: Vimentin) (40x).

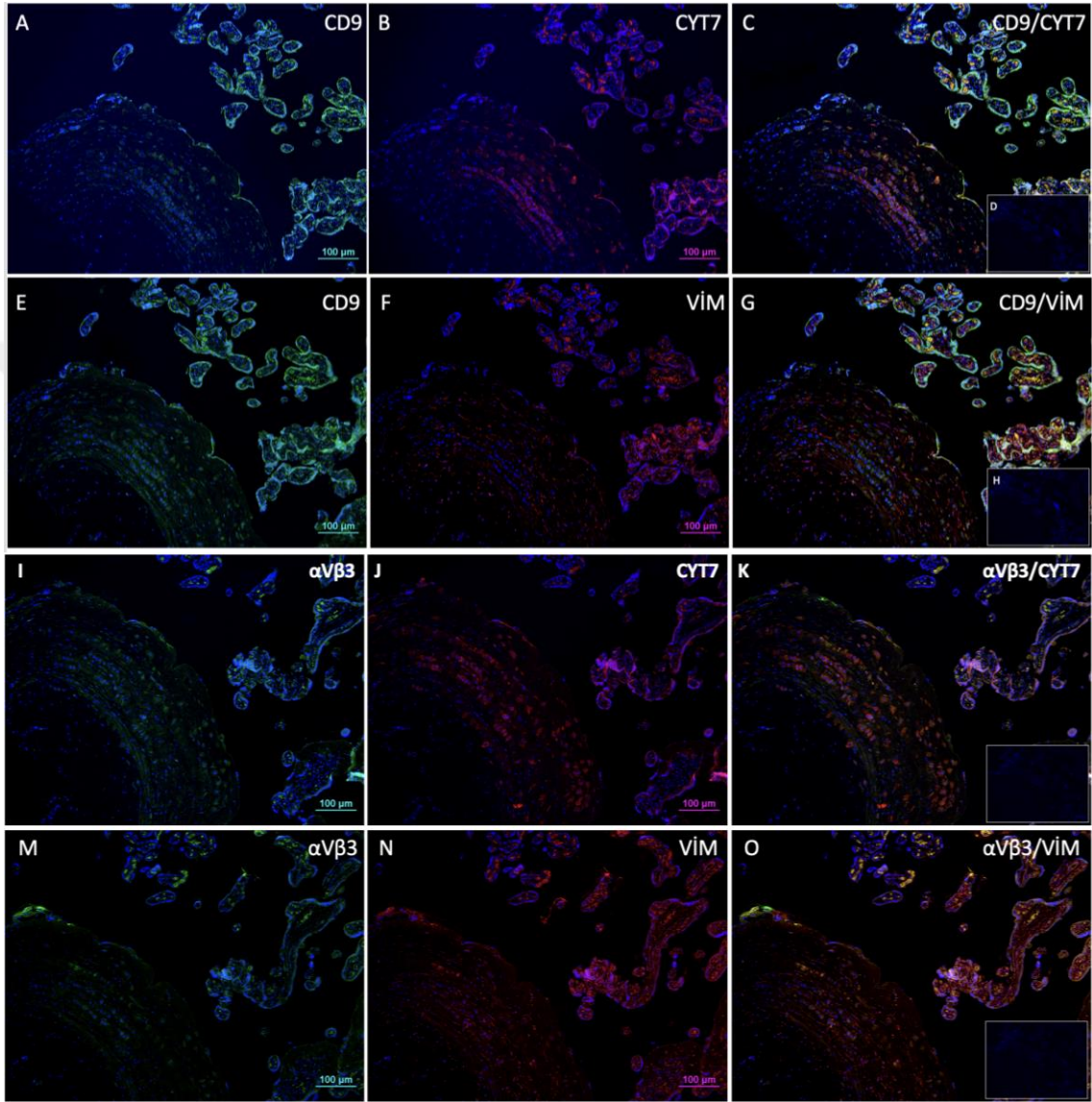


Şekil 4.8. Sezaryen grubuna ait invazyon alanı. Maternal kısım ve plasental villuslardaki Çiftli İmmünfloresan boyama bulguları (CYT7: Sitokeratin 7, Vim: Vimentin) (40x).

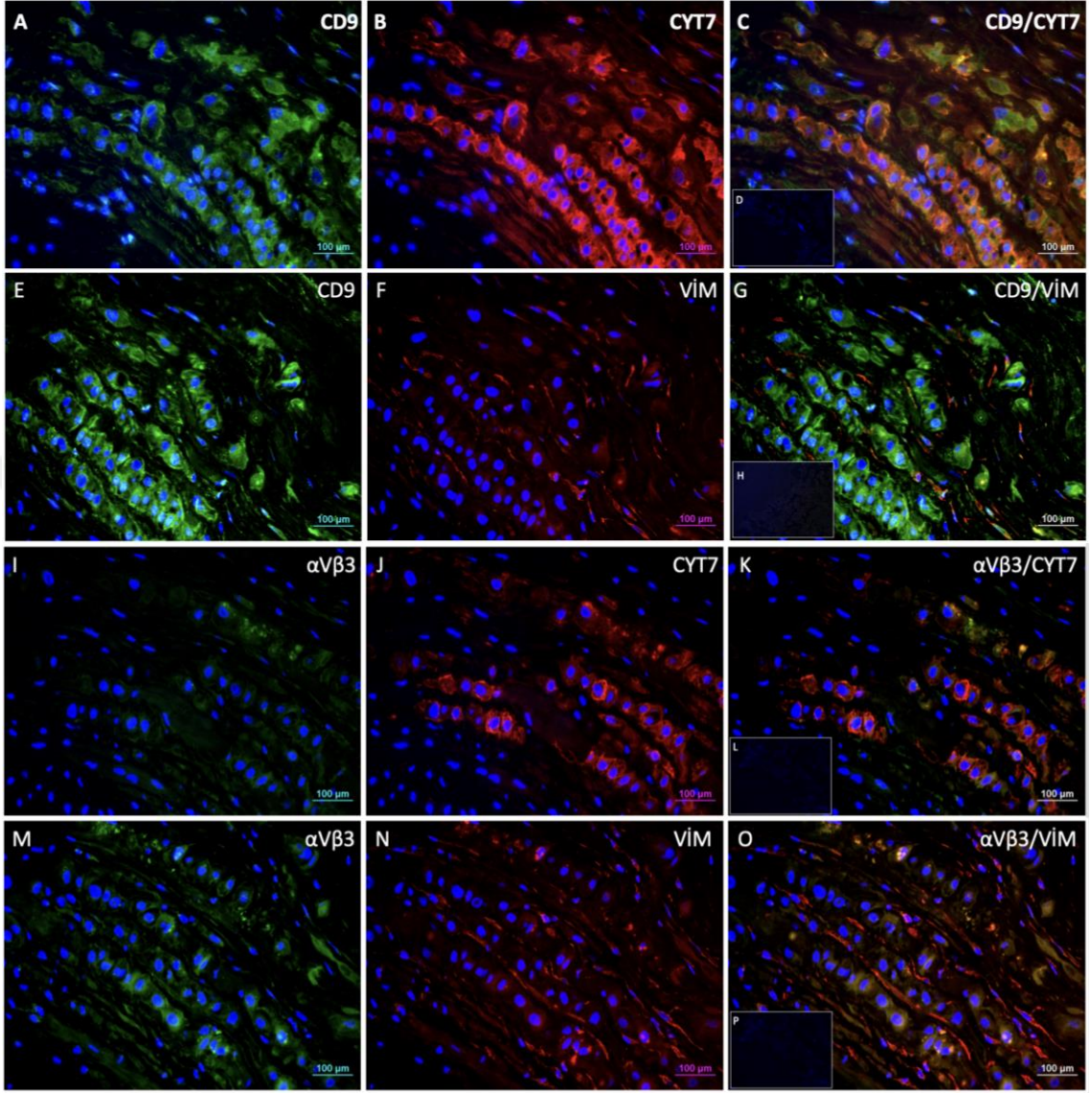


Şekil 4.9. Sezaryen grubuna ait Amniyon epitelindeki Fetal kısmın Çiftli İmmüno Floresan boyama bulguları (CYT7: Sitokeratin 7, Vim: Vimentin) (40x).

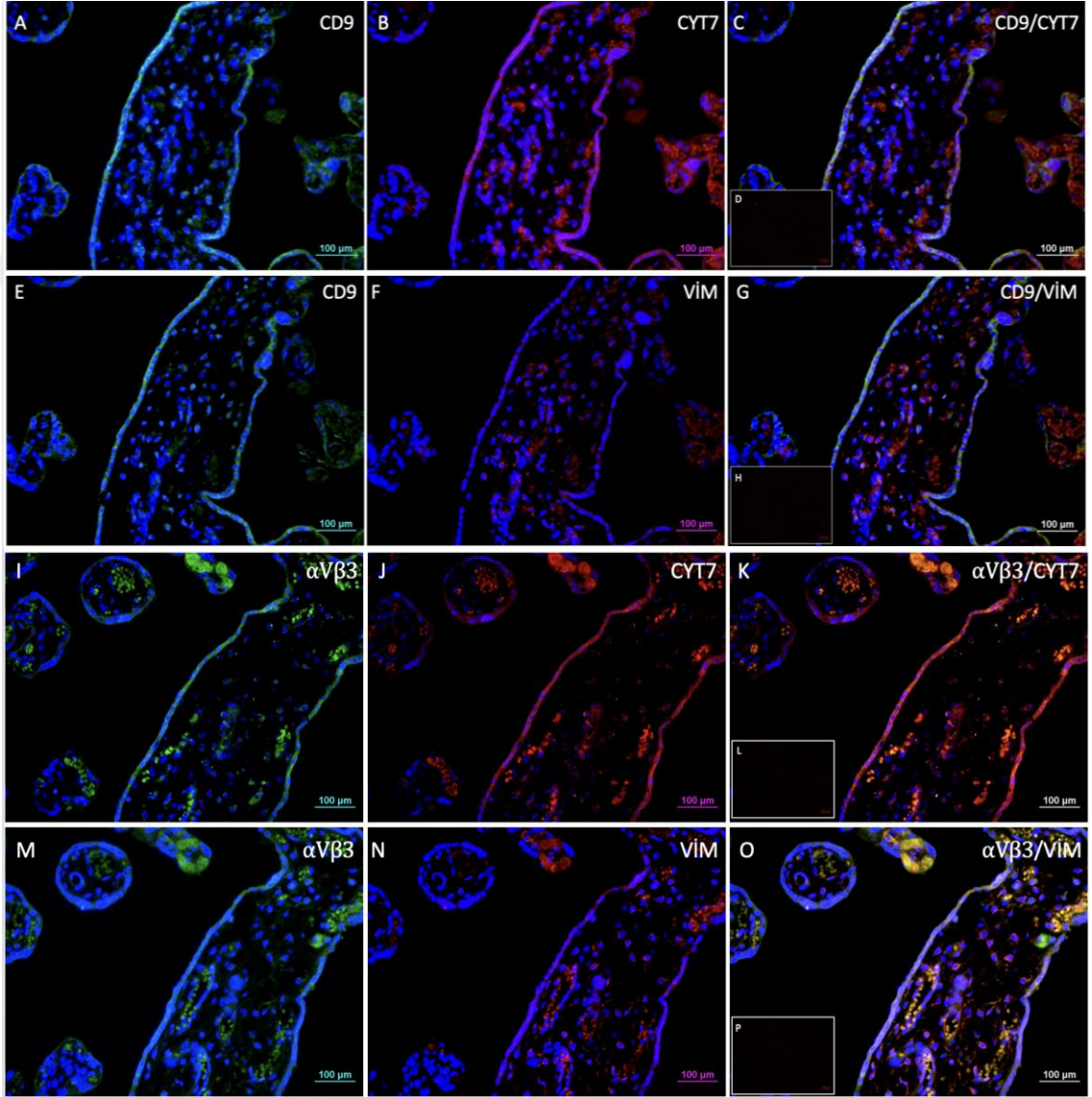
4.2.3. PAS grubu için Çiftli İmmü Floresan Boyama Analizi Bulguları



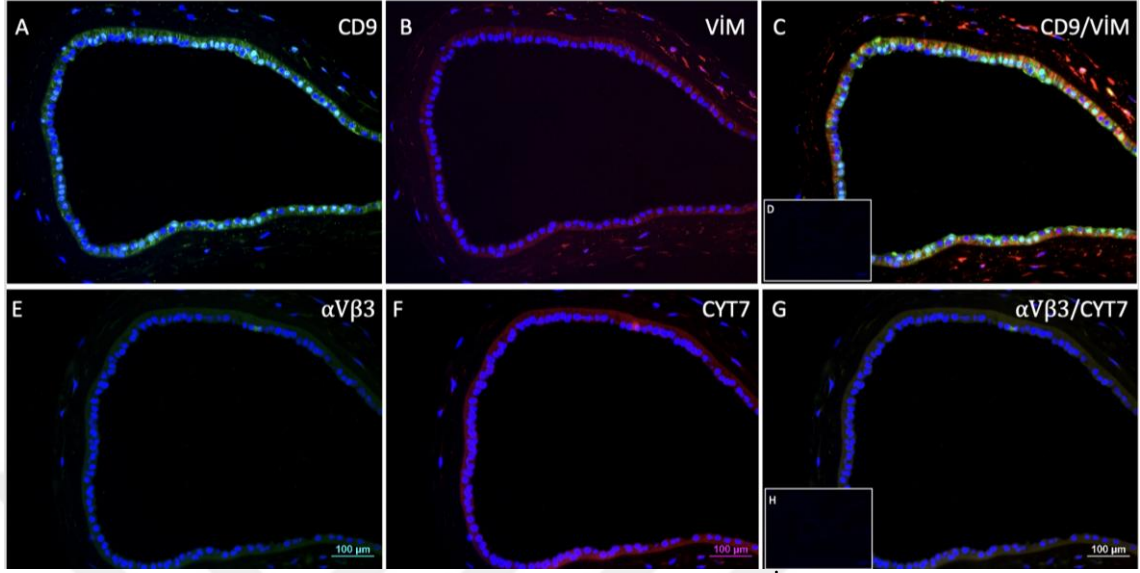
Şekil 4.10. PAS grubuna ait invazyon alanlarında maternal dokuda ve plasental villüslerdeki çiftli İmmü Floresan analiz sonuçları. Dokular hem CD9 hem de $\alpha V\beta 3$ integrin bakımından pozitif boyanma gösterdi. Her iki protein, Trofoblast belirteci olan Sitokeratin 7 ve desidual hücre belirteci olan Vimentin ile çiftli olarak boyanarak lokalizasyonları ve farklı bölgelerdeki ekspresyon yoğunlukları bakımından incelendi (CYT7: Sitokeratin 7, Vim: Vimentin) (10x).



Şekil 4.11. PAS grubuna ait invaze olan ektravillöz trofoblast tabakasını içeren Maternal kısmın Çiftli İmmünfloresan boyama bulguları (CYT7: Sitokeratin 7, Vim: Vimentin) (40x).



Şekil 4.12. PAS grubuna ait villöz kısmın Çiftli İmmünfloresan boyama bulguları (CYT7: Sitokeratin 7, Vim: Vimentin) (40x).



Şekil 4.13. PAS grubuna ait amniyon epitelini içeren fetal kısmın Çiftli İmmüno Floresan boyama bulguları. (40x).

Hücrelerdeki immunofloresan boyanma sonuçları tablo 4.1 de özetlenmiştir.

Tablo 4.1. İntegrin $\alpha V\beta 3$ ve CD9 proteinlerinin ekspresyonlarının farklı bölgelerdeki İmmüno Floresan boyanma sonuçları (EVT: Ekstravillöz Trofoblast hücreleri, CTB: Sitotrofoblast Hücreleri).

	Kontrol Grubu			Sezaryen Grubu			PAS grubu		
	EVT	CTB	Amniyon zarı epitel	EVT	CTB	Amniyon zarı epitel	EVT	CTB	Amniyon zarı epitel
İntegrin $\alpha V\beta 3$	++	++	+/-	+	++	++	+++	++	+/-
CD9	++	+++	+/-	+++	++	+	+++	++	++

İntegrin $\alpha V\beta 3$ 'in kontrol grubundaki en yüksek ekspresyon seviyesi Villuslardaki sinsisyotrofoblast tabakasında görülürken fetal kısmın amniyon epitel hücrelerinde ekspresyon çok azdır. Sezaryen grubunun Maternal desiduasındaki EVT hücrelerinde, Villöz Trofoblast hücrelerinde ve Fetal kısmın amniyon zarı epitel hücrelerinde ekspresyon genel olarak düşük seviyede tespit edildi. PAS grubunda ise Maternal kısımda EVT

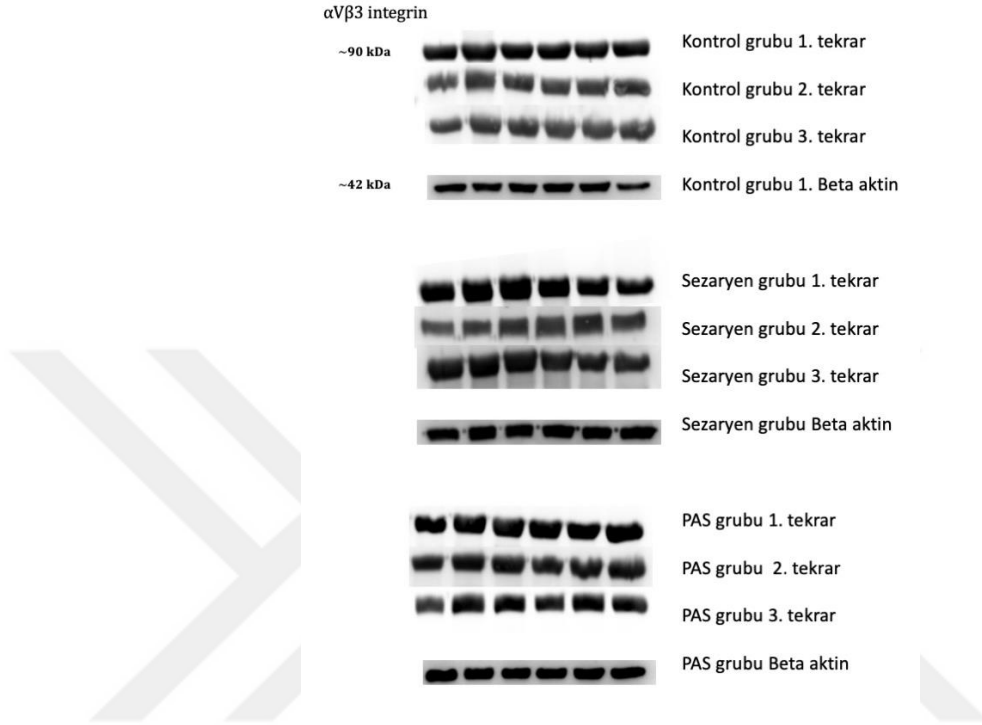
hücreleri en yüksek oranda integrin eksprese ederken Villuslarda da yoğun immun pozitif boyanma görüldü. PAS grubunda fetal kısımda ekspresyon çok azdır.

CD9 proteini tüm grupların Maternal kısmının desiduasındaki EVT hücrelerinde ve villuslarının Trofoblast hücrelerinde yüksek oranda ekspresyon gösterdi. Ancak Kontrol grubunun fetal kısmında amniyon zarı epitel hücrelerinde CD9 ekspresyonu yok denecek kadar azdı ve diğer gruplarda da Maternal ve Villöz kısımlar ile kıyaslandığında ekspresyon düşük seviyelerdedir.

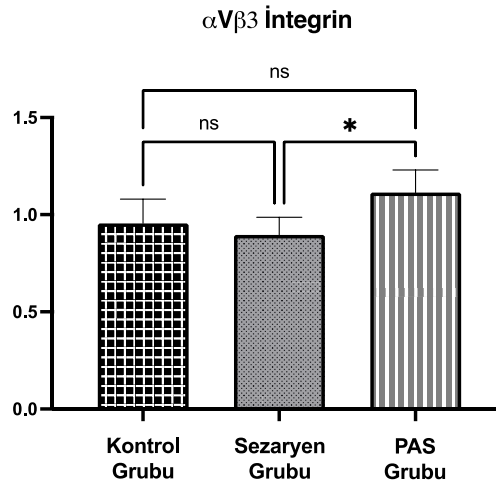
4.3. SDS-PAGE Western Blot Analizi Bulguları

Plasenta Akreata Spektrumlu gebelikler, herhangi bir patoloji gözlenmemiş Sezaryen doğum hastaları ve Kontrol grubu olarak normal doğum yapmış hastalardan alınan taze doku örnekleri ile Western Blot analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda tüm gruplardan alınan örneklerin içeriği CD9 ve $\alpha V\beta 3$ integrin proteinlerinin miktarları tespit edilmiştir. Araştırılan proteinlerin Western Blot bantlarının yoğunlukları İmage J programında ölçülerek her grubun kendi Beta aktin bantlarının yoğunluğuna göre normalize edilmiştir.

4.3.1. integrin $\alpha V\beta 3$ için SDS-PAGE Western Blot Analizi Bulguları



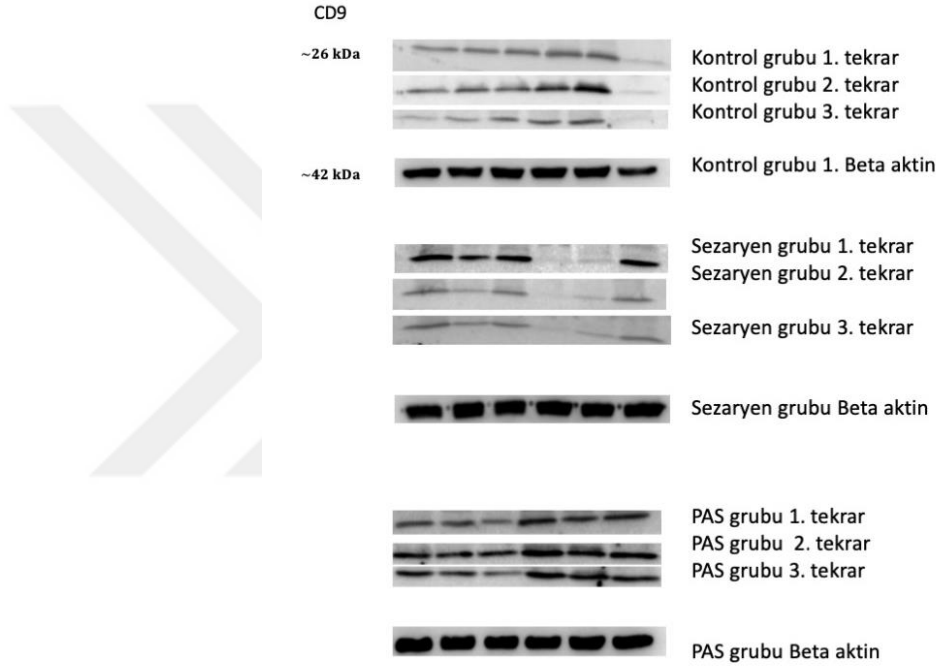
Şekil 4.14. $\alpha V\beta 3$ integrin için PAS, Sezaryen ve Kontrol gruplarında yapılan 3 tekrarlı Western Blot analiz sonuçları. (PAS grubu n=6, Sezaryen doğum grubu n=6, Kontrol grubu n=6)



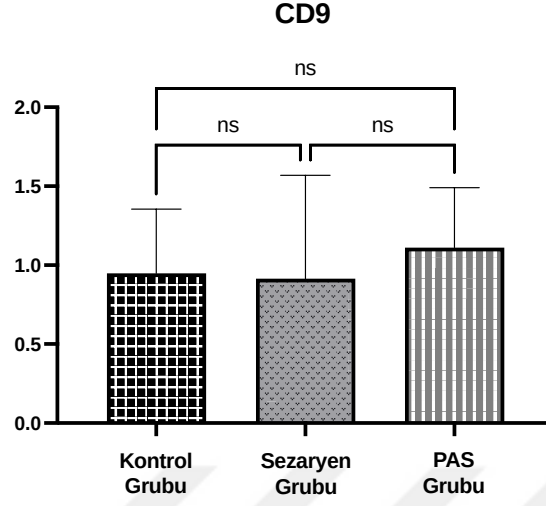
Şekil 4.15. Deney gruplarına ait plasenta ve histerektomi materyallerinden alınan dokuların $\alpha V\beta 3$ integrin için sonuç grafiği. Analiz sonuçlarına göre Plasenta Akreata Spektrumu grubu'nda Sezaryen doğum grubuna kıyasla anlamlı artış vardır. Sezaryen grubu en düşük ekspresyon seviyesine sahiptir ancak fark anlamlı değildir (*p<0,05, ns: non-spesifik)

Kontrol grubu, Sezaryen grubu ve PAS grubu ile mukayase edildiğinde $\alpha V\beta 3$ integrin protein miktarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi. Diğer taraftan Sezaryen grubuna göre PAS grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0,05$).

4.3.2. CD9 için SDS-PAGE Western Blot Analizi Bulguları



Şekil 4.16. CD9 proteini için PAS, Sezaryen ve kontrol gruplarında yapılan 3 tekrarlı Western Blot analiz sonuçları. (PAS grubu n=6, Sezaryen doğum grubu n=6, Kontrol grubu n=6)



Şekil 4.17. Deney gruplarına ait plasenta ve histerektomi materyallerinden alınan dokuların CD9 proteini için sonuç grafiği. Gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur (ns: non-spesifik).

CD9 protein miktarı gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark olmadığı belirlendi. PAS gurubunda en fazla miktarda CD9 protein varlığı tespit edildi.

5. TARTIŞMA

Plasenta Akreata Spektrum'u, günümüzde gebelikte ilişkili maternal mortalitenin başlıca sebeplerinden olan bir plasental anomalidir. Hastalık doğum esnasında plasentanın uterustan kendiliğinden ayrılamamasıyla karakterize edilir. Plasental hücreler olan trofoblast hücrelerinin daha invaziv bir fenotipte olduğu görülmektedir. Normalde invazyonu desiduada sınırlanan trofoblast hücreleri desiduanın çok daha ilerisine; miyometriyum ve hatta serosaya kadar invaze olabilir. Kendi içinde Akreata, İnkreata ve Perkreta olmak üzere 3 aşamaya sınıflandırılmıştır. Akreata'da histerektomi gerekmeksizin sezaryen doğum ile plasental ayrılma gerçekleşebilirken İnkreata ve Perkreta invaziv formlar olarak kabul edilir ve histerektomi gerektirir (Hecht ve ark. 2020). Hastalığa sebebiyet veren mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır ancak günümüzde artan insidansından dolayı giderek daha fazla sayıda çalışmanın araştırma konusu olmaktadır.

Hastalığın oluşma mekanizmasına dair çalışmalar çoğunlukla trofoblast hücrelerinin invaziv yönüne odaklanmaktadır. Özellikle de uterustaki engellenemeyen migratif ve invaziv özellikleri, bir kanser hücresinin agresif yayılcı yönü ile bağdaştırılmaktadır. Bu yüzden yapılan başlıca çalışmalarda kanser hücresinin motilite, migrasyon ve invazyon fenotipini destekleyen genler Trofoblast hücreleri üzerinde incelenmiştir. Bunun yanı sıra immün hücrelerin hastalığın gelişimine dair etkileri de çalışma konuları arasında yer almaktadır.

Kanser hücresi motilitesi ve invazyonu ile ilgili çalışmalar arasında kanser hücrelerinin ekstraselüler matriks proteinleri ile etkileşimleri dikkat çeken bir öneme sahiptir. Kanser hücreleri tarafından eksprese edilen integrinler, ekstraselüler matriks proteinleri ile kompleks oluşturarak hücrelerin hareketini sağlarlar. Bu yüzden de spesifik olarak integrinlere bağlanan RGD gibi peptitler hedef alınarak kanser gelişimini önlemeye yönelik terapötik tedavi araştırmaları yapılmaktadır. Bunlardan bir tanesi de $\alpha V\beta 3$ integrindir (Desgrosellier ve ark. 2010; Danhier ve ark. 2012; Carduner ve ark. 2014; Valdembri ve Serini 2021; Steiger ve ark. 2021).

$\alpha V\beta 3$ integrin, spesifik olarak RGD peptit bağlama bölgesine sahip bir integrin türüdür. İmplantasyon ve plasentasyon esnasında integrin ekspresyonu profilinde değişimler olduğu bilinmektedir ve invazyon öncesinde embriyonun apikal yüzeye adhezyonunu kolaylaştırabileceği bildirilmiştir (Merviel ve ark. 2001; Lessey 2002). Bunun yanı sıra PAS vakalarında $\alpha v\beta 3$ integrin'in ekspresyon durumunu inceleyen araştırmacılar, Placenta Percreata vakalarında $\alpha v\beta 3$ integrinin upregüle olduğu sonucuna ulaşmışlardır. (Weitzner ve ark. 2021).

Bilindiği kadarıyla CTB-EVT farklılaşması, kanser hücrelerinin de uğradığı bir Epitelyal-Mezenkimal Geçişin (EMT) sonucunda meydana gelmektedir. Epitelyal- Mezenkimal geçişin hücrelerin adhezyonunu ve invazyonunu desteklediği bilinmektedir. Günümüzde bu farklılaşmanın nasıl indüklendiği ve trofoblast invazyonunun desidua sınırlarında hangi mekanizmayla durdurulduğu bilinmemektedir (Duzyj ve ark. 2015, Illsley ve ark. 2020). Yapılan çalışmalarda EMT'de rol alan birçok molekül PAS vakalarında incelenmiştir ve anlamlı sonuçlar bulunmuştur. Ayrıca invaziv EVT'lerde EMT'nin bir özelliği olan sitokeratin 7 ve vimentin boyanmasının birlikte gözlemlendiğini belirterek PAS vakalarının trofoblastlarının kontrollere göre daha mezenkimal bir karakter gösterdiği sonucuna varmışlardır (Duzyj ve ark. 2015; Illsley ve ark. 2020).

CD9'un ilk olarak kanser hücrelerinin migrasyonunu inhibe ettiği ve hücre motilitesiyle ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Ikeyama ve ark. 1993). Daha sonra çeşitli integrinlerle ilişkili olduğu tespit edilmiştir ve bu integrin komplekslerine yönelik bir modülatör işlev gösterdiği bildirilmiştir (Berdichevski, 2001). CD9, hücre adhezyonunun ilk aşamalarında integrin-talin1 ve integrin-talin2 kompleksleri arasındaki moleküler değişimi kontrol eden ve integrin bazlı adhezyon yapıları oluşturan yardımcı bir protein olarak işlev görür. (Berdichevski ve Odintsova 1999). Yapılan çeşitli çalışmalara göre, CD9'un ekspresyonunun azalması integrin aracılı EVT migrasyonu arttırmaktadır (Powner ve ark. 2011; Fujiwara ve ark. 2018; Matsumoto ve ark. 2016). Özellikle Hirano ve arkadaşlarının 1999 yılında yayınladığı iki farklı çalışma CD9'un EVT invazyonuyla olan ilişkisini birçok açıdan değerlendirmektedir (Hirano ve ark. 1999a; 1999b).

Yaptığımız çalışmada, güncel olduğunu ve önem verilmesi gerektiğini düşündüğümüz bir hastalık olan Plasenta Akreata Spektrumunda gerçekleşen anormal trofoblast invazyonunu şimdiye kadar anlatılan bilgiler ışığında araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda, $\alpha\beta 3$ integrin ve CD9 protein ekspresyonlarını Western Blot ile kantitatif olarak analiz ettik. Aynı zamanda çiftli İmmünfloresan boyama ile proteinlerin lokalizasyonlarını ve ekspresyon yoğunluklarını belirledik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre hem $\alpha\beta 3$ integrin hem de CD9 proteini plasenta dokusunda mevcuttur.

CD9 için yapmış olduğumuz Çiftli İmmünfloresan boyamalara göre tüm gruplarda belirgin CD9 boyanmaları tespit ettik. Kontrol grubunda Maternal, Fetal ve Villöz kısımlarda yaptığımız incelemelerde villuslarda en çok immün pozitif boyanma belirlerken; maternal kısımlarda özellikle de Sitokeratin 7 ile karakterizasyonunu yaptığımız EVT hücrelerinde de yoğun boyanma gözlemledik. Sezaryen grubunda, kontrol grubuna kıyasla desiduadaki EVT'lerde daha yoğun boyanma gösterirken villuslarda villöz trofoblast hücrelerinde daha az ekspresyon gözlemlendi. Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında PAS grubunda ise Maternal kısımlarda desiduadaki EVT hücrelerinde, Villöz kısımda villöz trofoblastlarda ve Fetal kısımlarda amniyon zarı epitel hücrelerinde en yoğun ekspresyonlar gözlemlendi. Ancak gruplar arasında anlamlı bir ekspresyon yoğunluk farkı yoktur.

Hirano ve arkadaşlarının bulgularıyla paralel olarak tüm gruplarda amniyon zarının epitelyal hücrelerinde CD9 ekspresyonu farklı düzeylerde gözlenmiştir (Hirano ve ark. 1999b). Ayrıca yapmış olduğumuz CD9/CYT7 çiftli immün floresan boyanmalarında desiduada EVT hücrelerinin yanı sıra CD9 eksprese eden başka hücre tipleri de bulunduğu belirlendi. Bu hücrelerin karakterizasyonu için daha ayrıntılı çalışmalar gerekmektedir.

CD9 için gerçekleştirdiğimiz Western Blot analizlerinde Kontrol grubu (n=6), Sezaryen doğum grubu (n=6) ve PAS grubu (n=6)'ndan alınan örnekler protein miktarları bakımından karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda en yüksek protein miktarı PAS grubunda, en düşük protein miktarı sezaryen grubunda görülmüşse de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Gruplar arasında daha anlamlı bir kıyaslama yapılabilmesi için örneklem sayısının genişletilmesi gerekmektedir.

Özellikle kanser hücresi motilitesi ve migrasyonu ile olan ilişkisi birçok kez ortaya konmuş olan CD9, integrinlerle birlikte birçok hücre hareketlilik sürecini düzenlemektedir. Literatürdeki birçok çalışmaya ait bilgilere göre CD9 ekspresyonundaki azalma EVT invazyonunu arttırmaktadır. Ancak analizlerimiz sonucunda PAS'taki EVT hücrelerinin invazyonunda belirgin bir etkisi olmadığı görülmektedir.

$\alpha\beta 3$ integrin için yapmış olduğumuz Çiftli İmmü floresan boyamalara göre tüm gruplarda belirgin $\alpha\beta 3$ integrin boyanmaları tespit ettik. Kontrol grubunda Maternal, Fetal ve Villöz kısımlarda yaptığımız incelemelerde Maternal ve Villöz kısımlarda trofoblast hücrelerinde birbirine yakın düzeylerde boyanma yoğunluğu belirledik. Amniyon zarı epitel hücreleri de $\alpha\beta 3$ integrin bakımından pozitifdir. Sezaryen grubunda en yüksek ekspresyon plasental villuslarda görülmüştür ancak sezaryen grubu genel olarak en düşük integrin ekspresyonunun gözlemlendiği gruptur. Son olarak PAS grubunda ise Maternal kısmın desiduasındaki EVT'ler, villuslardaki trofoblast hücrelerine kıyasla integrin bakımından daha yoğun boyanma göstermiştir. PAS grubunun amniyon zarı epitel hücrelerinde boyanma oldukça azdı. Weitzner ve arkadaşları, PAS grubunun desiduasındaki invaze EVT'lerde villöz trofoblastlara ve kontrol grubuna kıyasla daha yüksek $\alpha\beta 3$ integrin ekspresyonu gözlemlediklerini bildirmişlerdir (Weitzner ve ark. 2020). Bu veriler bizim bulgularımızla uyumludur. Bu tezde $\alpha\beta 3$ integrin'in ekspresyonu ilk kez Normal doğum grubu, sezaryen doğum grubu ve PAS grubu olmak üzere 3 çalışma grubu arasında karşılaştırılmıştır.

$\alpha\beta 3$ integrin için gerçekleştirdiğimiz Western Blot analizlerinde Kontrol grubu (n=6), Sezaryen doğum grubu (n=6) ve PAS grubu (n=6)'ndan alınan örnekler protein miktarları bakımından karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda PAS grubu ve Kontrol grubu birbirine yakın bir ekspresyon değeri vermiştir. Sezaryen grubu ise diğer iki gruba kıyasla düşüş göstermiştir. PAS grubu ve sezaryen grubu arasındaki ekspresyon farkı ise istatistiksel olarak anlamlıdır. Analiz edilen bu anlamlı farklılık integrinin PAS patolojisinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Weitzner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada araştırmacılar kontrol grubu olarak sezaryen doğum plasentalarını kullanmışlardır. Normal doğumdan alınan plasentalardaki $\alpha\beta 3$ integrin ekspresyonuna dair veri sunmamışlardır. Bu tezde kontrol grubu olarak normal doğumdan alınan plasentalar

kullanılmıştır ve sezaryen doğum grubundan anlamlı olmasa da farklı düzeyde ekspresyon gösterdiği bulunmuştur.

Sezaryen grubunda anlamlı bir düşüş gösteren $\alpha\beta3$ integrin ekspresyonu, sezaryen skarının etkisiyle ve farklı regülatör mekanizmalar aracılığıyla artarak PAS gelişiminde etkin rol oynuyor olabilir.

Ayrıca PAS grubunda desiduaya invaze olmuş EVT'ler için yaptığımız Çiftli İmmünfloresan boyamalarda invaziv EVT hücrelerinde belirgin düzeyde vimentin boyanması görülmüştür. Bu bulgumuz, araştırmacıların (Duzyj ve ark. 2015, Illsley ve ark. 2020) invaziv EVT'lerde EMT'nin bir özelliği olan sitokeratin 7 ve vimentin boyanmasının birlikte gözlenmesi ve PAS vakalarının trofoblastlarının kontrollere göre daha mezenkimal bir karakter göstermesi bulguları ile uyumludur.

Yaptığımız çalışmanın sonucunda CD9 ve $\alpha\beta3$ integrin analiz sonuçlarının anlamlılıklarına göre, her iki molekülün PAS mekanizmasında aynı süreci birincil olarak birlikte regüle etmesi muhtemel gözükmemektedir. Ancak $\alpha\beta3$ integrin, başka mekanizmalar aracılığıyla PAS patolojisinde etkin rol oynuyor olabilir. Ayrıca yaptığımız çalışmada gruptaki kişi sayıları arttırılırsa her iki protein için çok daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Plasenta Akreata Spektrumu'nda gerçekleşen anormal trofoblast invazyonu mekanizması için aday iki protein incelendi. Bu iki proteinin birbirleriyle ortak bir mekanizmayı yöneterek PAS patolojisini regüle edebilecekleri hipotezinden yola çıkıldı. Bir hücre adhezyon molekülü olan $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin'in ve çeşitli integrinlerle kompleks oluşturarak hücrelerin motilitesini regüle eden CD9'un protein ekspresyon değerleri ve dokulardaki lokalizasyonu değerlendirildi.

Sonuç olarak;

1. $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin protein miktarı, tekrarlayan Sezaryen skarı bulunan hastaların plasentalarında daha düşük miktardadır. Buna karşın PAS grubunda ise sezaryen grubundan anlamlı olarak daha yüksek protein miktarı tespit edildi.
2. Kontrol grubu, $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin ekspresyonu bakımından PAS grubuna yakın bir sonuç gösterdi. Sezaryen grubu her ikisinden daha düşük ekspresyona sahiptir.
3. Kontrol grubundan farklı olarak sezaryen skarı nedeniyle gerçekleşen bir süreç PAS oluşumuna sebep olabilir. Sezaryen skarı, $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin'in ekspresyon patternlerinde değişime neden olabilir ve altta yatan başka mekanizmalar ile PAS anomalisinin gelişimini düzenleyebilir.
4. Tüm gruplar karşılaştırıldığında CD9 ekspresyonunun PAS grubunda en yüksek seviyede olduğu görüldü ancak istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur. Literatür bilgilerimize göre CD9 ekspresyonunun azalması EVT hücre invazyonunu arttırmaktadır. Dolayısıyla elde edilen sonuçlarımıza göre CD9, PAS anomalisinin gelişiminde primer bir rol üstlenmemektedir.
5. PAS grubunda invaze halde bulunan EVT'lerde vimentin ekspresyonu görüldü. Bu bulgu, invaziv EVT'lerde EMT'nin bir özelliği olan Sitokeratin 7 ve vimentin boyanmasının birlikte gözlenmesi ve PAS vakalarının trofoblastlarının kontrollere göre daha mezenkimal bir karakter göstermesi bulguları ile uyumludur (Duzyj ve ark. 2015, Illsley ve ark. 2020).

6. CD9/CYT7 çiftli boyamalarında desiduada EVT hücrelerinin yanı sıra CD9 eksprese eden başka hücre tiplerinin de varlığı tespit edildi. Bu hücrelerin karakterizasyonu için daha ayrıntılı çalışmalar gerekmektedir.
7. $\alpha\beta3$ integrin, PAS grubunun invaze EVT'lerinde plasental villuslara oranla daha yüksek oranda eksprese edilmektedir.

Aşırı invaziv trofoblast davranışı için CD9 yerine $\alpha\beta3$ integrini modüle eden başka mekanizmaların varlığı araştırılmalıdır.



KAYNAKLAR

Achache, H., Revel, A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*. 2006; 12(6):731-46.

Ali, H., Chandraharan, E. Etiopathogenesis and risk factors for placental accreta spectrum disorders. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2021; 72:4-12.

Ashary, N., Tiwari, A., Modi, D. Embryo Implantation: War in Times of Love. *Endocrinology*. 2018;159(2):1188-1198.

Badr, D.A., Al Hassan, J., Salem Wehbe, G., Ramadan, M.K. Uterine body placenta accreta spectrum: A detailed literature review. *Placenta*. 2020; 95:44-52.

Baldwin, H.J., Patterson, J.A., Nippita, T.A., Torvaldsen, S., Ibiebele, I., Simpson, J.M., Ford, J.B. Antecedents of Abnormally Invasive Placenta in Primiparous Women: Risk Associated With Gynecologic Procedures. *Obstet Gynecol*. 2018;131(2):227-233.

Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 2010; 339(1):269-280.

Bartels, H.C., Postle, J.D., Downey, P., Brennan, D.J. Placenta Accreta Spectrum: A Review of Pathology, Molecular Biology, and Biomarkers. *Dis Markers*. 2018; 2018:1507674.

Bassani, S., Cingolani, L.A. Tetraspanins: Interactions and interplay with integrins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 May;44(5):703-8.

Benirschke, K. The Placenta: Structure and Function. *Neoreviews* (2004) 5 (6): e252–e261.

Benirschke, K., Burton G.J., Baergen R.N. Early Development of the Human Placenta. In: *Pathology of the Human Placenta*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2012.

Berditchevski F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 23):4143-51.

Berditchevski, F., Gilbert, E., Griffiths, M. R., Fitter, S., Ashman, L., Jenner, S. J. Analysis of the CD151- $\alpha 3\beta 1$ integrin and CD151-tetraspanin interactions by mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(44):41165-74.

Berditchevski, F., Odintsova, E. "Tetraspanins as regulators of protein trafficking." *Traffic* 2007;8:89–96.

Berditchevski, F., Odintsova, E. Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *The Journal of Cell Biology*, 1999; 146(2), 477–492.

Berman, A.E., Kozlova, N.I., Morozovich, G.E. Integrins: structure and signaling. *Biochemistry (Mosc).* 2003; 68(12):1284-99.

Betran, A.P., Ye, J., Moller, A.B., Zhang, J., Gülmezoglu, A.M., Torloni, M.R. Boucheix, C., Rubinstein, E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58(9):1189-205.

Boyd, J. D., Hamilton, W. J. *The Human Placenta.* Cambridge [England] Heffer, 1970.

Budhwar, S., Singh, V., Verma, P., Singh, K. Fertilization failure and gamete health: Is there a link? *Front Biosci (Schol Ed).* 2017;9(3):395-419.

Burke, S.D., Zsengellér, Z.K., Karumanchi, S.A., Shainker, S.A. A mouse model of placenta accreta spectrum. *Placenta.* 2020; 99:8-15.

Büke, B., Akkaya, H., Demir, S., Sağol, S., Şimşek, D., Başol, G., Barutçuoğlu, B. Relationship between first trimester aneuploidy screening test serum analytes and placenta accreta. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018 Jan;31(1):59-62.

Cali, G., Timor-Tritsch, I.E., Palacios-Jaraquemada, J., Monteagudo, A., Buca, D., Forlani, F., Familiari, A., Scambia, G., Acharya, G., D'Antonio, F. Outcome of Cesarean scar pregnancy managed expectantly: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2018; 51:169–175.

Campbell, I.D., Humphries, M.J. Integrin structure, activation, and interactions. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Mar 1;3(3):a004994.

Carduner, L., Leroy-Dudal, J., Picot, C.R., Gallet, O., Carreiras, F., Kellouche, S. Ascites-induced shift along epithelial-mesenchymal spectrum in ovarian cancer cells: Enhancement of their invasive behavior partly dependant on α_v integrins. Clin Exp Metastasis. 2014 Aug;31(6):675-88.

Carusi, D.A. The Placenta Accreta Spectrum: Epidemiology and Risk Factors. Clin Obstet Gynecol. 2018 Dec;61(4):733-742.

Carusi, D.A., Fox, K.A., Lyell, D.J., Perlman, N.C., Aalipour, S., Einerson, B.D., Belfort, M.A., Silver, R.M., Shamshirsaz, A.A. Placenta Accreta Spectrum Without Placenta Previa. Obstet Gynecol. 2020 Sep;136(3):458-465.

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.

Castro-Sanchez, L., Soto-Guzman, A., Navarro-Tito, N., Martinez-Orozco, R., Salazar, E.P. Native type IV collagen induces cell migration through a CD9 and DDR1-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. Eur. J. Cell Biol. 2010; 89, 843–852.

Chen, Y., Zhang, H., Han, F., Yue, L., Qiao, C., Zhang, Y., Dou, P., Liu, W., Li, Y. The depletion of MARVELD1 leads to murine placenta accreta via integrin β_4 -dependent trophoblast cell invasion. J Cell Physiol. 2018; 233(3):2257-2269.

Comstock, C.H. Antenatal diagnosis of placenta accreta: a review. Ultrasound Obstet Gynecol. 2005 Jul;26(1):89-96.

Cross JC. Placental function in development and disease. Reprod Fertil Dev. 2006;18(1-2):71-6.

Danhier, F., Le Breton, A., Pr  at, V. RGD-based strategies to target $\alpha_v\beta_3$ integrin in cancer therapy and diagnosis. Mol Pharm. 2012 Nov 5;9(11):2961-73.

D'Antonio, F., Palacios-Jaraquemada, J., Timor-Trisch, I., Cali, G. Placenta accreta spectrum disorders: Prenatal diagnosis still lacks clinical correlation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2018 Jul;97(7):773-775.

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 Jul 1-15;38(1-2):29-41.

Desai, N., Krantz, D., Roman, A., Fleischer, A., Boulis, S., Rochelson, B. Elevated first trimester PAPP--a is associated with increased risk of placenta accreta. *Prenat Diagn.* 2014 Feb;34(2):159-62.

Desgrosellier, J.S., Cheresch, D.A. Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(1):9–22

Di Mascio, D., Cali G., D'antonio. F. Updates on the management of placenta accreta spectrum. *Minerva Ginecologica*, 2019;71(2):113-120.

Doulaveris, G., Ryken, K., Papathomas, D., Estrada Trejo, F., Fazzari, M.J., Rotenberg, O., Stone, J., Roman, A.S., Dar, P. Early prediction of placenta accreta spectrum in women with prior cesarean delivery using transvaginal ultrasound at 11 to 14 weeks. *Am J Obstet Gynecol MFM.* 2020 Nov;2(4):100183.

Dreux, S., Salomon, L.J., Muller, F., Goffinet, F., Oury, J.F; ABA Study Group, Sentilhes, L. Second-trimester maternal serum markers and placenta accreta. *Prenat Diagn.* 2012 Oct;32(10):1010-2.

Duzyj, C.M., Buhimschi, I.A., Motawea, H., Laky, C.A., Cozzini, G., Zhao, G., Funai, E.F., Buhimschi, C.S. The invasive phenotype of placenta accreta extravillous trophoblasts associates with loss of E-cadherin. *Placenta.* 2015 Jun;36(6):645-51.

Einerson, B.D., Comstock, J., Silver, R.M., Branch, D.W., Woodward, P.J., Kennedy, A. Placenta Accreta Spectrum Disorder: Uterine Dehiscence, Not Placental Invasion. *Obstet Gynecol.* 2020 May;135(5):1104-1111.

Einerson, B.D., Straubhar, A., Soisson, S., Szczotka, K., Dodson, M.K., Silver, R.M., Soisson, A.P. Hyperglycosylated hCG and Placenta Accreta Spectrum. *Am J Perinatol.* 2019 Jan;36(1):22-26.

Enders, A. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *Am J Anat* 1967;125,1–29.

Ernst, L.M., Carreon C.K. Placenta. In: Ernst L., Ruchelli E., Carreon C., Huff D. (eds) *Color Atlas of Human Fetal and Neonatal Histology.* Springer, Cham. 2019.

Esh-Broder, E., Ariel, I., Abas-Bashir, N., Bdolah, Y., Celnikier, D.H. Placenta accreta is associated with IVF pregnancies: a retrospective chart review. *BJOG.* 2011 Aug;118(9):1084-9.

Feng, Y., Ma, X., Deng, L., Yao, B., Xiong, Y., Wu, Y., Wang, L., Ma, Q., Ma, F. Role of selectins and their ligands in human implantation stage. *Glycobiology.* 2017 May 1;27(5):385-391.

Fernandez, C., Clark, K., Burrows, L., Schofield, N.R., Humphries, M.J. Regulation of the extracellular ligand binding activity of integrins. *Front Biosci.* 1998 Jul 2;3:d684-700.

Fitzpatrick, K.E., Sellers, S., Spark, P., Kurinczuk, J.J., Brocklehurst, P., Knight, M. Incidence and risk factors for placenta accreta/increta/percreta in the UK: a national case-control study. *PLoS One.* 2012;7(12):e52893.

Fragouli, E., Wells, D. Aneuploidy in the human blastocyst. *Cytogenet Genome Res.* 2011;133(2-4):149-59.

Fu, G., Wang, W., Luo, BH. Overview: structural biology of integrins. *Methods Mol Biol.* 2012;757:81-99.

Fujiwara, H., Matsumoto, H., Sato, Y., Horie, A., Ono, A., Nakamura, M., Mizumoto, Y., Kagami, K., Fujiwara, T., Hattori, A., Maida, Y., Daikoku, T., Imakawa, K., Araki, Y. Factors Regulating Human Extravillous Trophoblast Invasion: Chemokine-peptidase and CD9-integrin Systems. *Curr Pharm Biotechnol.* 2018;19(10):764-770.

Garimi, G., Salim, R. Epidemiology, etiology, diagnosis, and management of placenta accreta. *Obstet Gynecol Int.* 2012;2012:873929.

Gille, J., Swerlick, R.A. Integrins: role in cell adhesion and communication. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;797:93-106.

Gude, N.M., Roberts, C.T., Kalionis, B., King, R.G. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res.* 2004;114(5-6):397-407.

Hecht, J.L., Baergen, R., Ernst, L.M., Katzman, P.J., Jacques, S.M., Jauniaux, E., Khong, T.Y., Metlay, L.A., Poder, L., Qureshi, F., Rabban 3rd J.T., Roberts, D.J., Shainker, S., Heller D.S. Classification and reporting guidelines for the pathology diagnosis of placenta accreta spectrum (PAS) disorders: recommendations from an expert panel. *Modern Pathology*, 2020; 33(12):2382-2396.

Hemler, M.E. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* 2001;155:1103–7.

Hemler, M.E. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:801–11.

Hemler, M.E. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:397–422.

Hertig, A.T., Rock, J., Adams, E.C. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am J Anat.* 1956 May;98(3):435-93.

Hirano, T., Higuchi, T., Katsuragawa, H., Inoue, T., Kataoka, N., Park, K.R., Ueda, M., Maeda, M., Fujiwara, H., Fujii, S. CD9 is involved in invasion of human trophoblast-like choriocarcinoma cell line, BeWo cells. *Mol Hum Reprod.* 1999 Feb;5(2):168-74. A

Hirano, T., Higuchi, T., Ueda, M., Inoue, T., Kataoka, N., Maeda, M., Fujiwara, H., Fujii, S., 1999. “CD9 is expressed in extravillous trophoblasts in association with integrin alpha3 and integrin alpha5.”, *Mol Hum Reprod.* 1999 Feb;5(2):162-7. B

Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K., Suzuki, A., Alarcon, V.B., Akimoto, K., Hirai, T., Hara, T., Adachi, M., Chida, K., Ohno, S., Marikawa, Y., Nakao, K., Shimono, A., Sasaki, H. Polarity-dependent distribution of angiotensin II localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr Biol.* 2013 Jul 8;23(13):1181-94.

Hobson, S.R., Kingdom, J.C., Murji, A., Windrim, R.C., Carvalho, J.C.A., Singh, S.S., Ziegler, C., Birch, C., Frecker, E., Lim, K., Cargill, Y., Allen, L.M. No. 383-Screening, Diagnosis, and Management of Placenta Accreta Spectrum Disorders. *J Obstet Gynaecol Can.* 2019;41(7):1035-1049.

Horcajadas, J.A., Díaz-Gimeno, P., Pellicer, A., Simón, C. Uterine receptivity and the ramifications of ovarian stimulation on endometrial function. *Semin Reprod Med.* 2007 Nov;25(6):454-60.

Horton, M.A. The $\alpha\beta3$ integrin "vitronectin receptor". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* Volume 29, Issue 5, May 1997, Pages 721-725.

Hung, T.H., Shau, W.Y., Hsieh, C.C., Chiu, T.H., Hsu, J.J., Hsieh, T.T. Risk factors for placenta accreta. *Obstet Gynecol.* 1999 Apr;93(4):545-50.

Huppertz, B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol.* 2008;61(12):1296-302.

Ikeyama, S., Koyama, M., Yamaoka, M., Sasada, R. and Miyake, M. Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *J. Exp. Med.* 1993;177, 1231–1237.

Illsley, N.P., DaSilva-Arnold, S.C., Zamudio, S., Alvarez, M., Al-Khan, A. Trophoblast invasion: Lessons from abnormally invasive placenta (placenta accreta). *Placenta.* 2020 Dec;102:61-66.

Irving, C., Hertig, A.T. A study of placenta accreta. *Surgery, Gynecol Obstet.* 1937;64:178–200.

Jauniaux, E., Ayres-de-Campos, D., Langhoff-Roos, J., Fox, K.A., Collins, S.; FIGO Placenta Accreta Diagnosis and Management Expert Consensus Panel. FIGO

classification for the clinical diagnosis of placenta accreta spectrum disorders. *Int J Gynaecol Obstet*. 2019;146(1):20-24.

Jauniaux, E., Burton, G.J. Pathophysiology of Placenta Accreta Spectrum Disorders: A Review of Current Findings. *Clin Obstet Gynecol*. 2018 Dec;61(4):743-754.

Jauniaux, E., Collins, S., Burton, G.J. Placenta accreta spectrum: pathophysiology and evidence-based anatomy for prenatal ultrasound imaging. *Am J Obstet Gynecol*. 2018 Jan;218(1):75-87.

Jauniaux, E., Zosmer, N., Subramanian, D., Shaikh, H., Burton, G.J. Ultrasound-histopathologic features of the utero-placental interface in placenta accreta spectrum. *Placenta*. 2020 Aug;97:58-64.

Jiang, X., Zhang, J., Huang, Y. Tetraspanins in cell migration. *Cell Adh Migr*. 2015;9(5):406-15.

Johnson, J.L., Winterwood, N., DeMali, K.A., Stipp, C.S. Tetraspanin CD151 regulates RhoA activation and the dynamic stability of carcinoma cell-cell contacts. *J Cell Sci* 2009; 122:2263-73.

Kadry, Y.A., Calderwood, D.A. Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2020 May 1;1862(5):183206.

Kaser, D.J., Melamed, A., Bormann, C.L., Myers, D.E., Missmer, S.A., Walsh, B.W., Racowsky, C., Carusi, D.A. Cryopreserved embryo transfer is an independent risk factor for placenta accreta. *Fertil Steril*. 2015 May;103(5):1176-84.e2.

Keramidas, M., Lavaud, J., Sergent, F., Hoffmann, P., Brouillet, S., Feige, J.J., Coll, J.L., Alfaidy, N. Noninvasive and quantitative assessment of in vivo fetomaternal interface angiogenesis using RGD-based fluorescence. *Biomed Res Int*. 2014;2014:309082.

Kim, S.M., Kim, J.S. A Review of Mechanisms of Implantation. *Dev Reprod*. 2017;21(4):351-359.

Knöfler, M., Haider, S., Saleh, L., Pollheimer, J., Gamage, T.KJ.B., James, J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cell Mol Life Sci.* 2019 Sep;76(18):3479-3496.

Kolesnikova, T.V., Stipp, C.S., Rao, R.M., Lane, W.S., Luscinskas, F.W. and Hemler, M.E. EWI-2 modulates lymphocyte integrin $\alpha 4 \beta 1$ functions. *Blood* 2004;103, 3013–3019.

Kupferminc, M.J., Tamura, R.K., Wigton, T.R., Glassenberg, R., Socol, M.L. Placenta accreta is associated with elevated maternal serum alpha-fetoprotein. *Obstet Gynecol.* 1993;82(2):266-9.

LaFlamme, S.E., Auer, K.L. Integrin signaling. *Semin Cancer Biol.* 1996 Jun;7(3):111-8.

Lang, T., Hochheimer, N. Tetraspanins. *Curr Biol.* 2020 Mar 9;30(5):R204-R206.

Lessey, B.A. Adhesion molecules and implantation. *J Reprod Immunol.* 2002 May-Jun;55(1-2):101-12.

Lessey, B.A., Damjanovich, L., Coutifaris, C., Castelbaum, A., Albelda, S.M., Buck, C.A. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest.* 1992;90:188–195.

Levy, S., Shoham, T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 2005;5:136–48.

Li, Q., Lan, T., Xie, J., Lu, Y., Zheng, D., Su, B. Integrin-Mediated Tumorigenesis and Its Therapeutic Applications. *Frontiers in oncology*, 2022;12, 812480.

Liu, Y., Fan, X., Wang, R., Lu, X., Dang, Y.L., Wang, H., Lin, H.Y., Zhu, C., Ge, H., Cross, J.C., Wang, H. Single-cell RNA-seq reveals the diversity of trophoblast subtypes and patterns of differentiation in the human placenta. *Cell Res.* 2018 Aug;28(8):819-832.

Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., Wainscoat, J.S. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997 Aug 16;350(9076):485-7.

Long, Y., Jiang, Y., Zeng, J., Dang, Y., Chen, Y., Lin, J., Wei, H., Xia, H., Long, J., Luo, C., Chen, Z., Huang, Y., & Li, M. The expression and biological function of chemokine CXCL12 and receptor CXCR4/CXCR7 in placenta accreta spectrum disorders. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2020;24(5), 3167–3182.

Luke, R.K., Sharpe, J.W., Greene ,R.R. Placenta accreta: The adherent or invasive placenta. *Am J Obstet Gynecol*. 1966;95:660–668.

Luo, B.H., Carman, C.V., Springer, T.A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:619-647.

Lyall, F. Mechanisms regulating cytotrophoblast invasion in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2006;46:266–273.

Maltepe, E., Fisher, S.J. Placenta: the forgotten organ. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2015;31:523-52.

Matsumoto, H., Sato, Y., Horie, A., Suginami, K., Tani, T., Hattori, A., Araki, Y., Kagami, K., Konishi, I., Fujiwara H. CD9 suppresses human extravillous trophoblast invasion. *Placenta*. 2016 Nov;47:105-112.

Matsuzaki, S., Nagase ,Y., Takiuchi, T., Kakigano, A., Mimura, K., Lee, M., Matsuzaki, S., Ueda, Y., Tomimatsu, T., Endo, M., Kimura, T.. Antenatal diagnosis of placenta accreta spectrum after in vitro fertilization-embryo transfer: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2021 Apr 28;11(1):9205.

Matsuzaki, S., Ueda, Y., Nagase, Y., Matsuzaki, S., Kakuda, M., Kakuda, S., Sakaguchi, H., Hisa, T., Kamiura, S. Placenta Accreta Spectrum Disorder Complicated with Endometriosis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomedicines*. 2022 Feb 6;10(2):390.

McDuffie, R.S. Jr, Harkness, L., McVay, R.M., Haverkamp, A.D. Midtrimester hemoperitoneum caused by placenta percreta in association with elevated maternal serum alpha-fetoprotein level. *Am J Obstet Gynecol*. 1994 Aug;171(2):565-6.

McNally, L., Zhou, Y., Robinson, J.F., Zhao, G., Chen, L.M., Chen, H., Kim, M.Y., Kapidzic, M., Gormley, M., Hannibal, R., Fisher, S.J. Up-regulated cytotrophoblast DOCK4 contributes to over-invasion in placenta accreta spectrum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Jul 7;117(27):15852-15861.

Merviel, P., Challier, J.C., Carbillon, L., Foidart, J.M., Uzan, S. The role of integrins in human embryo implantation. *Fetal Diagn Ther*. 2001 Nov-Dec;16(6):364-71.

Mezu-Ndubuisi, O.J., Maheshwari, A. The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatr Res* 2021;89, 1619–1626.

Morlando, M., Collins, S. Placenta Accreta Spectrum Disorders: Challenges, Risks, and Management Strategies. *Int J Womens Health*. 2020 Nov 10;12:1033-1045.

Murayama, Y., Shinomura, Y., Oritani, K., Miyagawa, J., Yoshida, H., Nishida, M., Katsube, F., Shiraga, M., Miyazaki, T., Nakamoto, T., Tsutsui, S., Tamura, S., Higashiyama, S., Shimomura, I., Hayashi, N. The tetraspanin CD9 modulates epidermal growth factor receptor signaling in cancer cells. *J. Cell Physiol*. 2008;216, 135–143.

Nievers, M.G., Schaapveld, R.Q., Sonnenberg, A. Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol*. 1999 Feb;18(1):5-17.

Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R.O., Ogonuki, N., Makita, R., Kurihara, H., Morin-Kensicki, E.M., Nojima, H., Rossant, J., Nakao, K., Niwa, H., Sasaki, H. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev. Cell* 2009;16:398–410.

Nishioka, N., Yamamoto, S., Kiyonari, H., Sato, H., Sawada, A, Ota, M., Nakao, K., Sasaki, H. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech. Dev*. 2008;125:270–83.

Norwitz, E.R., Schust, D.J., Fisher, S.J. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med*. 2001 Nov 8;345(19):1400-8.

Ochoa-Bernal, M.A., Fazleabas, A.T. Physiologic Events of Embryo Implantation and Decidualization in Human and Non-Human Primates. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1973.

Panaiteanu, A.M., Ciobanu, A.M., Gică, N., Peltecu, G., Botezatu, R. Diagnosis and Management of Cesarean Scar Pregnancy and Placenta Accreta Spectrum: Case Series and Review of the Literature. *J Ultrasound Med.* 2021 Sep;40(9):1975-1986.

Piñas Carrillo, A., Chandrahara, E. Placenta accreta spectrum: Risk factors, diagnosis and management with special reference to the Triple P procedure. *Womens Health (Lond).* 2019 Jan-Dec;15:1745506519878081.

Plitman-Mayo, R., Olsthoorn, J., Charnock-Jones, D.S., Burton, G.J., Oyen, M.L. Computational modeling of the structure-function relationship in human placental terminal villi. *J Biomech.* 2016 Dec 8;49(16):3780-3787.

Powner, D., Kopp, P.M., Monkley, S.J., Critchley, D.R., Berditchevski, F. Tetraspanin CD9 in cell migration. *Biochem Soc Trans.* 2011;39(2):563-7.

Psychoyos, A. Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam Horm* 1973;31,205–225.

Rubinstein, E. The complexity of tetraspanins. *Biochem Soc Trans.* 2011;39(2):501-5.

Salmanian, B., Fox, K.A., Arian, S.E., Erfani, H., Clark, S.L., Aagaard, K.M., Detlefs, S.E., Aalipour, S., Espinoza, J., Nassr, A.A., Gibbons, W.E., Shamshirsaz, A.A., Belfort, M.A., Shamshirsaz, A.A. In vitro fertilization as an independent risk factor for placenta accreta spectrum. *Am J Obstet Gynecol.* 2020 Oct;223(4):568.e1-568.e5.

Sánchez-Mateos, P., Cabañas, C., Sánchez-Madrid, F. Regulation of integrin function. *Semin Cancer Biol.* 1996 Jun;7(3):99-109.

Sehring, J., Beltsos, A., Jeelani, R. Human implantation: The complex interplay between endometrial receptivity, inflammation, and the microbiome. *Placenta.* 2022 Jan;117:179-186.

Serov, A.S., Salafia, C., Grebenkov, D.S., Filoche, M. The role of morphology in mathematical models of placental gas exchange. *J Appl Physiol* (1985). 2016 Jan 1;120(1):17-28.

Shim, J.Y., Hong, S.Y., Won, H.S., Lee, P.R., Kim, A. Conservative multidisciplinary management of placenta percreta following in vitro fertilization. *Obstet Gynecol Sci*. 2013 May;56(3):194-7.

Silver, R.M., Barbour, K.D. Placenta accreta spectrum: accreta, increta, and percreta. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2015 Jun;42(2):381-402.

Simon, C., Martin, J.C., Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2000;14,815–826

Slupsky, J. R., Seehafer, J. G., Tang, S.-C., Masellis-Smith, A., Shaw, A. R. E. Evidence that monoclonal antibodies against CD9 antigen induce specific association between CD9 and the platelet glycoproteinIIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem*. 1989;264, 12289-12293.

Society of Gynecologic Oncology; American College of Obstetricians and Gynecologists and the Society for Maternal–Fetal Medicine, Cahill, A.G., Beigi, R., Heine, R.P., Silver, R.M., Wax, J.R. Placenta Accreta Spectrum. *Am J Obstet Gynecol*. 2018 Dec;219(6):B2-B16.

Sonnenberg, A. Integrins and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1993;184:7-35.

Srisajjakul, S., Prapaisilp, P., Bangchokdee, S. Magnetic Resonance Imaging of Placenta Accreta Spectrum: A Step-by-Step Approach. *Korean J Radiol*. 2021;22(2):198-212.

Steiger, K., Quigley, N. G., Groll, T., Richter, F., Zierke, M. A., Beer, A. J., Weichert, W., Schwaiger, M., Kossatz, S., & Notni, J. There is a world beyond $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin: Multimeric ligands for imaging of the integrin subtypes $\alpha\text{v}\beta 6$, $\alpha\text{v}\beta 8$, $\alpha\text{v}\beta 3$, and $\alpha 5\beta 1$ by positron emission tomography. *EJNMMI research*, 2021;11(1), 106.

Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V., Hemler, M.E. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci*. 2003 Feb;28(2):106-12.

Sutherland, A.E., Calarco, P.G., Damsky, C.H. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development*. 1993 Dec;119(4):1175-86.

Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., de Pereda, J.M., Ginsberg, M.H., Calderwood, D.A. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science*. 2003 Oct 3;302(5642):103-6.

Takada, Y., Ye, X., Simon, S. The integrins. *Genome Biol*. 2007;8(5):215.

Termini, C.M., Gillette, J.M. Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling. *Front Cell Dev Biol*. 2017 Apr;6;5:34.

The increasing trend in caesarean section rates: global, regional and national estimates: 1990-2014. *PloS One*. 2016;11:e014843.

Timor-Tritsch, I.E., Monteagudo, A., Cali, G., D'Antonio, F., Kaelin Agten, A. Cesarean Scar Pregnancy: Diagnosis and Pathogenesis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2019 Dec;46(4):797-811.

Tinari, S., Buca, D., Cali, G., Timor-Tritsch, I., Palacios-Jaraquemada, J., Rizzo, G., Lucidi, A., Di Mascio, D., Liberati, M., D'Antonio, F. Risk factors, histopathology and diagnostic accuracy in posterior placenta accreta spectrum disorders: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2021 Jun;57(6):903-909.

Tocci, A. The unknown human trophoctoderm: implication for biopsy at the blastocyst stage. *J Assist Reprod Genet*. 2020 Nov;37(11):2699-2711.

Turco, M.Y., Moffett, A. Development of the human placenta. *Development*. 2019;146(22):dev163428.

Valdembri, D., Serini, G. The roles of integrins in cancer. *Fac Rev*. 2021;10:45.

Varlas, V.N., Bors, R.G., Birsanu, S., Maxim, B., Clotea, E., Mihailov, M. Maternal and fetal outcome in placenta accreta spectrum (PAS) associated with placenta previa: a retrospective analysis from a tertiary center. *J Med Life*. 2021 May-Jun;14(3):367-375.

Wang, F., Chen, S., Wang, J., Wang, Y., Ruan, F., Shu, H., Zhu, L., Man, D. First trimester serum PAPP-A is associated with placenta accreta: a retrospective study. *Arch Gynecol Obstet*. 2021;303(3):645-652.

Wang, S., Beejadhursing, R., Ma, X. et al. Management of Caesarean scar pregnancy with or without methotrexate before curettage: human chorionic gonadotropin trends and patient outcomes. *BMC Pregnancy Childbirth* 18, 289. 2018.

Weitzner, O., Seraya-Bareket, C., Biron-Shental, T., Fishamn, A., Yagur, Y., Tzadikevitch-Geffen, K., Farladansky-Gershnel, S., Kidron, D., Ellis, M., Ashur-Fabian, O. Enhanced expression of $\alpha V\beta 3$ integrin in villus and extravillous trophoblasts of placenta accreta. *Arch Gynecol Obstet*. 2021;303(5):1175-1183.

Wu, J.X, Lin, S., Kong S.B. Psychological Stress and Functional Endometrial Disorders: Update of Mechanism Insights. *Frontiers in Endocrinology*. 2021 Aug 3;12:690255.

Yáñez-Mó, M., Mittelbrunn, M., Sánchez-Madrid, F. Tetraspanins and intercellular interactions. *Microcirculation*. 2001 Jun;8(3):153-68.

Yanez-Mo, M., Sanchez-Madrid, F., Cabanas, C. Membrane proteases and tetraspanins. *Biochem Soc Trans* 2011;39:541–6

Yauch, RL., Kazarov, AR., Desai, B., Lee, RT., Hemler, ME., 2000. Direct extracellular contact between integrin $\alpha(3)\beta(1)$ and TM4SF protein CD151. *J Biol Chem* 2000;275:9230–8.

Zelop, C., Nadel, A., Frigoletto, F.D. Jr, Pauker, S., MacMillan, M., Benacerraf, B.R. Placenta accreta/percreta/increta: a cause of elevated maternal serum alpha-fetoprotein. *Obstet Gynecol*. 1992;80(4):693-4.

Zhang, X.A., Bontrager, A.L., Hemler, M.E. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem* 2001;276:25005–13.

Zhou, J., Chen, H., Xu, X., Liu, Y., Chen, S., Yang, S., He, F., Yu, B. Uterine damage induces placenta accreta and immune imbalance at the maternal-fetal interface in the mouse. *Placenta*. 2022 Mar 4;119:8-16.

Zohni, K.M., Gat, I., Librach, C. Recurrent implantation failure: a comprehensive review. *Minerva Ginecol*. 2016;68(6):653-67.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Selin	Uyruğu	TC
Soyadı	Kısar	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Fethiye Anadolu Lisesi	2015
Lisans	Bursa Uludağ Üniversitesi	2019
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	Yökdil	80

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Plasenta Akreata Spektrumlu gebeliklerde, trofoblast invazyon mekanizmasında Vitronektin ve reseptör etkileşimlerinin araştırılması	TÜBİTAK-1002 Projesi	2021- Devam ediyor
Plasenta Akreata Spektrumlu Gebeliklerde Gerçekleşen Aşırı Trofoblast İnvazyonunda $\alpha\beta3$ İntegrin ve CD9 Etkileşiminin Etkisinin Araştırılması	Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Yüksek Lisans Tez Projesi	2021-2022

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler: