



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



**PREEKLAMPTİK GEBELERİN GÖBEK KORDONU
MEZENKİMAL HÜCRE KAYNAKLI EKZOZOMLARININ
ENDOTEL HÜCRESİ İŞLEVLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

İbrahim ALPTEKİN

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Alp CAN**

ANKARA

2025

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**PREEKLAMPTİK GEBELERİN GÖBEK KORDONU
MEZENKİMAL HÜCRE KAYNAKLI EKZOZOMLARININ
ENDOTEL HÜCRESİ İŞLEVLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

İbrahim ALPTEKİN

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Alp CAN**

**ANKARA
2025**

Ankara Üniversitesi
Tıp Fakóltesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Preeklampatik Gebelerin Göbek Kordonu Mezenkimal Hücre Kaynaklı Ekzozomlarının Endotel Hücresi İşlevleri Üzerine Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerkere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımca yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi İnsan Araştırmaları Etik Kurul tarafından, 21.04.2022 tarihinde, İ04-226-22 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: İbrahim ALPTEKİN

Tarih: 30.05.2025

İmza:

ÖZGÜNLÜK RAPORU



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: İbrahim ALPTEKİN
Ödev başlığı: İBRAHİM ALPTEKİN TEZ ÇALIŞMASI
Gönderi Başlığı: İBRAHİM_ALPTEKİN_TEZ_ÇALIŞMASI.pdf
Dosya adı: İBRAHİM_ALPTEKİN_TEZ_ÇALIŞMASI.pdf
Dosya boyutu: 6.3M
Sayfa sayısı: 127
Kelime sayısı: 29,601
Karakter sayısı: 197,060
Gönderim Tarihi: 27-May-2025 08:52ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2686194309



Copyright 2025 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

İBRAHİM_ALPTEKİN_TEZ_ÇALIŞMASI.pdf

ORJİNALLİK RAPORU

%**7**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**6**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**4**

YAYINLAR

%**3**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

KABUL ONAY SAYFASI

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı: Dr. İbrahim ALPTEKİN	Sınav tarihi: 21/ 05/ 2025
Anabilim/Bilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı	
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Alp CAN	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER
Tezin Başlığı: Preeklampitik Gebelerin Göbek Kordonu Mezenkimal Hücre Kaynaklı Ekzozomlarının Endotel Hücresi İşlevleri Üzerine Etkisi
Tezin Niteliği: ☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu: ☒ 1 ☐ 2 ☐ 3

III. KARAR
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin “Tıpta Uzmanlık Tezi” olarak ☒ Kabulüne ☐ Reddine ☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine ☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Alp CAN
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Bizden SABUNCUOĞLU
Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı

Jüri Üyesi
Doç. Dr. Ferda TOPAL ÇELİKKAN
Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı

ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasında farklı başlangıçlı preeklampsi olgularından elde edilen ekzozomların anjiyogenez performansını ve göbek kordonu mezenkimal stroma hücrelerinin farklılaşma potansiyelini karşılaştırarak preeklampsi başlangıcının stroma hücresi ekzozomları üzerindeki etkisini göstermeyi amaçladık.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, desteğini esirgemeyen değerli hocamız tez danışmanım Prof. Dr. Alp Can'a teşekkür ediyorum. Tanıdığım ilk günlerden bu yana desteğini hissettiğim, tanımaktan mutluluk duyduğum, tezin gelişiminin her aşamasında yanımda olan Uzm. Dr. Bilge Serdaroğlu'na varlığı ve destekleri için teşekkür ediyorum. Histoloji ve Embriyoloji'de birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Doç. Dr. Ferda Topal Çelikkan, Ezel Erkan'a ve ekibimize yeni gelen Elif Öztürk'e manevi desteklerinden dolayı teşekkür ediyorum. Tez sürecinde istatistiksel analiz sürecinde, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğretim Üyesi Mesut Akyol'a analizlerdeki emekleri için teşekkürlerimi sunuyorum. Olguların temininde yardımcı olan. Prof. Dr. Dilek Şahin ve Doç. Derya Uyan Hendem'e teşekkürlerimi sunuyorum. Yardımlı üreme teknikleri rotasyonunda birlikte çalışma fırsatı bulduğum bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Özgür Çınar ve Uzm. Biyolog Ebru İbiş'e teşekkürlerimi sunuyorum. Histoloji ve Embriyoloji alanındaki eğitimimde akademik gelişimime katkı sağlayan başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Belgin Can olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Esra Erdemli, Prof. Dr. Bizden Sabuncuoğlu, Prof. Dr. Oya Evirgen, Prof. Dr. Sevim Aydın, Prof. Dr. Deniz Billur'a teşekkürlerimi sunuyorum. Asistanlık sürecinde arkadaşlık anlamında tanımaktan mutluluk duyduğum, bölümümüzden ayrılan ve halen devam eden tüm asistan arkadaşlarıma, yardımlarını esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji personeline sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Medipol Üniversitesi Öğr. Üyesi Mohammadreza Dastouri'ye de desteklerinden dolayı teşekkür ediyorum. Tez çalışmamı TSG-2022-2545 numaralı projeye destekleyen Ankara Üniversitesi BAP'a teşekkür ederim. Son olarak, aileme özellikle anneme bu yolun başlangıcından bu yana desteğini ve varlığını hissettirdiği, kardeşlerime ve babama desteklerinden dolayı çok teşekkür ediyorum.

Dr. İbrahim Alptekin

Mayıs 2025

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	ii
ÖZGÜNLÜK RAPORU	iii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iv
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. GÖBEK KORDONUNUN GELİŞİMİ.....	7
4.2. GÖBEK KORDONUNUN ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ	8
4.3. KÖK HÜCRELER VE GÖBEK KORDONU MEZENKİMAL STROMA HÜCRELERİ	12
4.3.1.Kök Hücre Kavramı ve Mezenkimal Stroma Hücreleri (MSH)	12
4.3.2.MSH'nin Doku Kaynakları.....	13
4.3.3.MSH Özellikleri ve Klinik Çalışmalar	15
4.4. HÜCRE DIŞI VEZİKÜLLER VE EKZOZOMLAR	17
4.5. MSH KÖKENLİ EKZOZOMLAR	20
4.6. ANJİYOGENEZ	22
4.6.1.Embriyon Kan Damarlarının Gelişimi.....	22
4.6.2.Anjiyogenezin Gelişim Basamakları.....	24
4.6.3.Bazal Membran ve Anjiyogenez.....	26
4.6.4.Anjiyogenezde Etkili Faktörler.....	28
4.7. İN VİTRO ANJİYOGENEZ MODELLERİ	29
4.8. PREEKLAMPSİ	32

4.8.1.Tanımı ve Yaygınlığı.....	32
4.8.2.Preeklampsi Patofizyolojisi	32
4.8.3.VEGFR-2 ve Preeklampsi.....	33
4.8.4.Preeklampsinin Sınıflandırılması	35
4.8.5.Preeklampsi ve Anjiyogenez Çalışmaları	36
4.8.6.Göbek Kordonu ve Preeklampsi	37
4.8.7.Preeklampsi ve iGK-MSH	38
5. GEREÇ VE YÖNTEM	39
5.1. GRUPLARIN BELİRLENMESİ VE OLGULARIN SEÇİLMESİ.....	39
5.2. DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE TAŞINMASI.....	40
5.3. iGK-MSH EKSPLANT KÜLTÜRÜNÜN OLUŞTURULMASI VE KÜLTÜR SÜRECİ.....	42
5.4. PASAJLAMA İŞLEMLERİ.....	44
5.5. DONDURMA İŞLEMLERİ	45
5.6. HÜCRELERİN TANIMLANMASI.....	46
5.7. EKZOZOM AYRIŞTIRMA İŞLEMLERİ.....	47
5.8. EKZOZOMLARIN TANIMLANMASI	49
5.8.1.Ekzozomların Boyut ve Sayılarının Belirlenmesi.....	49
5.8.2.Ekzozomların SEM ile Gösterilmesi.....	50
5.8.3.Ekzozomların Protein Miktarlarının MicroBCA Yöntemi ile Ölçülmesi.....	50
5.8.4.Ekzozomların Yüzey Belirteçlerinin Western Blot İle Gösterilmesi	51
5.9. DOKU TAKİBİ VE PREPARAT HAZIRLAMA İŞLEMLERİ.....	52
5.9.1.Kriyokesit Alma	52
5.9.1.1. Kriyoblok Hazırlama İşlemleri	52
5.9.1.2. Uygun Lam Hazırlanması.....	52
5.9.1.3. Dokuların Kesilmesi ve Saklanması	53
5.10.İMMÜNOFLÖRESAN BOYAMA İŞLEMLERİ	53
5.10.1. Dokuların İmmünoflöresan İşaretlenmesi	53
5.10.2. Hücrelerin İmmün İşaretlenmesi.....	53
5.11.GÖRÜNTÜLEME İŞLEMLERİ.....	54
5.12.ANJİYOGENEZ DENEYLERİ	55
5.12.1. HUVEC Propagasyonu.....	56
5.12.2. Anjiyogenezin HUVEC Üzerinde Gösterilmesi.....	57

5.12.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	57
5.12.2.2. Anjiyogenez Deneylerinin Gerçekleştirilmesi	57
5.12.2.3. Anjiyogenez Deney Görüntülerinin Analizi	59
5.13. ÖRNEKLERDEN QRT-PCR İLE VEGFR-2 İFADE DÜZEYİNİN ANALİZİ	60
5.14. HİSTOMORFOMETRİK ÖLÇÜMLERİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ	64
5.15. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	66
6. BULGULAR	68
6.1. EKZOZOM TANIMLANMASI	68
6.1.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	68
6.1.2. Ekzozomlarda Protein Miktarının Belirlenmesi.....	69
6.1.3. Western Blot ile Ekzozom Yüzey Proteinlerinin Gösterilmesi.....	69
6.1.4. Ekzozomların Boyut ve Sayılarının Belirlenmesi.....	70
6.2. GÖBEK KORDONU HİSTOMORFOMETRİ BULGULARI.....	70
6.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ VERİLERİ.....	75
6.4. KORDONDA VE KÜLTÜR HÜCRELERİNDE VEGFR-2 İFADESİ	76
6.4.1. Kordonda VEGFR-2 ifadesi.....	76
6.4.1. Hücrede VEGFR-2 İfadesi.....	79
6.5. İGK-MSH KARAKTERİZASYONU	81
6.6. GÖBEK KORDONU STROMASINDA VEGFR-2 PROTEİNİNİN İFADESİ	83
6.7. İN VİTRO ANJİYOGENEZ	83
7. TARTIŞMA	90
7.1. PREEKLAMPSİ VE FETAL GELİŞİM GERİLİĞİ	90
7.2. ANJİYOGENEZ VE PREEKLAMPSİ	90
7.3. PREEKLAMPSİ VE VEGFR-2	92
7.4. GÖBEK KORDONU KESİTLERİNDEKİ HİSTOMORFOMETRİK SONUÇLAR.....	95
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	98
9. KAYNAKÇA	99

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	:	Mikrogram
µL	:	Mikrolitre
AMP-B	:	Amfoterisin - B
BCA	:	Bisinkoninik Asit Deneyi (Bicinchoninc Acid Assay)
bFGF	:	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (Basic Fibroblast Growth Factor)
BM	:	Bazal Membran
BMP-4	:	Kemik Morfogenik Protein-4 (Bone Morphogenic Protein-4)
CCK 8	:	Hücre Sayım Kiti (Cell Counting Kit-8)
CERT	:	Seramid Transfer Proteini (Ceramide Transport Protein)
Ct	:	Döngü eşiği (Cycle threshold)
DAPI	:	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
EGF	:	Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
EM	:	Elektron Mikroskobu
EPE	:	Erken Başlangıçlı Preeklampsi
EPH B2	:	Efrin Beta 2
ESCRT	:	Taşıma İçin Gerekli Endozomal Ayırma Kompleksi (Endosomal Sorting Complex Required For Transport)
ESM	:	Hücre Dışı Matriks (Ekstraselüler Matriks)
EVT	:	Ekstravillöz Trofoblast
FBS	:	Fetal Sığır Serumumu (Fetal Bovine Serum)
FGR	:	Fetal Büyüme Geriliği (Fetal Growth Restriction)
FITC	:	Floresan İzotiyosiyonat (Fluorescein Isothiocyanate)
Flk-1	:	Fetal Liver Kinaz-1
Flt-1	:	Fms-Like Tirozin Kinaz-1
GAPDH	:	Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
GH	:	Gebelik Haftası
GPE	:	Geç Başlangıçlı Preeklampsi

H&E	:	Hematoksilin Eozin
HAEC	:	İnsan Aort Endotel Hücreleri (Human Aortic Endothelial Cells)
HBMEC	:	İnsan Beyin Mikrovasküler Endotel Hücreleri (Human Brain Endothelial Cells)
HCMEC	:	İnsan Kardiyak Mikrovasküler Endotel Hücreleri (Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells)
HDMEC	:	İnsan Dermal Mikrovasküler Endotel Hücreleri (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells)
HUVEC	:	İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
ISSHP	:	International Society For The Study Of Hypertension
IUGR	:	Intrauterin Gelişim Geriliği (Intrauterin Growth Restriction)
IVS	:	İntervasküler Stroma
iAS-MSH	:	İnsan Amniyon Sıvısı Kökenli Multipotent Stroma Hücreleri
iGK- MSH	:	İnsan Göbek Kordonu Kökenli Multipotent Stroma Hücreleri
İLV	:	İntraluminal Veziküller
kDA	:	Kilodalton
KDR	:	Kinaz İnsert Domain Reseptör
KI-MSH	:	Kemik İliği Kökenli Multipotent Stroma Hücreleri
L-15	:	Leibovitz-15
MIP	:	Maksimum İmage Projection
mL	:	Mililitre
mm²	:	Milimetre Kare
MMP	:	Matriks Metalloproteinaz
MSH	:	Multipotent Stroma Hücreleri
MTT	:	4,5 Dimetiltiazol--Yl- -5-Difenil Tetrazolium Bromid
MVC	:	Multiveziküler Cisimler
NGF	:	Nörotrofik Büyüme Faktörü (Neurotrophic Growth Restriction)
NTA	:	Nanoparçacık İzleme Analizi
OD	:	Optik Dansite
P₃	:	Pasaj 3
PBS	:	Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline)

PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	:	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PE	:	Preeklampsi
PFA	:	Paraformaldehit
PMSF	:	Fenilmetilsülfonil Florür (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)
PS	:	Penisilin – Streptomisin
PVS	:	Perivasküler Stroma
RIPA	:	Radyoimmünopresipitasyon Analizi (Radioimmunoprecipitation Assay)
SAS	:	Subamniyotik Stroma
SEC	:	Boyut Dışlama Kromatografisi (Size Exclusion Chromatography)
SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
sFlt-1	:	Çözünebilir Fetal Liver Kinaz-1
TEM	:	Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope)
TGF-β	:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (Transforming Growth Factor- β)
TNF	:	Tümör Nekrozis Faktör
VEGF	:	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
VEGF-A	:	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü A
VEGFR-2	:	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2)
YD-MSH	:	Yağ Dokusu Kökenli Multipotent Stroma Hücresi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Göbek kordonu gelişimi.	8
Şekil 2. Laboratuvarımızda kültürünü gerçekleştirdiğimiz bir göbek kordonu.....	9
Şekil 3. Göbek kordonundaki histolojik boyamalar.	10
Şekil 4. Göbek kordonu stromasının bölümleri.	12
Şekil 5. MSH kaynakları ve klinik özellikleri.	15
Şekil 6. Hücre dışı vezikül biyosentezi ve içeriği	18
Şekil 7. Ekzozomların içeriği ve yapısı	19
Şekil 8. Anjiyogenez süreci	23
Şekil 9. Anjiyogenez basamakları.....	25
Şekil 10. Bazal membranın yapısı.	27
Şekil 11. Anjiyogenez basamakları ve sınındıkları in vitro anjiyogenez deneyleri	31
Şekil 12. Preeklampsi patofizyolojisi.	33
Şekil 13. Tez akış şeması.	40
Şekil 14. Hasta dosyası ve L-15 taşıma çözeltisi içerisindeki göbek kordonu örneği.	41
Şekil 15. Göbek kordonu stromasından MSH ayrıştırma işlemleri.	43
Şekil 16. Eksplant kültür oluşturulan iGK-MSH ve hücre kültürü süreci	43
Şekil 17. Eksplant kültürü.....	45
Şekil 18. Tripsinizasyon işlemi.....	45
Şekil 19. Mr. Frosty® ve azot tankı depolama sistemi.....	46
Şekil 20. Hücre sayım ve akım sitometri cihazı.	47
Şekil 21. Ultrasantrifüj cihazı ve malzemeleri.....	48
Şekil 22. Ekzozomların ayrıştırılmasında kullanılan diferansiyel ultrasantrifüj aşamaları.	49
Şekil 23. Protein analizi.	51
Şekil 24. Görüntüleme, kayıt ve ölçüm işlemleri.	55
Şekil 25. HUVEC hücre kültürü kaldırım taşı görünümü.	56
Şekil 26. İn vitro anjiyogenez deney şeması.....	58
Şekil 27. Anjiyogenez ölçütlerinin gösterimi 5x büyütme.	60
Şekil 28. ImageJ anjiyogenez analizi.....	60
Şekil 29. Sonikasyon işlemleri.....	64
Şekil 30. Histomorfometrik ölçüm parametreleri.	65

Şekil 31. Ekzozom SEM gözlemi.	68
Şekil 32. Western Blot yöntemiyle ekzozomların CD63 ve CD9 protein içeriğinin belirlenmesi.	69
Şekil 33. Arter lümen alanı verileri ve grafiği.	71
Şekil 34. Arter lümen indeksinin veri ve grafiği.	73
Şekil 35. Hücre kültürü verileri ve grafiği.	76
Şekil 36. Bölgelere göre sinyal ortanca değerleri (tüm olgular).	77
Şekil 37. Gruplar arası ve her gruptaki bölgeler arası sinyal yoğunluğu değerlendirmesi. .	78
Şekil 38. Göbek kordonu farklı bölgelerinden alınan immünoflöresan görüntüler.	79
Şekil 39. Hücre kültürü VEGFR-2 sinyal yoğunluk değerleri.	80
Şekil 40. Hücre kültüründe VEGFR-2 immünoflöresan boyama paneli.	81
Şekil 41. iGK-MSH eksplant kültürü.	82
Şekil 42. iGK-MSH akım sitometri ölçümü.	82
Şekil 43. Gruplar arası PCR ifade düzeyleri.	83
Şekil 44. Anjiyogenez düğüm sayıları verileri ve grafiği.	84
Şekil 45. Anjiyogenez dal sayısı verileri ve grafiği.	85
Şekil 46. Anjiyogenez ağ sayıları verileri ve grafiği.	86
Şekil 47. Anjiyogenez toplam uzunluk ortalamaları verileri ve grafiği.	87
Şekil 48. Anjiyogenez toplam dal uzunluğu ortalamaları verileri ve grafiği.	88
Şekil 49. Anjiyogenez tüp oluşum deneyi görüntüleri.	89

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Göbek kordonuna ait damarlar ile orta çaplı arter özelliklerinin karşılaştırılması.	11
Tablo 2. MSH'nin ayrıştırıldığı dokular ve işlevsel özelliklerinin karşılaştırılması	14
Tablo 3. MSH'nin doku kaynakları ve özelliklerinin karşılaştırılması	14
Tablo 4. MSH'nin klinikte denendiği hastalıklar.	16
Tablo 5. Hücre dışı vezikül içeriği	19
Tablo 6. Ekzozom ayrıştırma yöntemleri	21
Tablo 7. Preeklampsı sınıflandırması	35
Tablo 8. Deney grupları.....	57
Tablo 9. Anjiyogenez ölçütleri	59
Tablo 10. PCR daki değerlerin hesaplanması	63
Tablo 11. Histomorfometrik ölçüm parametreleri.....	65
Tablo 12. Hesaplanan histomorfometrik değerler.	65
Tablo 13. Ekzozom protein miktarları ve hücre sayıları.	69
Tablo 14. Ekzozom sayı ve boyutları.	70
Tablo 15. Arter kesit alanı.	70
Tablo 16. Ven kesit alanı.	71
Tablo 17. Ven lümen alanı.	72
Tablo 18. Toplam kordon çapı.	72
Tablo 19. Toplam kordon alanı.	72
Tablo 20. Arter duvar alanı.	72
Tablo 21. Ven duvar alanı.	73
Tablo 22. Ven lümen indeksi.	74
Tablo 23. Kordon stroması alanı.	74
Tablo 24. Kordon damar alanı.....	74
Tablo 25. Gruplar arası histomorfometrik ölçüm ve hesaplama değerleri.	74
Tablo 26. Gruplar ve bölgeler arası sinyal yoğunluğu (piksel)	77
Tablo 27. Bölgelerin gruplar arası sinyal yoğunluğu farkı.	78

1. ÖZET

Giriş: Mezenkimal stroma hücreleri anjiyogenik potansiyeli gösterilmiş hücrelerdir. Farklı kaynaklardan elde edilir. Bunlar arasında göbek kordonu stroması önemli bir kaynaktır. Bu hücreler anjiyogenik etkilerini hücre dışına salgıladıkları ekzozomlar aracılığıyla yapar. Ekzozomlar taşıdıkları biyobelirteçlerle hedef hücrede etkindir. İçerikleri salgılandıkları dokuya, hücrenin metabolik durumuna ve hastalıklar gibi diğer koşullara göre değişir. Preeklampsia gebelikte ortaya çıkar, yüksek tansiyon ve proteinüri ile seyreder. Birbirinden farklı gelişen plasenta kaynaklı ve maternal kaynaklı iki alt tipi bulunur. Bu iki alt tip arasındaki ayırım henüz netlik kazanmamıştır. Preeklampsideki belirtilerin ortaya çıkışında endotel disfonksiyonu ön plandadır. Endoteli etkileyen bu durumun anjiyogenezi de etkilemesi olasıdır. Bu etkiyi gebeliğin erken döneminde damar gelişim sürecinde oluşturur. Özellikle preeklampsinin başlangıcının anjiyogenezi nasıl etkilediğiyle ilgili doku çalışması sınırlıdır. Anjiyogenik etkileri bilinen ve in vivo ve in vitro koşullarda devam eden iGK-MSH'nin dokudaki bazal anjiyogenik potansiyeli ve ekzozomlarının anjiyogenik performansının değerlendirilmesine ilişkin literatür kısıtlıdır.

Amaç: Bu çalışmada farklı başlangıçlı preeklampsia olgularından elde edilen ekzozomların HUVEC üzerinde anjiyogenez performansı ve alınan göbek kordonlarındaki stromanın VEGFR-2 ifade düzeyleri karşılaştırılarak literatüre katkı yapılması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Erken başlangıçlı (24 ile 34 hafta arası) ve geç başlangıçlı (34 hafta sonrası) altışar preeklampsia olgusundan alınan göbek kordonlarından iGK-MSH ekzozomları ultrasantrifüj yöntemiyle ayrıştırıldı. P₃'teki ekzozomların karakterizasyonu için SEM, Western Blot, ayarlanabilir dirençli darbe algılama sistemi, MicroBCA® analizleri yapıldı. Elde edilen ekzozomlarla HUVEC hattı tüp oluşumu deneyinde anjiyogenez test edildi. Alınan göbek kordonuna ait üç bölge subamniyotik stroma (1), intervasküler stroma (IVS), perivasküler stroma (PVS) ve yapılan hücre kültüründe üç farklı grupta (Kontrol, EPE, GPE) VEGFR-2 proteiniyle immün işaretleme yapıldı. Alınan göbek kordonları H&E ve Mallory Azan boyasıyla boyanarak göbek kordonundaki yapılara ait metrik ölçümler gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Kontrol ekzozomları, EPE ve GPE ekzozomlarından daha etkin anjiyogenez performansı gösterdi. Göbek kordonunda, gruplardan bağımsız olarak VEGFR-2 seviyesi SAS'da IVS ve PVS'ye göre zayıf izlendi. Hücre kültüründe kontrol olgularında EPE ve GPE'ye göre daha yüksek sinyal yoğunluğu ölçüldü. Histomorfometrik olarak gruplarda arter lümeni ve arter lümen indeksi EPE ve GPE gruplarında kontrollere göre yüksek ölçüldü.

Sonuç: Preeklampsi anjiyogenezi olumsuz etkiler. Fakat preeklampsinin başlangıcı anjiyogenez üzerinde belirgin bir etkiye sahip değildir. Göbek kordonu stroması anjiyogenik potansiyelini korumaktadır. Preeklampsinin stroma üzerinde anlamlı etkisi bulunur. Fakat hücrelerin anjiyogenik potansiyeli üzerinde düşürücü belirgin bir etkisi bulunmaz.

Anahtar kelimeler: Erken başlangıçlı preeklampsi, geç başlangıçlı preeklampsi, anjiyogenez, VEGFR-2, ekzozom

2. ABSTRACT

Introduction: Mesenchymal stroma cells have been shown to possess angiogenic potential. These elements are obtained from a variety of sources. Of these, umbilical cord stroma is a significant source. The angiogenic effects of these cells are attributable to the exosome secretion process. Exosomes are known to exert an active influence on target cells, and the biomarkers they carry are of significant diagnostic value. The content of these cells varies according to the tissue in which they are secreted, the metabolic state of the cell, and other conditions such as diseases. Preeclampsia manifests during pregnancy and is characterised by hypertension and proteinuria. Two subtypes have been identified: placenta-induced and maternal-induced, which develop differently from each other. The distinction between these two subtypes remains to be elucidated. Endothelial dysfunction is a pivotal factor in the manifestation of symptoms associated with preeclampsia. It is conceivable that this condition, which affects the endothelium, may also impact angiogenesis. This phenomenon manifests during the process of vascular development in the early stages of pregnancy. The existing literature on the subject of the impact of the onset of preeclampsia on angiogenesis is limited in scope and depth. The extant literature pertaining to the evaluation of the basal angiogenic potential of iGK-MSH in tissue and the angiogenic performance of its exosomes, the angiogenic effects of which are known to persist in both in vivo and in vitro conditions, is limited.

Aim: The present study was conducted with the objective of making a contribution to the existing literature on the subject by means of a comparison of the angiogenesis performance of exosome samples obtained from cases of preeclampsia that had occurred at different times with regard to the levels of HUVEC and VEGFR-2 expression in the stroma of umbilical cords.

Material and methods: Exosomes of iGK-MSH were separated by ultracentrifugation from umbilical cords obtained from six cases of early-onset preeclampsia (between 24 and 34 weeks) and six cases of late-onset preeclampsia (after 34 weeks). A series of analytical procedures were carried out on the samples from P3, including SEM, Western Blot, an adjustable resistance pulse detection system, and Micro BCA® analyses. The objective of this series of procedures was to characterise the exosome samples. The angiogenic potential of the isolated EVs was then assessed using a tube formation assay with HUVEC line cells. The umbilical cord was divided into three

regions: subamniotic stroma (1), intervascular stroma (IVS), and perivascular stroma (PVS). These regions were then subjected to immunolabeling with a VEGFR-2 protein in a cell culture setting, with the study divided into three distinct groups: Control, EPE, and GPE. The umbilical cords were subjected to staining with hematoxylin and eosin (H&E) and Mallory Azan stain, after which metric measurements of the structures present in the umbilical cord were performed. The difference between the groups was statistically evaluated.

Results: The control exosomes showed superior angiogenesis performance in comparison to EPE and GPE exosomes. In the umbilical cord, VEGFR-2 levels were found to be weaker in the SAS than in the IVS and PVS, independent of the group. In cell culture, higher signal intensity was measured in control subjects compared to EPE and GPE. The histomorphometric analysis revealed that the arterial lumen and the arterial lumen index exhibited higher values in the EPE and GPE groups in comparison with the control group.

Conclusion: Preeclampsia has been demonstrated to exert a detrimental effect on the process of angiogenesis. However, the onset of pre-eclampsia does not have a significant effect on angiogenesis. The umbilical cord stroma has been demonstrated to retain its angiogenic potential. Preeclampsia exerts a substantial influence on the stroma. Nevertheless, the investigation revealed that the substance in question does not have a substantial inhibitory effect on the angiogenic potential of the cells.

Keywords: Early onset preeclampsia, late onset preeclampsia, angiogenesis, VEGFR-2, exosome.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Mezenkimal stroma hücreleri (MSH) 1960'lı yıllardan beri yenileyici tıp araştırmalarında kullanılır. Farklı kaynaklardan ayrıştırılabilir. Bu kaynaklar içinde insan göbek kordonu elde etme kolaylığı, etik sorunlar oluşturmaması ve düşük immün risk nedeniyle sıklıkla kullanılır. İnsan göbek kordonu mezenkimal stroma hücreleri etkilerini ekzozom adı verilen hücre dışı veziküller aracılığıyla parakrin ve endokrin olarak gösterir. Ekzozomlar hücresiz tedavilerde kullanım için denenilen hücrelerden elde edilen ve içeriğinde taşıdıkları biyoaktif maddeler aracılığıyla hücreler üzerinde etki gösteren veziküllerdir. MSH'ye üstün yönlerinden dolayı yenileyici tıp araştırmalarında MSH yerine denenir. Yenileyici tıp araştırmalarında anjiyogenez özel bir yer tutar. Var olan damarlardan yeni damar oluşumu anlamına gelen bu kavram özellikle kanser çalışmalarında kullanılır. Bu açıdan anjiyogenezin kontrolüne ve anjiyogenez üzerinde etki oluşturacak moleküller üzerine pek çok çalışma bulunur. Preeklampsia gebelik zehirlenmesi olarak bilinen ve gebeliğin farklı dönemlerinde belirtilerini gördüğümüz çok yönlü bir hastalıktır. Farklı başlangıçlı alt tipleri bulunur. Etkilerinin bir kısmı anjiyogenez üzerinedir. Patogenezinde anjiyogenezin etkilendiği bilinir.

Tüm bu bilgilerin ışığında, hipotezi şu şekilde kurduk:

Hipotez: Preeklampsinin başlangıcı ve dolayısıyla şiddeti ile göbek kordonu stromasındaki hücrelerin anjiyogenezde etkili olan VEGFR-2 ifadesi arasında bir etkileşim vardır.

Bu çalışmada farklı başlangıçlı preeklampsia türlerinin insan göbek kordonu stroması üzerindeki etkilerini hücre ve doku düzeyinde görmeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda;

1. Erken ve geç başlangıçlı preeklampsia olgularından alınan göbek kordonları arasındaki yapısal farkı morfolometrik bulgularla göstermeyi,
2. Sağlıklı gebeliklerden elde edilen göbek kordonlarının stroma hücrelerindeki anjiyogenik reseptör moleküllerinin (VEGFR-2) hücresel dağılımını ve ifade düzeyini göstermeyi,
3. Erken ve geç başlangıçlı preeklampsili gebeliklerden elde edilen göbek kordonlarının VEGFR-2 reseptörünün dağılımını ve ifade düzeyini göstermeyi; bu dağılım ve ifade düzeyini kontrol olgularıyla karşılaştırmayı,

4. Erken ve geç başlangıçlı preeklampsi olgularından elde edilen göbek kordonu stroma hücrelerinin hücre kültürü üreme özellikleri ve morfolojilerini karşılaştırmayı,
5. Erken ve geç başlangıçlı preeklampsi olgularından üreyen hücrelerin anjiyogenik molekülleri ifade etme düzeyini karşılaştırmayı,
6. Erken ve geç başlangıçlı preeklampsi olgularından elde edilen iGK-MSH ekzozomlarının anjiyogenez kapasitesini sağlıklı kontrollerle karşılaştırmayı hedefledik.

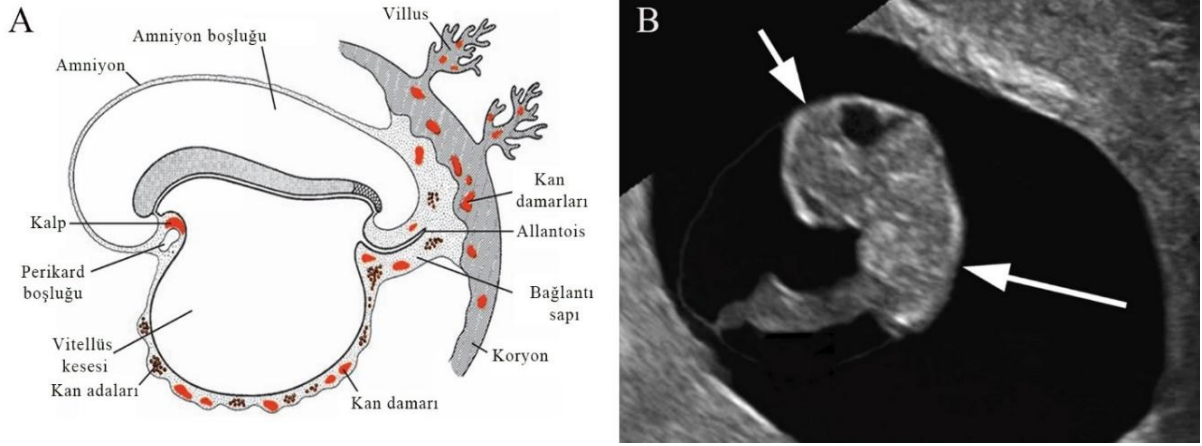


4. GENEL BİLGİLER

4.1. Göbek Kordonunun Gelişimi

Göbek kordonu anneye fetüs arasında besin ve oksijen geçişinde, metabolik atıkların uzaklaştırılmasında etkili yaşamsal bir bağıdır (2). Oluşumu, gelişimin 12-13. günlerinde embriyon dışı mezodermin gelişimiyle başlar. Epiblasttan köken alan bir hücre tabakası farklanarak embriyon dışı mezodermi oluşturur. Embriyon dışı mezoderm, amniyon boşluğuyla trofoblast tabakasının arasını dolduran ve embriyonu dıştan çepeçevre saran gevşek bağ dokusu özelliğindedir. Zamanla bu özel yapı vakuolizasyona uğrayarak embriyon dışında boşluk oluşturur. Embriyon dışı mezodermin koryonla temas ettiği bir bölgede boşluk oluşumu izlenmez ve burada doku devamlılığını korur. Bu yapı bilaminar embriyon diskinin ventral (vitellüs kesesi) ve dorsal bölgesini (amniyon bölgesini) koryona bağlar ve bu aşamada bu yapı “bağlantı sapı” olarak adlandırılır (3). Embriyonun baş-kuyruk ve yan katlanma süreçlerinde karın ön duvarında ilkel göbek halkası olarak tanımlanan amniyon zarıyla çevrili ektoderm kökenli bir yapı gelişir. Burada bağlantı sapına ek olarak vitellüs kesesi, damarları ve daha önce bağlantı sapının gelişim gösterdiği embriyon dışı mezoderm boşlukları bulunur. Bu yapı en dışarıdan sarılarak ilkel göbek kordonunu geliştirir. Embriyon dışı dokularda, 3. haftanın başında damar gelişimi başlar ve sonuna doğru bağlantı sapının içinde damar ağının geliştiği görülür. Böylece 3. haftanın sonunda bağlantı sapı; embriyon dışı mezoderm, allantois, ilkel damarları içeren bir yapı şeklinde gözlemlenir (**Şekil 1A**).

Embriyon gelişimi, 4. ve 5. haftalar arasında hızlanır. Hızla büyüyen amniyon boşluğu, bağlantı sapının çevresini sarar ve tüp şeklinde bir yapı oluşur. Dışarıdan amniyon epiteliyle kapanmış; vitellüs kesesi, allantois ve damarları içeren, çevresi gevşek ve müköz bağ dokusuyla sarılmış bu yapı, gelişimin bu aşamasından sonra göbek kordonu olarak adlandırılır. İlkel göbek kordonu, distalde vitellüs kesesinin sapı ve göbek damarlarını, proksimalde birkaç bağırsak halkasını ve allantois kalıntısını içerir. Embriyon gelişiminin 6-12. haftaları arasındaki fizyolojik fıtıklaşma süreciyle göbek kordonunun boyu uzar (**Şekil 1B**) ve stromasındaki embriyon dışı doku miktarı artar. Fıtıklaşma sonunda bağırsak halkaları, embriyonun içine tekrar alınır. Bu olaydan sonra göbek kordonundaki çölom boşluğu, allantois kesesi, vitellin kanal ve damarlar kaybolur. Kordonda yalnızca, göbek kordonu stromasıyla çevrilmiş iki arter (a. umbilikalıs ve bir ven (v. umbilikalıs) kalır. Göbek kordonu gelişimi 12. haftada tamamlanır.



Şekil 1. Göbek kordonu gelişimi.

A: 19 günlük bir embriyonun şematik görünümü. Vitellüs kesesi, koryon, embriyon dışı damarlar ve bağlantı sapı bulunur. **B:** 8 haftalık bir embriyonun ultrason görünümü, embriyon göbek kordonu ile koryona bağlıdır (3, 4).

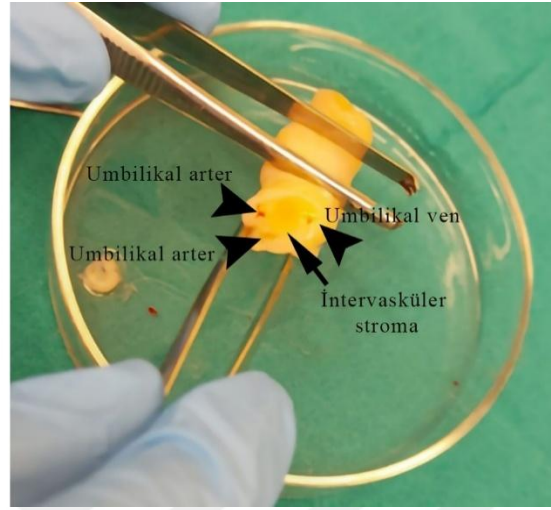
4.2. Göbek Kordonunun Anatomisi ve Histolojisi

Miadında gebelik¹ sonunda gelişen sağlıklı bir fetüste (2500-4000 gr arasında) göbek kordonu, ortalama 40 gr ağırlıkta, 50-60 cm uzunlukta², 1,5-2 cm çapta burgulu bir tüp yapısındadır. Plasenta diskinin tam merkezine doğru uzanır ve koryon plakasının ortasından plasenta diskinin tam merkezine doğru uzanır ve koryon plakasının ortasından plasenta diskinin tam merkezine doğru uzanır (5). Tek/çok katlı yassı-kübik özellikteki amniyon epiteliyle çevrilidir. Bu epitel keratinosit özellikte olmasının yanı sıra kök hücre özellikleri de gösterir (6). İçeriğinin büyük çoğunluğu, “mükoz bağ dokusu”, “embriyonik bağ dokusu” veya özel ismiyle adını 17 yy. da yaşamış İngiliz anatomist Thomas Wharton’dan alan “Wharton jölesi” olarak bilinen özelleşmiş bir bağ dokusundan oluşur. Türler arasında farklılık göstermekle birlikte, insan göbek kordonunda, vitellin arterlerden köken alan, iki umbilikal arter ve bir umbilikal ven bulunur (**Şekil 2**) (7). Gelişimin erken döneminde göbek kordonunda ikişer adet arter ve ven bulunur. Umbilikal

¹ 37-41 hafta arasında doğumla sonuçlanan gebelikler term gebelik olarak adlandırılır.

² İnsanlarda göbek kordonu; 32 cm’den küçük ise kısa, 100 cm’den büyük ise uzun olarak adlandırılmaktadır.

venlerden birisi, allantois ve vitellüs kesesiyle birlikte 8. haftada kaybolur. Nadir durumlarda bu ven kaybolmaz ve kalıcı olarak göbek kordonunda varlığını sürdürür (8).



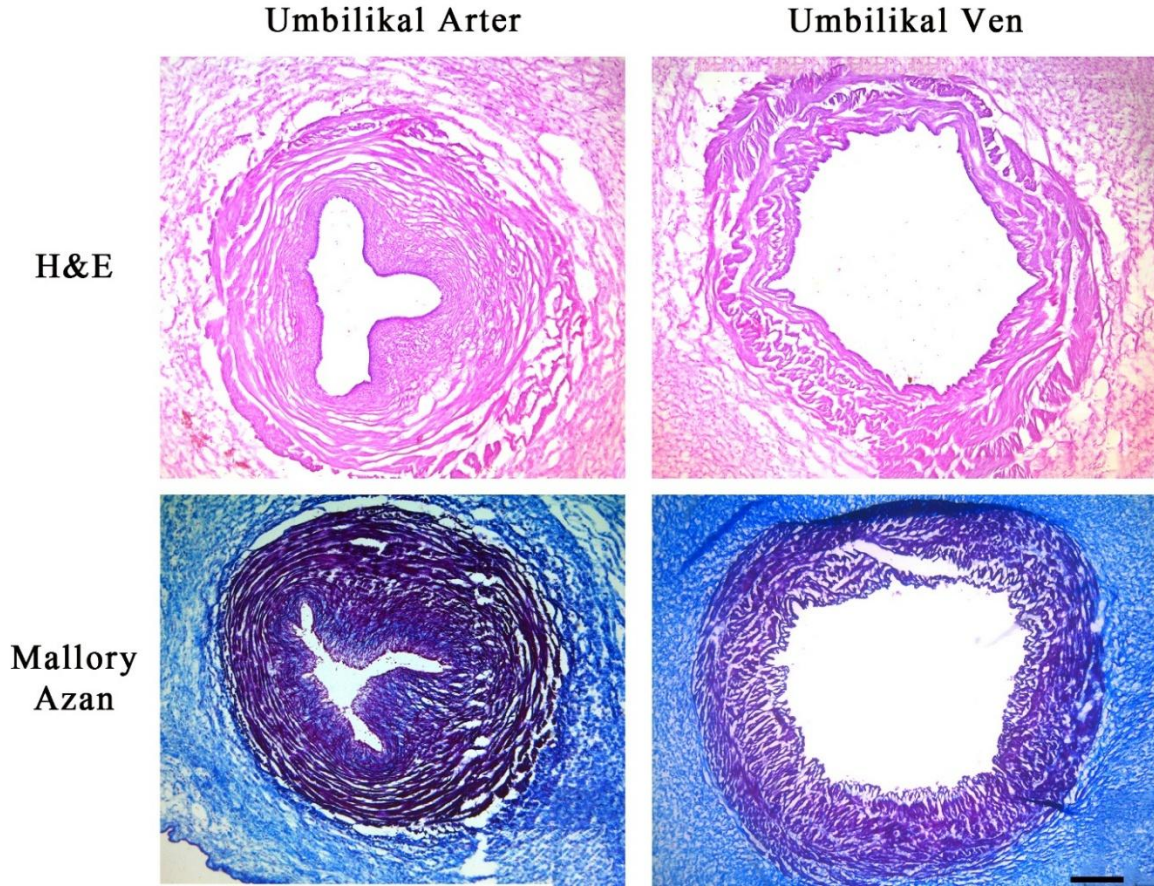
Şekil 2. Laboratuvarımızda kültürünü gerçekleştirdiğimiz bir göbek kordonu

Ok başları: sırasıyla umbilikal arterler ve veni gösterir. **Ok:** intervasküler stromayı gösterir.

Göbek kordonu içerdiği hücreler ve hücre dışı matriks (9) elemanlarının özelliklerine göre dıştan içe doğru (i) amniyon epiteli (ii) subamniyotik stroma (iii) cepler (iv) intervasküler stroma (v) perivasküler stroma (vi) damarlar olmak üzere 6 farklı bölge içerir (10). Her üç damarda da, en içte tek katlı yassı epitelden oluşan endotel ve endotelin altındaki subendotel alanı içeren bir tunika intima ve kas dokusunu içine alan bir tunika medya bulunur, fakat her üç damarda da tunika adventisya bulunmaz. Ayrıca insan umbilikal arterlerinde belirgin olmayan iç ve dış elastik membran bulunur³. Venlerde ise iç elastik membran kas tabakasının içine gömülüdür. Arterlerde iki sıra kas tabakası bulunur. Kas tabakaları subendotele komşu içte sirküler, dışta longitudinal yerleşir. Lümenleri venlere oranla dardır, enine kesitlerde yıldızsı bir görünüm oluşturur. Venler ise benzer endotel özellikleri göstermekle birlikte, kaslar içte longitudinal, dışta sirküler uzanım gösterir. Daha ince bir duvar yapısı ve daha geniş bir lümeni bulunur. Ayrıca lümenleri arterlerden daha düzensiz görünür (11). Göbek kordonunun plasentaya yakın ucunda umbilikal arterler arasında özel bir anastomoz bulunur. Bu anastomoz “Hyrtl anastomozu” olarak bilinir ve iki damar arasında ince özel bir bağlantı olup kan basıncının dengeli dağılması ve oluşabilecek bir baskı hasarına karşı kan akımının devamlılığını sağlayabilmek için özelleşmiştir (12). Damarların çevresindeki stroma ya da diğer adıyla “Wharton jölesi” adventisya tabakası görevi görür (13).

³ Konuya ilişkin literatürde bu yapıların bulunmadığını yazan yazarlar da bulunur.

Umbilikal arter ve venlerde adventisya tabakasına özgü olan vaza vazorum yapıları bulunmaz (**Tablo 1**). Stroma diğer türlerin aksine sinir dokusu ve lenf damarı içermez (**Şekil 3**). Bu yapı kendisine özgü bir ara madde ve kollajen liflerden meydana gelir. Wharton jölesinde hücre dışı matriks gevşek olarak düzenlenir, bol miktarda kollajen lif bulunur fakat elastik lif bulunmaz. Sıklıkla tip I ve tip III kollajen bulunur; bununla birlikte tip IV ve tip V kollajenin de varlığı gösterilmiştir. Bu yapıları fibrilin ve tip VII kollajen bir arada tutar (14). Stromadaki glikozaminoglikanların %70'i hyaluronik asit, kalan kısmı ise keratan sülfat, heparan sülfat, kondroitin sülfat, dermatan sülfat ve eser miktarda da heparinden oluşur. Bunlardan hyaluronik asit oldukça etkili su tutma özelliğine sahiptir. Bu sayede fetüsün hareketlerinden, kıvrılma ve darbelere karşı damarların zarar görmesini engeller. Stroma bunların dışında mezenkimal stroma hücreleri (MSH) (fibroblast benzeri hücreler) ve araya dağılmış az miktarda mast hücresi içerir (15-17).



Şekil 3. Göbek kordonundaki histolojik boyamalar.

Arter, ven ve stromanın hematoksilin-eozin ve Mallory Azan ile boyanması sonucunda göbek kordonu stromasındaki kollajen lif zenginliği, damar duvarındaki kas ve kollajenlerin düzeni

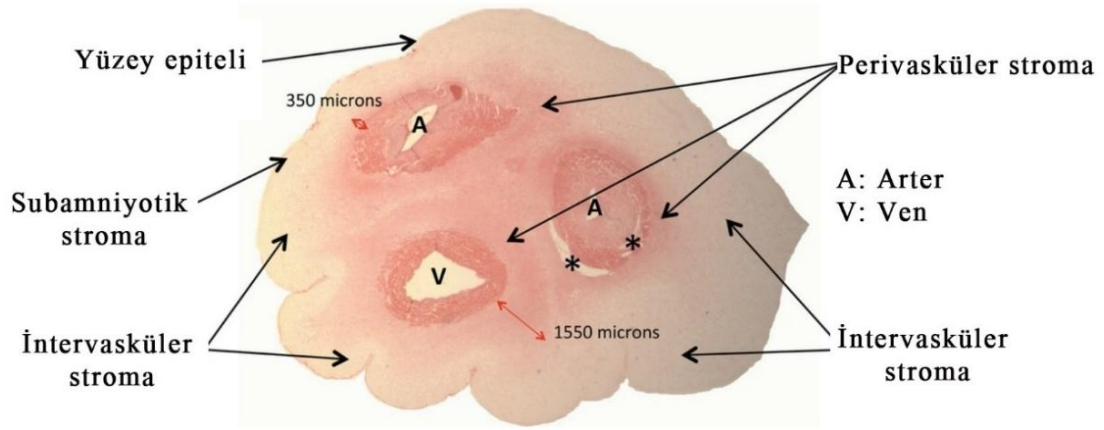
kolayca izlenir. **Mavi: kollajen, pembe kollajen, kırmızı: kas dokusu.** Ölçüm çubuğu: 200 µm.

Tablo 1. Göbek kordonuna ait damarlar ile orta çaplı arter özelliklerinin karşılaştırılması.

Özellikler	Umbilikal Arter	Umbilikal Ven	Orta Arter
Ortalama çap	2,5 mm	7-8 mm	2 mm
İnternal elastik membran varlığı	Yok*	Yok*	Var
Adventisya	Yok	Yok	Var
Vaza vazorum	Yok	Yok	Var
Kas dizilimi	İçte sirküler Dışta longitudinal	İçte longitudinal Dışta sirküler	İçte sirküler Dışta longitudinal
Lümen özellikleri	Yıldız şeklinde	Geniş ve düzensiz	Yuvarlak ve iyi sınırlı
Sinirsel kontrolü	Otonomik sinir sistem	Otonom kontrolü bulunmaz	Otonomik sinir sistem

Wharton jölesindeki hücreler, hem fibroblast hem de miyositlerin moleküler ve morfolojik özelliklerini gösterir, dolayısıyla “miyofibroblast” olarak tanımlanır (18, 19). Oval veya ince uzun çekirdekli. Elektron mikroskop çalışmalarında bu hücrelerin iyi gelişmiş granüllü endoplazma retikulumu, Golgi kompleksi ve mitokondriyon içerdikleri, sitoplazmalarında yağ damlacıkları ve glikojen granülleri bulundurduğu gösterilmiştir. Bu hücreler aktin ve miyozin, ayrıca desmin ve vimentin içerir (18). Sitoplazmalarında prolil-4-hidroksilaz enzimi içerirler; bu da bu hücrelerin aktif kollajen ve ESM elemanlarının sentezinden sorumlu olduklarını gösterir (20). Göbek kordonunda merkezden çevreye doğru yani perivasküler alandan subamniyotik alana doğru gittikçe hücrelerin hem farklanma düzeyi ve hem de sayıları azalır (21). Hücrelerin farklanma düzeyinin ise 3. trimesterde, 1. ve 2. trimesterlerdekilerine göre yüksek olduğu görülmüştür (22). Yani farklanma düzeyi hem yerleşim hem de dönemden etkilenir. Buna göre damar çevresindeki mezenkimal hücreler daha fazla miyofibroblast özelliği gösterirken, periferde doğru gittikçe bu özelliği yayırlar. MSH özellikleri bir sonraki bölümde detaylı şekilde verilmiştir. Göbek kordonu stromasındaki hücreler ve ara maddenin içeriğine göre, en az üç farklı bölge bulunur. Bu bölgeler hücre yoğunlukları, özellikleri ve ara madde içerikleri açısından farklıdır. Bu alanlar dıştan içe doğru, subamniyotik stroma (SAS), intervasküler stroma (IVS), perivasküler stroma (PVS) olarak adlandırılır (**Şekil 4**). IVS bölgesi damarlar arasında kalan alandır ve klasik olarak “Wharton jölesi” olarak bilinen alana karşılık gelir. Bu bölgedeki hücre dışı matriks iyi organize olmuştur.

Damarların çevresindeki alan PVS olarak adlandırılır, ESM oldukça dardır ve sık yerleşmiş bol hücre bulunur. PVS'deki stroma hücrelerinin miyofibroblastlara özellikleri diğer bölümünde bulunan hücelere göre daha belirgindir. SAS'ta ESM daha gevşektir ve daha az hücre bulunur (15). Göbek kordonu stromasının tanımlanan bölgeleri arasındaki sınırlar belirgin değildir⁴ (23, 24).



Şekil 4. Göbek kordonu stromasının bölümleri.

Göbek kordonu stroması enine kesitinde en az üç farklı bölüm içerir. Bu bölümlerden IVS klasik olarak bilinen Wharton jölesine karşılık gelir (25).

4.3. Kök Hücreler ve Göbek Kordonu Mezenkimal Stroma Hücreleri

4.3.1. Kök Hücre Kavramı ve Mezenkimal Stroma Hücreleri (MSH)

Friedenstein ve arkadaşlarının 1960'lı yıllarda sıçan kemik iliğinin stromasında yapmış olduğu çalışmalarda (26, 27) fibroblastlara benzerlik gösteren farklı bir hücre grubunun (1/10000 oranında var olan) varlığı keşfedilmiştir ve bu hücreler hematopoetik hücrelerin hematopoetik olmayan bir alt grubu olarak değerlendirilmiştir. Bu hücreler, kültüre ekildiğinde plastik yüzeye yapışabildikleri görülmüştür. Bu hücre gruplarının kendini çoğaltabilme (self-renewal) potansiyelleri in vivo ve in vitro ortamlarda 1990'lı yıllardaki çalışmalarla gösterilmiş ve yaygın olarak mezenkimal kök hücre

⁴ Bu konuda farklı fikirler öne sürülmüştür. Tamamına Wharton jölesi denildiği gibi sadece damarlar arasında kalan alana Wharton jölesi diyen, tüm bunlardan farklı olarak sadece IVS'ye Wharton jölesi diyen yayınlar bulunur.

olarak isimlendirilmiştir. Yapılan in vitro çalışmalarda bu hücre gruplarının çoğaltılabildiği de gösterilmiştir (28). Farklanma çalışmalarında bu hücrelerin özellikle yağ, kıkırdak ve kemik yönünde farklanabildiği görülmüştür (29). Sonraki yıllarda bu hücrelerin kemik iliği stroması dışında farklı organların stromalarından da elde edilebildiği gösterilmiştir (30). Ayrıca bu hücreler pluripotent kök hücrelerin aksine heterojen bir popülasyona sahiptir ve kendi içinde de çeşitlilik içerir. Bu nedenle bu hücrelere multipotent farklanma özelliği gösteren stromadan elde edilebilen ve bağ dokusu hücrelerine dönüşebilen anlamında “multipotent mezenkimal stroma hücresi” tanımlaması yapılmıştır (31, 32).

MSH alındığı kaynak fark etmeksizin ortak yüzey molekülleri barındırır (33). Hepsinde CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 ve HLA-ABC (pozitif belirteçler) yüzey belirteçleri ortaktır. Yine hepsinde hematopoetik hücrelerin yüzeylerinde ifade edilen CD11b, CD14, CD19, CD45 ve HLA – DR (negatif belirteçler) ve endotel hücrelerinin yüzeylerinde ifade edilen CD31 yüzey belirteçleri ifade edilmez. MSH, kaynağına bağlı olarak değişkenlik gösteren kök hücre işaretleri de içerir. Bu işaretler dokunun kökeni hakkında bilgi verebilir fakat aynı reseptörün farklı hücrelerin yüzeyinde ifade edilmesi belirsizlik oluşturur, bu nedenle bu moleküller hücreleri tanımlamada kullanılmaz. Bunun dışında bu hücrelerin yüzeylerinde hücrenin etkin olup olmadıklarına bağlı olarak ifade edilen belirteçler bulunur (34). Bunlar da hücrenin ilişkili olduğu süreçleri yönetmesine katkı sağlar. Fenotipik özellikler üzerinde hücrenin pasajı, kullanılan kültür ortamı ve elde edilme yöntemi etkilidir (35). Ayrıca, MSH'nin çoğalma kapasitesi, farklanma yetkinliği, moleküler işaretleri ve sinyal yolları hücrenin kökenine göre değişir.

4.3.2. MSH'nin Doku Kaynakları

Günümüzde, MSH yaygın olarak kemik iliği, yağ dokusu ve göbek kordonu stromasından ayrıştırılır. Bunun dışında farklı kaynaklardan (eklem sıvısı, plasenta, dermis, göbek kordon kanı, diş pulpası vb.) elde edilebilir (**Şekil 5A**) (36). Bu kaynakların arasında göbek kordonu mezenkimal stroma hücreleri (iGK-MSH), diğer yetişkin dokularda bulunan benzerlerine göre sayıca az olsa da fetal doku olmasından dolayı oldukça etkin çoğalabilme potansiyeli taşır. Kemik iliği stroma hücreleri en yaygın kullanılan kaynaktır; ancak elde edilmesi zordur ve girişim gerektirir. Ayrıca etkinliği yaşa bağlı azalır (37). Yağ dokunun eldesi kemik iliği kadar zor değildir fakat yine de girişimsel işlem gerektirir. Bu bakımdan göbek kordonu diğer iki dokunun aksine, hem sahip olduğu stromasıyla hem de atık materyal özelliği göstermesinden dolayı pratik ve kolay ulaşılabilir bir

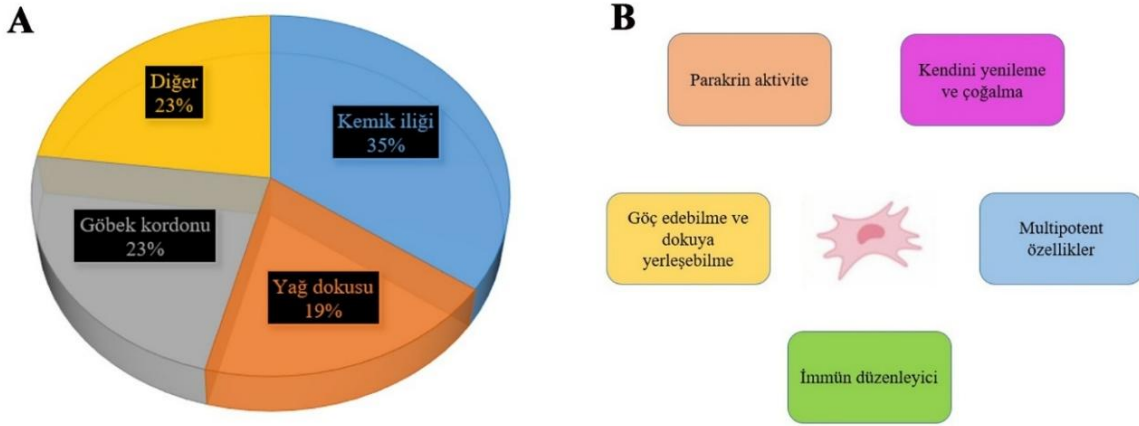
kaynaktır. Etik sorunlar oluşturmaması, düşük immünojenik özellikler göstermesi ve kolay elde edilebilir olması kullanımı açısından avantaj sağlar (38). Ayrıca tekrarlayan pasajlarda kök hücre özelliklerini bir dereceye kadar sürdürür (39). **Tablo 2**'de MSH'nin ayrıştırıldığı dokular ve özellikleri gösterilmiştir. MSH'nin elde edildiği üç temel kaynak ve gösterdiği özellikler karşılaştırmalı olarak **Tablo 3**'te verilmiştir.

Tablo 2. MSH'nin ayrıştırıldığı dokular ve işlevsel özelliklerinin karşılaştırılması (40).

Kısaltmalar	MSH kaynağı	İşlevsel özellikler
Kİ-MSH	Kemik iliği	Kondrositlere farklanma yeteneği daha yüksektir. YD-MSH'den daha yüksek TGF- β 1, PGE2 ve IL-6 ifadesi.
YD-MSH	Yağ dokusu	Çoğalma oranı Kİ-MSH'den daha yüksektir. Adipositlere farklanma yeteneği daha yüksektir. İmmünsüpresyon Kİ-MSH'den daha güçlüdür. İmmünojenisite Kİ-MSH'den daha düşüktür ve VEGF, HGF, Nestin ve nörotrofik faktör ifadeleri daha yüksektir.
iGK-MSH	İnsan göbek kordonu	Kİ-MSH ve YD-MSH ile karşılaştırıldığında çoğalma potansiyeli ve büyüme hızı daha yüksek, in vitro geçiş potansiyeli daha fazladır ve mitogen kaynaklı T hücre yanıtı daha fazla inhibe edilmektedir. Daha geniş farklanma potansiyeli. Daha düşük immünojenite. Salgılanan grup tümörle ilişkili fibroblast fenotipini ifade etmez. Kİ-MSH ve YD-MSH'den daha güçlü anjiyogenik kapasiteye ve YD-MSH'den daha yüksek PGE2 ve IL-6 ifadesine sahiptir.

Tablo 3. MSH'nin doku kaynakları ve özelliklerinin karşılaştırılması (41).

Özellik	Kİ-MSH	YD-MSH	iGK-MSH
Niş	Hematopoetik	Anjiyogenik	Hematopoetik
Doku elde edilebilirliği	++	+++	+++
SCI klinik çalışmalarda kullanım	+++	++	+++
Prosedür	İnvaziv	Minimal İnvaziv	İnvaziv değil
Çoğalma kapasitesi	+	++	+++
Hücre verimi	+	+++	++
Otolog kullanım	+++	+++	+
Allojenik kullanım	+++	+++	+++



Şekil 5. MSH kaynakları ve klinik özellikleri.

A: Klinik çalışmalarda kullanılan MSH kaynaklarının dağılımı. **B:** MSH'nin klinik uygulamalara yön veren özellikleri (42, 43).

iGK-MSH ayrıştırılırken iki farklı yöntem kullanılır; bunlardan biri eksplant yöntemi diğeri ise enzimatik yöntemdir. Eksplant yöntemi için göbek kordonuna ait ilgili alandan alınan doku mekanik olarak ufak parçalara ayrıştırılır, kültür sıvısı içinde ekim yapılır ve haftalarca hücrelerin çoğalması beklenir. Bu yöntem oldukça pratiktir ve enzimlerin oluşturabileceği hücre hasarını önler (44). Literatürde en önemli kısıtlılığı tutarlı sayıda hücre elde edilme güçlüğü olarak gösterilmiştir. Enzimatik sindirim ise daha zor ama daha tutarlı bir hücre elde etme yöntemidir. Bu yöntemde kollajenaz ya da hyaluronidaz kullanılarak (tripsin isteğe bağlı) hücre elde edilir (45). Ayrıca bunlara ek olarak bu iki yöntemin birlikte kullanıldığı yaklaşımlar da literatürde bulunur (46).

4.3.3. MSH Özellikleri ve Klinik Çalışmalar

MSH; yenilenme ve yüksek düzeyde farklanma kapasiteleriyle diğer hücrelerden ayrılır. Oldukça güçlü parakrin etkileşim gösterir (47). MSH, immün düzenleyici, proanjiyogenik, anti-inflamatuvar ve anti-fibrotik özellikler gösterir. Ayrıca farklanma yetkinliği, çoğalma (trofik etkinlik), göç ve hedef dokuya yerleşme (homing) özellikleri klinik uygulamalara yön verir (**Şekil 5B**) (42). Diğer kök hücrelere (embriyo kök hücresi ve uyarılmış pluripotent kök hücreler) göre oldukça kolay ayrıştırılabilir ve kültüre edilebilir. Ayrıca immün baskılayıcı özellikler gösterir ve

yüzeylerinde daha az MHC-I ve II ifade eder, bu nedenle daha az immünojeniktir. Bu özellikleri farklı dokularla yapılan klinik çalışmalarda fayda sağlar (48).

MSH'nin klinik etkinliğine yönelik birçok çalışma bulunur (49). Bu çalışmalar hayvanlarda oluşturulan hastalık modelleri veya in vitro modeller üzerinde yürütülür. Bu modellerde öne çıkan hastalık grupları; nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, multiple skleroz, Parkinson), travmatik beyin hastalıkları, kanser ve iskemik hastalıklardır (miyokard infarktüsü, periferik arter hastalığı ve iskemik inme). Bunların dışında, kemik hastalıkları (disk dejenerasyonu, osteoartrit ve romatolojik hastalıklar), karaciğer hastalıkları, viral enfeksiyonlar, preeklampsi ve gestasyonel diyabet komplikasyonları gibi hastalıklar üzerine de çalışmalar bulunur (50). **Tablo 4**, MSH'nin deneysel tedavilerde kullanıldığı hastalıkları gösterir.

Tablo 4. MSH'nin klinikte denendiği hastalıklar.

Hastalıklar
Alzheimer hastalığı
Kemik ve kırık hastalıkları
Otoimmün hastalıklar
Amyotrofik Lateral Skleroz
Diyabet
Glokom
Graft Versus Host hastalığı
İntervertebral disk hastalığı
Multiple skleroz
Kalp krizi
Ağrı
Parkinson hastalığı
Retina hastalıkları
Spinal kord hasarı

MSH'nin klinik çalışmalarda kullanımını bazı kısıtlılıklar içerir. Bunlardan birisi immün özelliklerinin alıcı dokuyla uyumsuzluğudur. Bu bakımdan MSH düşük de olsa bir immünojenik risk taşır. Bu hücrelerin verilmesiyle bazı proinflamatuvar maddeler salgılanarak hedef dokuda immünite harekete geçirilebilir (51). Bir diğer zorluk MSH'nin heterojen özellik göstermesidir, bu özellik sadece elde edildikleri kaynaklardan değil; kültür koşulları, ayrıştırma teknikleri, dondurma çözme yöntemlerinden de etkilenir (52). Göç ve hedef bölgeye yerleşebilme kapasiteleri tekrarlayan pasajlarda azalır. Bunun nedeni hem hücre yüzeyindeki özel reseptörlerin azalması hem de dokuda meydana gelen hasara bağlı dokunun hücrelerle etkileşiminin azalmasıdır.

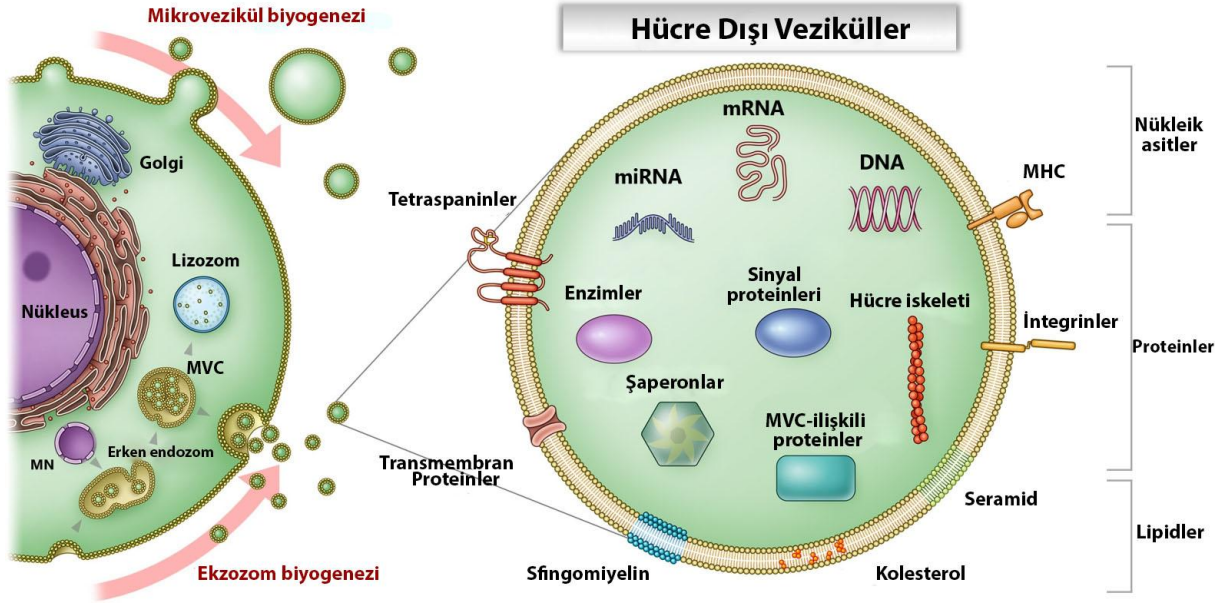
Uygulanmasındaki başka bir risk ise hücrelerin hedeflen bölgeye ulaşmasının kesin olarak sağlanamamasıdır. Bu da yapılan uygulamanın etkinliğini öngörülemez hale getirir. Ayrıca o bölgede toplanarak vasküler sorunlar oluşturabilir ve düşük de olsa tümör oluşturma riski taşır (43, 53). Tüm bu riskler hücrelerin kullanımını kısıtlar ve farklı tedavi yöntemleri arama isteği oluşturur. Hücrelerden salgılanan hücre dışı veziküller günümüzde bu arayışa yanıt olabileceği düşüncesiyle çok yönlü araştırılmaktadır.

4.4. Hücre Dışı Veziküller ve Ekzozomlar

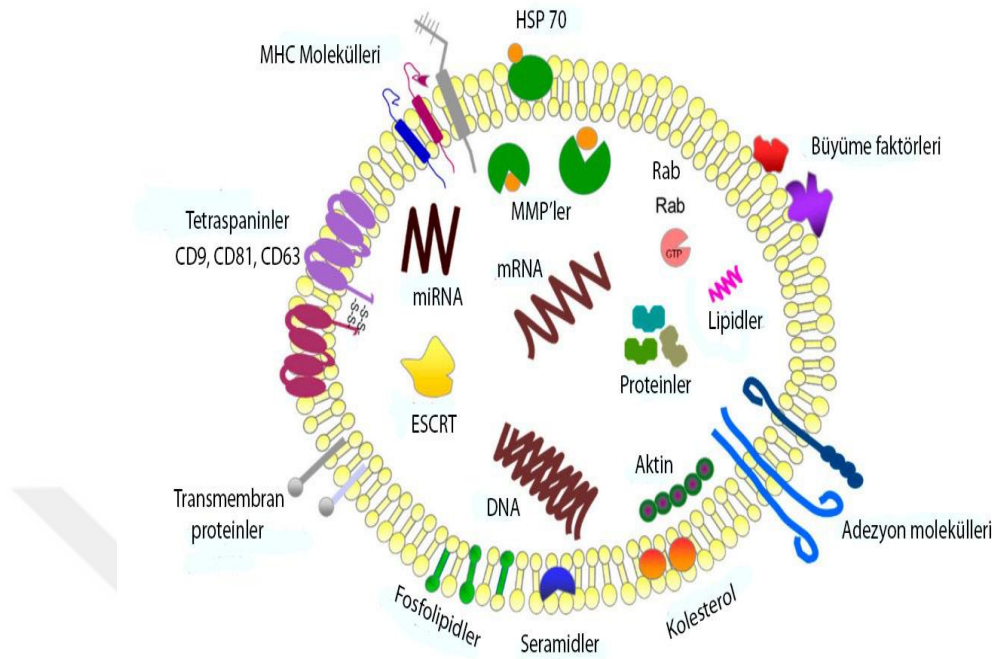
Ekzozomlar, ilk olarak 1983 yılında Harding ve Pan'ın birbirlerinden bağımsız olarak yapmış oldukları çalışmalarla keşfedilmiştir. Bu çalışmalarda transferrin reseptörleri, plazma membranından retikülositlere plazma zarı özellikleri gösteren özel bir yapıyla taşınmıştır (54, 55). İlk olarak ince veziküller olarak adlandırılan bu yapılara zamanla “ekzozom” denmeye başlanmıştır. Ekzozomlar, lipid çift zarla çevrili, 30-200 nm boyutlarda, endozom yolağından gelişen, içeriğinde proteinler, lipidler, nükleik asitler ve küçük sinyal molekülleri bulunduran, hücre dışı veziküllerin en küçük tipidir (56). Bu yapılar iki farklı yolla sentez edilir (57). Hücre içerisinde endozom olarak sentez edilip daha küçük parçalara ayrılarak multiveziküler cisimcikler (MVC) olarak adlandırılır. Sentezlenen MVC özel bir protein ailesi yardımıyla plazma zarıyla kaynaşır. Endozom yolağında oluşan moleküller ya lizozom olarak hücre içi sindirimde kullanılır ya da yukarıda da belirtildiği gibi hücre dışına birtakım etkiler oluşturmak için atılır (**Şekil 6**) (58). Hangi yola yöneleceğinin nasıl belirlendiğine yönelik yapılan çalışmalarda zardaki kolesterol düzeyinin bu süreci etkilediği gösterilmiştir. Eğer kolesterol seviyesi yüksek ise hücreden atılma eğilimindedirler. Dışarı atılacak olan moleküllerin yüzeyinde ESCRT olarak bilinen “endozomal sorting complex required for transport” molekülleri yerleştirilir. Bu proteinler ekzozomların tanımlanmasında kullanılır (59). Yapılan çalışmalarda ekzozomların, çoğalma, büyüme ve gelişme, anjiyogenez, immün düzenleme, enfeksiyon, metastaz, yeniden düzenleme (remodeling) gibi hücresel süreçlerde etkin rol oynadıkları gösterilmiştir (60).

Ekzozomlar küresel ancak hazırlama sırasında maruz kaldıkları kurutma işlemleri nedeniyle fincan şekilli veya ovoid görünebilir (61). Yoğunluğu 1,08 ile 1,22 g/mL arasında değişir. Çevresi iki sıra fosfolipid zarla çevrilidir. Zar yapısında kolesterol, gangliozid, fosfatidilserin, fosfogliserin bulunur (62). Çift katlı zar sayesinde, mikroçevrede oluşabilecek enzimatik yıkıma karşı dayanıklılık ve moleküler taşıma sırasında kararlı bir yapıyla ekzozom içeriği dış ortam

koşullarından korunabilir (63). Ekzozomlar farklı vücut sıvılarından ayrıştırılabilir; tükürük, balgam, gözyaşı, idrar, semen, mezotel sıvıları, beyin omurilik sıvısı, asit ve süt bunlara örnektir (64). Ekzozomlar elde edildikleri kaynak ve kullanıldıkları yolakla ilişkili olacak şekilde farklı yüzey proteinleri içerir (65). Bunun yanında kaynağından bağımsız ortak proteinler olan tetraspaninler (CD9, CD63, CD81), Alix, TSG, Rab-GTPaz, HSP70 ve HSP90 bulundurur (Şekil 7) (66).



Şekil 6. Hücre dışı vezikül biyosentezi ve içeriği (65).



Şekil 7. Ekzozomların içeriği ve yapısı (67).

Ekzozomların içerikleri **Tablo 5**'te detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 5. Hücre dışı vezikül içeriği (65).

Nükleik Asitler	
DNA	Genomik DNA, Mutasyona Uğramış DNA, Mitokondriyal DNA
RNA	mRNA, miRNA, lncRNA, piRNA, circRNA,
Proteinler	
Tetraspaninler	CD9, CD63, CD81, CD82
MVC biyogenezi	Tsg101, Alix, Rab proteinleri
Isı şoku proteinleri	HSP90, HSP70,
Büyüme faktörleri ve sitokin	TNF- α , VEGF, EGF, TNF Reseptörleri, TGF- β
Hücre yapışması	İntegrinler, Hücreler Arası Yapışma Molekülü 1
Antijen sunumu	MHC sınıf I ve II/peptit kompleksleri
Sinyal proteinleri	GTPaz HRas, Ras ile ilişkili protein, Src, RhoA
Hücre iskeleti bileşenleri	Aktinler, Kofilin-1, Moesin, Miyozin, Tübülinler, Vimentin
Transkripsiyon ve protein sentezi	Histon, Ribozomal proteinler, Ubiquitin
Metabolik enzimler	Yağ asidi sentaz, Fosfoglisarat kinaz, ATPaz, Aldehit redüktaz
Ölüm reseptörleri	FasL, TNF ile ilişkili apoptoz indükleyen ligand
Demir taşıma	Transferrin reseptörü
Lipitler	
Seramidler	
Kolesterol	
Lökotrien (LTA4, LTB4, LTC4)	

Siklooksijenazlar (COX-1, COX-2),
Prostaglandinler
Fosfatidilserin
Sfingomiyelin

Ekzozomlar etkilerini üç farklı yolla gösterir: hedef hücrenin zarındaki reseptörleriyle doğrudan temas ederek, hedef hücrenin çevresindeki hücreler arası matriksi düzenleyerek, hedef hücre zarıyla füzyona uğrayıp bazı biyoaktif moleküllerin sentezlenmesini sağlayarak etki gösterir (68, 69).

4.5. MSH Kökenli Ekzozomlar

MSH'den elde edilen ekzozomlar immün düzenleyici ve yenileyici özelliklerinden dolayı klinik çalışmalarda kullanılır (70). Sahip oldukları parakrin aktivite klinik etkinliğini artırır. Hücresiz tedavilerde, ilaç ve aşı üretim çalışmalarında kullanılır. Hastalıklarda biyobelirteç amaçlı kullanıldığı klinik çalışmalar bulunur. Hücresiz tedaviler, MSH'nin doğrudan kullanılmasına göre avantajlar sağlar. Yukarıda bahsedildiği gibi MSH klinik kullanımda birtakım kısıtlılıklar oluşturur; toksisite, kanserleşme riski, immün red ve pulmoner embolizm bunların arasında sayılır. Ekzozomlar belirtilen yan etkiler konusunda daha güvenlidir. Ayrıca küçük boyutlarından dolayı hedef dokuya kolay ulaşır. Bu nedenle bugün hücresiz tedavilerde ekzozomlar klinik çalışma düzeyinde denenmektedir.

Ekzozomlar birbirinden farklı temellere dayanan beş farklı yöntemle ayrıştırılır. Bu yöntemler ultrasantrifüjleme, ultrafiltrasyon, çöktürme (presipitasyon), immünafinite yakalama ve boyut temelli kromatografidir. Her bir yöntem saflık, verimlilik ve süre açısından farklılık içerir (**Tablo 6**) (71). En sık kullanılan ve altın standart olarak bilinen yöntem ultrasantrifüjleme yöntemidir. Ekzozom ayrıştırma işlemlerinin %80'inde kullanılır (72). Bu yöntemde örneklerin yoğunlukları temel alınarak ayrıştırma yapılır. Alınan örneklerdeki hücresel kırıntı, proteinler ve büyük veziküllerin ayrıştırılması için her turda hızı artarak tekrarlayan çevirmeler gerekir. Yüksek yoğunlukta moleküller dibe çöker (73). Ekzozom çöktürmesi işlemleri 100.000g-150.000g arasında gerçekleştirilir. Hız ne kadar yükselirse ekzozom ayrıştırma sürecinde verimlilik artar. Literatürde ortalama 3,5-4 saatlik bir süre içerisinde ekzozomların ayrıştırıldığı bildirilir (74). Diğer yöntemlere göre oldukça ucuz bir yöntemdir. İyi test edilmiş bir yöntem olup ortalamanın üzerinde yoğunluk ve saflıkta ekzozom ayrıştırmayı sağlar (75). Bu yöntem birtakım kısıtlılıklar

da içerir. (76). İşlem süreci uzundur. Ayrıca fazla sarf malzeme gerekir. Dört saat üzerindeki işlemler ve 120.000g üzeri hız ekzozomlara fiziksel zarar verir. Çevirmeler arasında uygulayıcının müdahaleleri (ekzozomları toplama ve taşıma gibi) gerekir. Kültür süpernatanın ayrıştırılması sırasında, ekzozom kaybı olabilir. Ayrıştırma için yüksek hacim gerekir bu da yoğun hücre kültürü işlemlerini gerektirir (77).

Tablo 6. Ekzozom ayrıştırma yöntemleri (78).

Ayrıştırma yöntemi	Zaman [dk]	Örnek türleri	Hacim [mL]	Üstünlükleri	Zayıflıkları
Ultrasantrifüj	140–600	Hücre kültürü sıvısı, idrar	≤25	-Klinik tedavi uygulamaları ve proteomik çalışmalar için iyi saflık -iyi düzey saflık	-Pahalı malzemeler -Karmaşık prosedür -Tekrarlanan adımlar izole veziküllere zarar verir
Ultrafiltrasyon	130	Hücre kültürü sıvısı, idrar	≤15	-Yüksek verim -Geniş örnek hacmi aralığı -Basit prosedür	-Düşük saflık -Filtre tıkanıklığı nedeniyle verimin azalması -Plazma için uygun değil
Çöktürme	30–120 veya gece boyu	Hücre kültürü sıvısı, serum	≤10	-Yüksek verim -Basit prosedür	-Düşük saflık (örneğin, polimer kirliliği) -Plazma için uygun değil
İmmünafinite yakalama	240	Hücre kültürü sıvısı	0,5–3	-Proteomik analizler için yüksek saflık -Yüksek seçicilik	-Düşük verim -Düşük örnek hacmi -Pahalı -Ek elüsyon adımı
Boyut dışlama kromatografisi	15	Hücre kültürü medyum	0,5–1,5	-Çöktürmeden daha yüksek saflık -Düşük hacim gerekli -Çeşitli numune tipleri için uygun -Vezikül bütünlüğünü korur	-Protein kontaminasyonu -Düşük verim -Pahalı malzemeler -Karmaşık prosedür -Viskoz numuneler için seyreltme gereklidir

Ekzozomlar kaynağına, içeriğine, işlevine bağlı heterojenite gösterir (79). Bu da ekzozomların tutarlı ve kararlı bir şekilde ayrıştırılmasını zorlaştırır. Bu noktada ekzozomların ayrıştırılması için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Her birinin kendine göre faydalı ve kısıtlı yönleri bulunur. Bu yöntemlerde ekzozomların büyüklüğü, yoğunluğu ve yüzey içeriği dikkate alınır (80). En sık kullanılan ve ekzozomların yoğunluğuna dayalı ayrıştırma yöntemi olan ultrasantrifüjden

yukarıda bahsettik. Bunun dışında boyut temelli ayırıştırma yöntemi olarak ultrafiltrasyon ve boyut temelli kromotografi yer alır. Bu yöntemlerde kullanılan porlardaki boşluklardan büyük moleküllerin geçişi engellenir ve küçük boyuttakiler kolaylıkla geçebilir. Bu yöntemler oldukça pratiktir ve aynı boyuttaki molekülleri rahatlıkla ayırt edebilir (78). Bu noktada en önemli kısıtlılık belli büyüklüklerdeki moleküllerin ekzozomlara karışması riskidir ki bu da ekzozom saflığında bir düşüşe neden olur (71, 81). Yüzey proteinlerine özel antikör afiniteleri temel alınarak yapılan ayırıştırma yöntemlerinde ise polimer çöktürme ve immünafinite kromotografi yer alır. Bu yöntemde düşük miktarlarla çalışabilme avantajı bulunur. Buna ek olarak yüzey proteinleri kullanıldığı için duyarlılık ve hassasiyet yüksektir fakat yüksek miktarlarda ayırıştırma ve saklama için uygun değildir. Ayrıca benzer protein grupları da karışabilmektedir (82, 83). Bunların dışında farklı yöntemlerle geliştirilen ticari kitlerle ayırıştırma yapılmaktadır. Bu kitler oldukça pratik, zaman kazandırıcı ve hızlıdır, fakat saf ekzozom ayırıştırma ve ayırıştırılan ekzozomların verimi konusunda başarılı değildir. Her biri oldukça pahalıdır ve elde etmesi zordur (75).

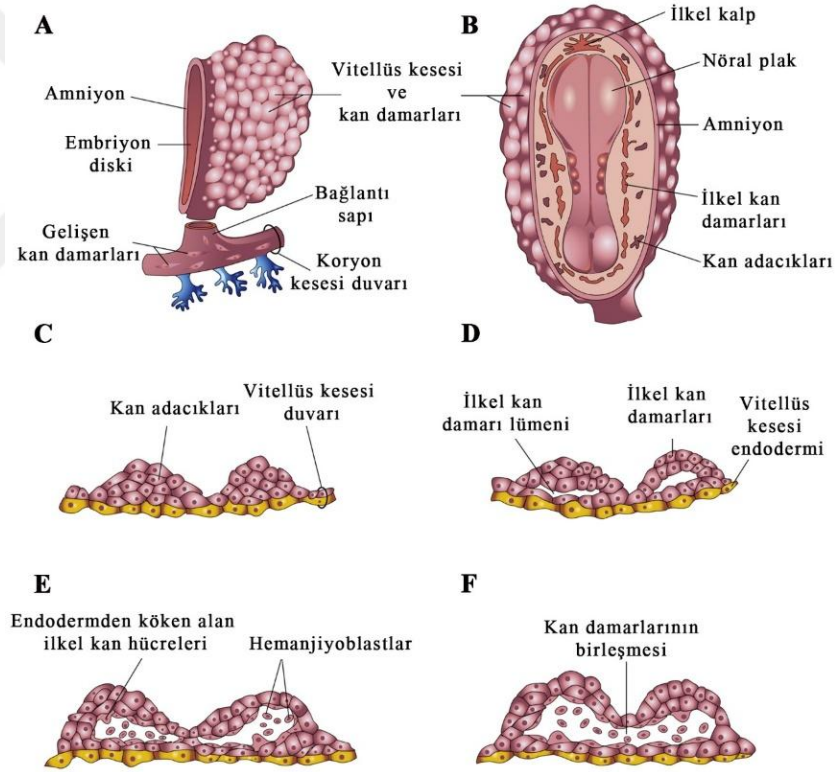
4.6. Anjiyogenez

4.6.1. Embriyon Kan Damarlarının Gelişimi

Anjiyogenez tanım olarak var olan damarlardan yeni damarın gelişimidir (84). Tarihte anjiyogenez kavramını ilk kullanan kişi 1794 yılında İskoç cerrah John Hunter'dır (85). Organların, hastalık ve sağlık durumlarında damarlanması metabolik ihtiyaçlarla orantılı olarak değişmekte, kanlanma da bu kapsama girer, demektir. Modern anlamda ise anjiyogenezden ilk söz eden tümör büyümesi ve anjiyogenez ilişkili çalışmalarıyla Judah Folkman olmuştur (86). Bu tarihten sonra anjiyogeneze yönelik sayısız çalışma yapılmıştır.

Embriyolojik süreçte ilk damar gelişimi gebeliğin 3. haftasının ortalarında (18. gün) başlar. Vitellüs kesesi duvarında ve embriyon dışı dokulardaki mezenkimal stroma hücreleri endodermin etkisiyle farklanmaya başlar. Embriyon dışı mezoderm içinde farklanan hücreler “kan adacıklarını” oluşturur (**Şekil 8**). İlk olarak damar öncüsü hücrelerden anjiyoblastlar gelişir. Bu hücreler organize olarak primer kapiller ağı oluşturur. Bu süreç vaskülogenez olarak adlandırılır. Embriyonda ilk damar oluşumudur. Vaskülogenezde etkili olan temel farklanma molekülü hücre yüzeylerinde bulunan vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü 2'dir (VEGFR-2). Gebeliğin erken döneminde (9-11. günler) ekstravillöz trofoblastların desiduaya tutunabilmesi için VEGFR-2 gereklidir.

Sinsityotrofoblastlar, anneye embriyo arasındaki ilk kan akımını oluşturmak için annenin endometriyum dokusundaki spiral arterleri invaze eder ve ilk uteroplental dolaşımı sağlar. Bu süreçte spiral arterler genişler ve kan basınçları ortalama bir artere göre düşük seyrederek. Sinsityotrofoblastlar plasantanın gelişimini hızlandırabilmek için maternal alandan gelen kana tıkaç uygulayarak gelen kandaki besin ve oksijen oranını düşürür, bu sayede hipoksik ortam oluşur ve VEGF miktarı artar. VEGF miktarı gebelikte trofoblastlarca düzenlenerek embriyonun desiduaya tutunmasında etki gösterir, bu süreç uygun damar ve plasenta gelişimi için gerekli ve embriyonun yaşamsal devamlılığında etkilidir (87). Plasenta anjiyogenezinin gerçekleşmesinde etkinin oluşması için bazı moleküller aracılık eder. Ekzozomlar aracılığıyla aktarılan miRNA'larla VEGFR-2 seviyeleri ve plasenta anjiyogenezini düzenlenir (78).



Şekil 8. Anjiyogenez süreci (88).

A: 18 günlük bir embriyonda gelişen vitellüs kesesi ve koryon kesesinin bir parçasında kan damarlarının gelişimi. **B:** Embriyonun dorsalden görünümü, kalp taslağı ve kan adalarının gelişimi. **C:** Kan adalarının vitellüs kesesi duvarında farkanması. **D:** Kan adalarının ileri farkanması, lümen oluşumu ve ilkel kan damarlarının gelişimi. **E:** Endodermden kan hücreleri ve ilkel kan damarlarını oluşturan hemanjiyoblastların gelişimi. **F:** Oluşan kan damarlarının birleşmesi.

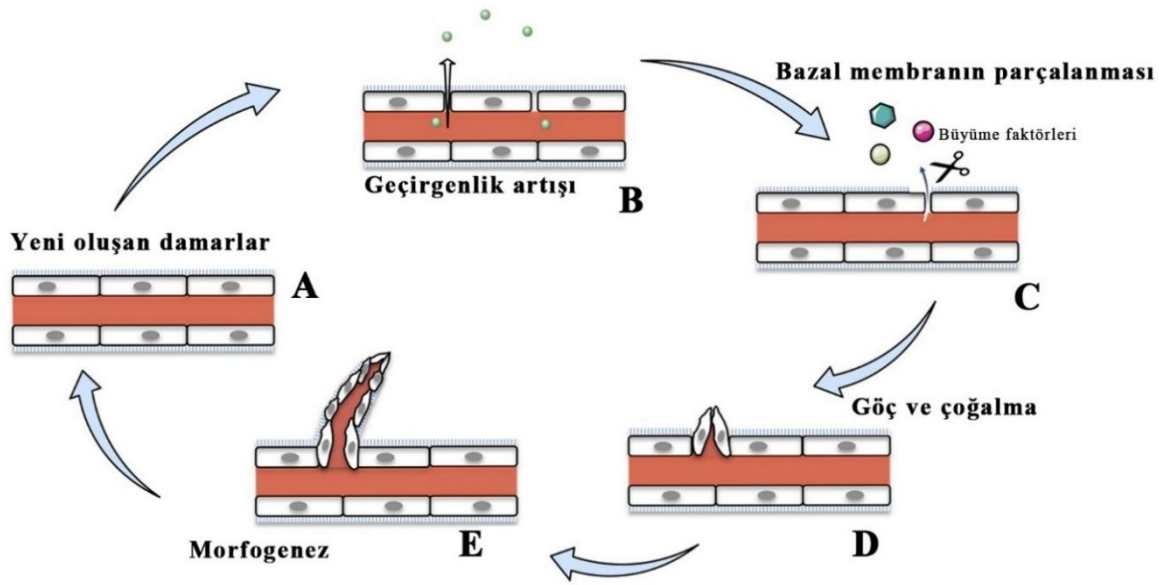
4.6.2. Anjiyogenezin Gelişim Basamakları

Fetüse ait dolaşım oluşurken, dolaşım sistemini oluşturan biyolojik süreç olan anjiyogenez, hücrelerden ve ESM'den salgılanan büyüme faktörleri ve enzimlerin etkisiyle gerçekleşir. Farklı basamaklardan meydana gelir. Bu basamaklar sırasıyla;

- I. Endotel geçirgenliğinde artış,
- II. Perisitlerin damar duvarından ayrılması,
- III. Bazal membranın yıkımı,
- IV. Endotel hücrelerinin çoğalması,
- V. Endotel hücrelerinin göçü,
- VI. Endotel hücrelerinin çoğalma ve göçünün inhibisyonu,
- VII. Damar duvarının olgunlaşması (küçük damarların çevresinde perisitler, büyük damarların çevresinde ise düz kas hücreleri),
- VIII. Bazal membran bütünlüğünün yeniden sağlanmasıdır.

Her basamak birtakım büyüme faktörlerinin etkisiyle gerçekleşir. Bu moleküller arasında en önemlileri; VEGF-A, FGF-2, PDGF, TGF- β ve MMP'lerdir. İlk olarak kan damarlarının oluşacağı bölgelerde bulunan mezenkim hücreleri farklanma uyarısıyla anjiyoblastlara dönüşür ve yüzeylerinde VEGFR-2 üretir. Mezenkimden salgılanan VEGF-A uyarısıyla hücreler farklanır ve hücreler arası boşluklar gelişir. Kan adalarının arasındaki hücreler arası boşlukların bir araya gelmesiyle küçük lümenler gelişir. Gelişen boşluğun kenarındaki hücreler yassılaşarak endotel hücrelerine dönüşür. Mezenkimden salınan FGF-2 ve VEGF-A'nın etkisiyle endotel hücreleri çoğalır. Endotel hücrelerinin arasındaki boşluklar birleşerek endotel kanallarının gelişimini sağlar. Bu anastomozlaşmada vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü 1 (VEGFR-1) (Flt-1) molekülü etkilidir. Bu süreç vaskülogenez olarak bilinir. VEGF-A molekülü endotel hücrelerini göç yönünde uyarır. Hücrelerin yüzeyindeki Notch sinyali, gelen uyarılara yanıt olarak endotel hücrelerinde tomurcuklanma gelişimini sağlar. Endotel hücreleri aldıkları uyarılara ikincil olarak “uç” ve “sap” hücreleri olarak farklanır. Uç hücreleri bölünme özelliklerinden daha çok filopodlar uzatma özelliğine sahiptir, bu hücreler yüzeylerinde düşük düzeyde Notch sinyalleri içerir. Devam eden süreçte hücrelerde anjiyopoetin ve yüzeylerindeki Tie-2 molekülünün etkisiyle var olan damarlardan hücreler tomurcuklanır. VEGFR-2 etkisiyle endotel hücreleri farklanarak tüp oluşumu yönünde uyarılır. Var olan damarların komşu mezenkime doğru tomurcuklanması ve orada gelişen

tomurcuklarla füzyonu sonucunda yeni kanalların gelişimi ise anjiyogenez olarak tanımlanır. Öte yandan sap hücreleri bölünme yeteneklerine sahip olup uzayarak tüp oluşumunu sağlar. Endotel hücreleri salgıladıkları PDGF ile mezenkimin damar endoteline doğru göçünde etkili olur. Salgıladıkları TGF- β gibi sinyallerle de, mezenkimal hücreleri kas ve perisit hücrelerine farklılaşma yönünde uyarırlar (89). Bu sırada ESM, endotel hücreleriyle integrin reseptörleri üzerinden etkileşim kurarak ve endotel hücrelerine çoğalma sırasında tutunma için yüzey oluşturarak ve rehber etkisi yaratarak damar gelişimine katkı sağlar. Endotel hücrelerinin ESM üzerinden ilerlemesi için matriks metalloproteinazlar kullanılır (90). Göçü tamamlanan endotel hücrelerinin çoğalması anjiyogenez inhibitörleri tarafından durdurulur. Sonraki aşamada mevcut damarlar olgunlaşır ve sabit üç boyutlu bir yapıya dönüşür. Bu yapı için damar çevresindeki kas ve perisit hücrelerinin uyarılması gereklidir. Bu uyarı ise endotelden salınan PDGF ve TGF- β etkisiyle gelişir. PDGF uyarısıyla kas hücreleri göç yönünde uyarılır. Eş zamanlı TGF- β uyarısıyla ESM elemanları üretilir. Böylece tüm katmanları gelişmiş olgun bir damar gelişimi gerçekleşmiş olur (Şekil 9).



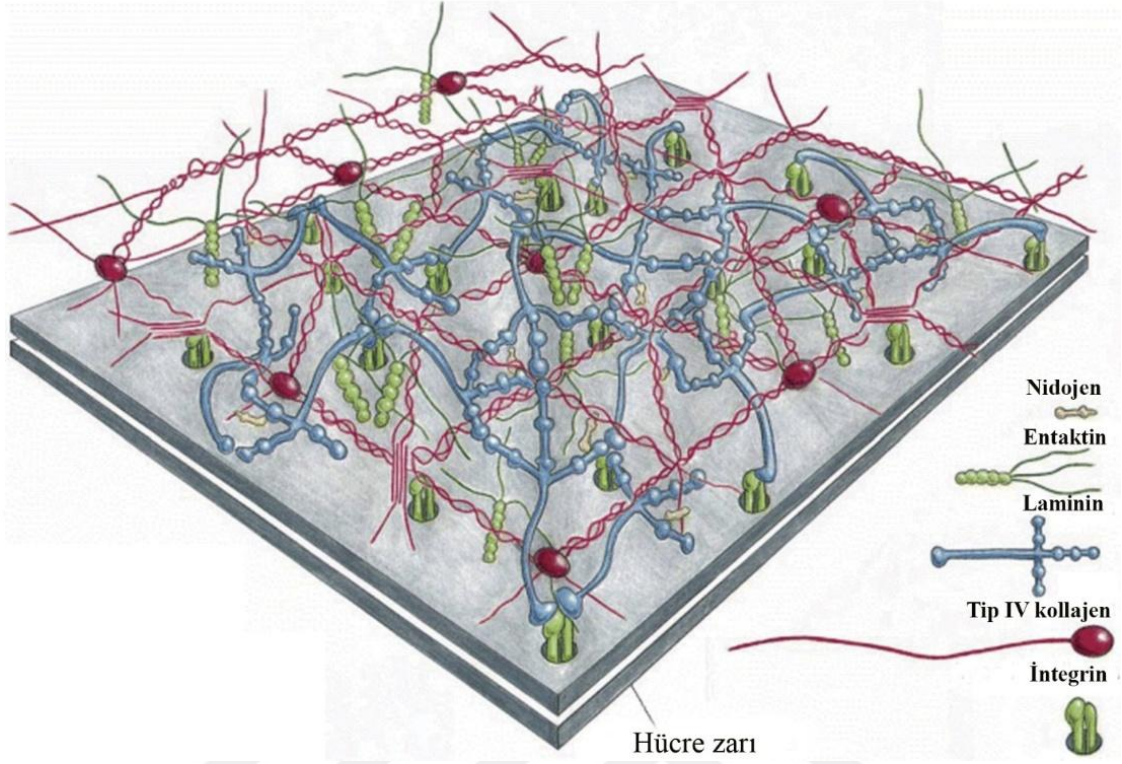
Şekil 9. Anjiyogenez basamakları.

A: Var olan sabit damar yapısı. **B:** Damar geçirgenliğinde artışla damar dışına birtakım büyüme faktörleri çıkar. **C:** Oluşan uyarıcı etkiyle bazal membran parçalanır ve hücrelerin hareketi

kolaylaştırılır. **D:** Uyarılan hücreler farklanarak çoğalır ve hedef bölgeye doğru hareket eder.
E: Hücreler yeni damarı oluşturacak şekilde farklanır ve yeniden yapılandırılır (91).

4.6.3. Bazal Membran ve Anjiyogenez

Bazal membran (BM), endotel hücrelerinin üzerinde oturduğu, endotel hücreleriyle altındaki bağ dokunun iletişimini sağlayan yapıdır. Bu yapı; laminin, tip IV kollajen, heparan sülfat, nidojen, entaktin ve perlekan içerir (92). Bu moleküller birbirleriyle iletişim kurarak üç boyutlu bir yapı oluşturur. Temelini laminin ve tip IV kollajen meydana getirir. Diğer proteinler bu iki temel bileşenin oluşturduğu üç boyutlu iskelete tutunarak karmaşık bir ağ oluşturur (93). Bu sayede endotel hücreleriyle altındaki bağ doku elemanları birbirine yapışır (**Şekil 10**). Endotel hücresindeki değişiklikler BM sayesinde bağ dokuya iletilir. BM moleküllerin dağılımını engellemeyecek şekilde yapılar arası boşluklar içerir. Bu sayede salgılanan maddeler parakrin ve endokrin yoldan endotel ve diğer hücreleri etkileyebilir. Ayrıca BM önemli bir bariyer görevi görür. Hücrelerin belli dizilimi koruyacak şekilde durmasını sağlar ve hücre göçü sırasında hücrelere rehberlik ederek üç boyutlu yapının yeniden oluşumuna katkı sağlar. Anjiyogenezde endotel hücrelerinin göçü öncesinde BM'nin yıkılması gerekir. Bütünlüğün bozulması da endotel hücrelerini göç yönünde uyarır. Bu basamak karmaşıktır, temelde matriks metalloproteinazların etkisiyle gerçekleşir. Enzim etkisiyle BM bütünlüğü bozularak endotel hücrelerine hareket imkanı sağlayacak reseptör bölgelerinin açılması sağlanmış olur. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda 20 farklı matriks metalloproteinaz özelliği gösteren enzim tanımlanmıştır. Bu enzimler insanda farklı biyolojik süreçlerde etkilidir. Bunlar arasında doku tamiri ve yenilenmesi, hücre farklanması, doku ve organların gelişimi, hücre hareketleri, anjiyogenez, hücre çoğalması ve göçü, yara iyileşmesi ve apoptoz gösterilebilir. Her bir süreçte etkili olan enzimler farklıdır. Bunlardan MMP-2, 5 ve 9 anjiyogenezde etkilidir (94).



Şekil 10. Bazal membranın yapısı.

Bazal membran integrin proteini ile hücre zarına bağlantı yapar. Bazal membranın ana yapısını laminin ve tip IV kollajen oluşturur. Şekilde laminin, tip IV kollajen ve integrin bağlantısını görüyoruz (95).

4.6.4. Anjiyogenezde Etkili Faktörler

Pek çok faktör anjiyogenez üzerinde etkilidir. Anjiyogenez yönünde uyarılara ve uyaran moleküllere genel olarak “proanjiyogenik uyarı” veya “molekül”, aksi yönde etki gösterenlere ise “antianjiyogenik uyarı” veya “molekül” denilir. Bu moleküller büyüme faktörleri, ESM bileşenleri ve enzimler olarak sınıflandırılır. Enzimler ve ESM önceki bölümlerde kısaca verildi. Büyüme faktörleri arasında en iyi bilineni Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF) molekülüdür. Napoleone Ferrara ve arkadaşları tarafından 1989 yılında keşfedilmiştir (96). VEGF protein ailesi, insanlarda, hepsi birbirinin izoformu olan VEGF-A (veya VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörü (PlGF) olarak adlandırılan beş ayrı gen ürününden oluşur. Ailenin tüm proteinleri dimerik yapıya sahiptir. Dimerler birbirlerine sisteinlerle bağlıdır. Moleküllerin arasında en sık bulunan izoform VEGF-A molekülüdür. Ortalama molekül ağırlığı 36-40 kDa arasında değişir. Bunun dışında VEGF-A farklı alt tipleri de içerir. Bunlar arasında anjiyogenezle en ilişkili olan VEGF₁₆₅’tir. Başlangıçta endotel hücrelerine özel bir mitojen olarak tanımlanmıştır. Sonraki çalışmalarda farklı hücrelerden de üretildiği anlaşılmıştır. Makrofajlar, trombosit, keratinositler ve böbrek mezangiyal hücreleri bu molekülü üreten hücreler arasında gösterilebilir (97).

VEGF etkisini iki farklı reseptör üzerinden gösterir. Bu iki reseptör anjiyogenezde etkilidir: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (farede Flk-1, insanda KDR). Tüm reseptörler, hücre içi tirozin kinaz aktivitesi gösterir. Reseptörleri oluşturan parçalar dimerize olur ve reseptörlerin tirozin bölgelerinde gerçekleşen fosforilasyonla aktive olan ortak sinyal yollarında aşağı akış sinyalizasyonu ile etki eder. VEGFR-1 ve 2 molekülleri VEGF’ye bağlanma isteği açısından farklılık gösterir. İki molekülün VEGF’ye bağlanma istekleri karşılaştırıldığında VEGFR-1’in 2’ye göre 10 kat daha yüksek bağlanma isteği vardır. Öte yandan temel reseptör olan VEGFR-2 ise bağlandıktan sonraki etkililik açısından VEGFR-1’den belirgin olarak güçlüdür (98). Bu nedenle antianjiyogenik yaklaşımlarda asıl hedef alınan moleküldür. VEGFR-2, 4. kromozomda yerleşiktir ve yapısında 1356 aminoasit bulunur. Ortalama molekül ağırlığı 230 kDa’dır. Glikozile ve non-glikozile formları bulunur. Hücre zarında yerleşmiştir. Hücre içinde işlevine göre değişen farklı yollardaki proteinlerin aktifleşmesini sağlar. Böylece fizyolojik ve patolojik anjiyogenezde rol alır. Genellikle endotel hücreleri (vasküler ve lenfatik) üzerinde ve embriyonik öncü hücrelerde ifade edilir ve endotel hücreleri üzerinde mitojenik ve anti-apoptotik aktiviteye sahiptir. Ayrıca

sadece endotel hücreleri üzerinde değil endotel olmayan hücrelerde de sentez edilir (99). Özellikle gebeliğin erken dönemlerinde hemanjiyoblastlarda sentezlenerek vaskülogenezi sağlar.

VEGF'nin aktivitesi sadece vasküler sistemle sınırlı değildir; VEGF kemik oluşumu, hematopoez, yara iyileşmesi, gelişme gibi fizyolojik süreçlerde de rol oynar. VEGFR-2 özellikle kanser hastalıklarında uyarılmış endotel hücreleri üzerinde artış gösterir (100). Bu kanser türleri arasında karaciğer ve böbrek kanserleri önde gelir. Renal iskemik hastalıklarda iskemi alanındaki damar yüzeyleri üzerinde artış gösterir (101). Preeklampsiye yönelik çalışmalarda göbek kordonu üzerindeki kaslarda ve endotel üzerinde azaldığı gösterilmiştir (102). Ek olarak diyabetik retinopati ve prematüre retinopatisi gibi klinik durumlarda da patolojik VEGFR-2 artışları izlenir. Klinik çalışmalarda VEGFR-2'nin baskılanmasına yönelik ilaç grupları ve bazı moleküller denenmektedir (103).

4.7. İn Vitro Anjiyogenez Modelleri

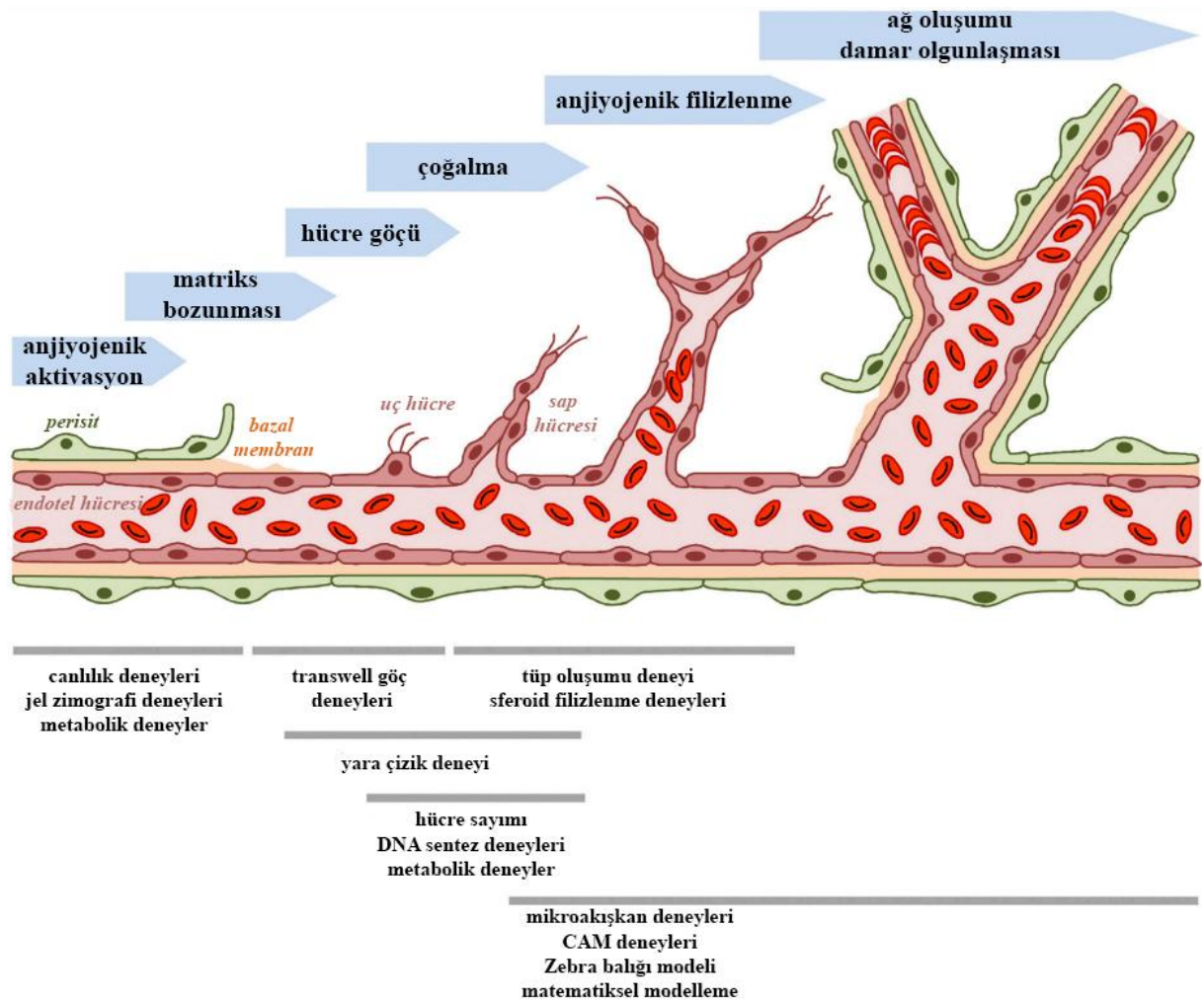
Anjiyogenez çok basamaklı bir süreçtir. Bu basamakların anlaşılması ve basamakları etkileyen yapıların, ortamların ve moleküllerin test edilmesi süreci aydınlatmak açısından önemlidir. Bu nedenle birtakım testler tasarlanmıştır. Bu testleri in vivo ve in vitro testler ikiye ayırabiliriz (104). İn vivo testler isminden de anlaşılacağı gibi canlı organizma kullanılarak yapılan deney tasarımlarıdır ve sıklıkla da hayvan modelleri üzerinde gerçekleştirilir. Buna karşın, in vitro modeller çeşitlilik açısından daha çoktur ancak canlı ortam içermez. İn vitro deneyler, anjiyogenezi ve anti-anjiyogenik ajanların etkilerini araştırmak ve değerlendirmek için değerli araçlardır (105). Bu nedenle sürece yönelik patofizyolojik çalışmalarda kontrol edilebilirliği, tekrar edilebilirliği ve özgüllük açısından in vivo deneylere göre daha sık tercih edilir.

İN vitro deneyler yukarıda değinildiği gibi, ele aldığı ve değerlendirdiği farklı basamaklara göre sınıflandırılır. Bunlar çoğalma, göç ve farklanmayı modelleyen deneyler olarak üç ana sınıfta değerlendirilir. Endotel göç, çoğalması, filizlenme, dallanma, farklanma ve lümen oluşumu gibi anjiyogenez mekanizmalarına katkıda bulunan süreçlerin yanı sıra, eşlik eden karmaşık hücre hücre ve hücre-ESM etkileşimlerinin test edildiği yaklaşımlardır (106). Çoğalmaya yönelik testlerde hücrelerin sayıları ve çoğalma zamanları test edilir. Hücrelerde deney sırasında oluşan sayısal fark belirlenir; ayrıca, etki eden maddenin de hücrelerin sayısı üzerindeki etkisi test edilebilir. Bunun yanında ilkinin göre net sayısal bilgi vermese de hücre canlılığı ve metabolizması üzerinden de

hücrelerin sayısal artışları konusunda bilgi edinilebilir. Bu testler CCK-8 veya MTT gibi kalitatif kolorimetrik değerlendirme testleri ve BrdU gibi nükleotid temelli testlerdir (107).

Bir diğer deney sınıfı ise göç (migrasyon) becerisinin test edildiği deneylerdir. Bu testlerde hücrelerin çoğalmalarından çok hareket becerileri ölçülür. Bu testlerde yine sayısal bilgi edinilebilir. En iyi bilenen göç testleri Boyden kabin deneyi (özel bir transwell deneyi) ve çizik deneyidir. Çizik deneyinde hücresel çoğalma durdurularak hücrelerin hareket becerisi tek tabaka kültürde ölçülür. Buna karşın Boyden kabin deneyinde hücrelerin göç ve tutunma becerileri (ESM elemanlarına) ölçülebilir. Bu iki deney anjiyogeneze yönelik önemli bilgi vermesinin yanında ucuz ve kolay uygulanabilir olmaları nedeniyle tercih edilir (108).

Üçüncü sınıf ise hücre farklılaşması temelli deneylerdir. Bu deneyler arasında en iyi bilinenleri Matrigel'de tüp oluşum deneyi, aortik halka deneyi, endotel-fibroblast eşkültürleridir (106). Anjiyogeneze Matrigel modeli, en iyi bilinen ve en basit iki boyutlu in vitro modeldir. Hücrelerin, içerdiği büyüme faktörleri (IGF-1, TGF- β , EGF, PDGF, bFGF, NGF, VEGF ve diğerleri) ve hücre dışı matriks proteinleri (~%60 laminin, ~%30 kollajen IV ve ~%8 entaktin ve perlekan) ile etkileşimi yoluyla tübüler bir ağ oluşturma yeteneklerini test etmek üzerine tasarlanmıştır (109). Matrigel®, hücre dışı matriks proteinleri açısından zengin bir tümör olan EngelbrethHolm-Swarm (EHS) fare sarkomundan elde edilen çözündürülmüş bir bazal membran ürünüdür. Başlıca bileşeni laminindir. Diğer bileşenler arasında kollajen IV, heparan sülfat, proteoglikanlar ve entaktine ek olarak, büyüme faktörlerini ve hücre dışı matriksi bozan proteinler ve bunların inhibitörleri gibi diğer işlevsel proteinleri içerir. Endotel hücrelerinin Matrigel üzerine kaplanması, inkübasyondan sonraki 18 saat içinde tüp benzeri yapılardan oluşan bir ağ oluşumunu sağlar (110). Tüp oluşum deneylerinde dallanma noktalarını, tübül alanını, tübül sayılarını, ortalama tübül uzunluğunu veya bu ölçümlerin çeşitli birleşimini saymak gibi anjiyogenezi değerlendirmek için çeşitli ölçüm parametreleri kullanılır (111). Bu deneyde endotel hücreleri şartlandırılarak, Matrigelin üzerine ekilir. Temas sonrası yapışma sağlanır ve damarların temelleri olan tüplerin gelişimi izlenir. Deney ortalama 18-20 saat sürer ve uygulama açısından pratiktir. Deney sonunda endotele ait tüp yapıları analiz edilerek endotelin farklılaşma düzeyi hakkında sayısal veri elde edilir (112). Bunların yanında bugün bu deney tasarımlarının 3 boyutlu formları da kullanılır (113). **Şekil 11'de** anjiyogeneze basamakları ve sınırları in vitro anjiyogeneze deneyleri verilmiştir.



Şekil 11. Anjiyogenez basamakları ve sınandıkları in vitro anjiyogenez deneyleri (114).

Endotel hücreleri in vitro anjiyogenez deneylerinde kullanılan primer hücre gruplarıdır. Bu hücreler farklı hayvan türlerinden ayrıca aynı türün farklı bölgelerinden ayrıştırılabilir. Tür olarak sığır, domuz, köpek ve insan tercih edilir (106). Sıklıkla primer hücre kültürü yapmak amaçlı ayrıştırılan hücreler son dönemde genellikle kültür şartlarına olan duyarlılıkları nedeniyle yerini hücre hatlarına, yani aynı hücrenin sonsuz çoğalabilen klonlarına bırakmıştır. Bu sayede hücrenin kültür özelliklerinden kaynaklı problemler dışlanabilir (105). Deneylerde farklı endotel hücreleri tercih edilir. Bunlar genel olarak mikrovasküler ve makrovasküler endotel hücreleri olarak sınıflandırılabilir. Mikrovasküler endotel hücreleri sırasıyla deriden (HDMEC), beyinden (HBMEC), kalpten (HCMEC) ayrıştırılır. Makrovasküler endotel hücresi olarak ise aortadan (HAEC) ve göbek kordonundan (HUVEC) elde edilen hücreler tercih edilir. Anjiyogenezin doğası gereği mikrovasküler hücreler anjiyogenez çalışmalarında in vivo koşullarda daha çok tercih edilir. Fakat bu noktada HUVEC makrovasküler endotel olmasına rağmen kolay elde edilebilmesi ve aynı zamanda mikrovasküler endotel hücresi özellikleri de göstermesinden dolayı anjiyogenez çalışmalarında mikrovasküler hücreler yerine sıklıkla tercih edilir (115).

4.8. Preeklampsi

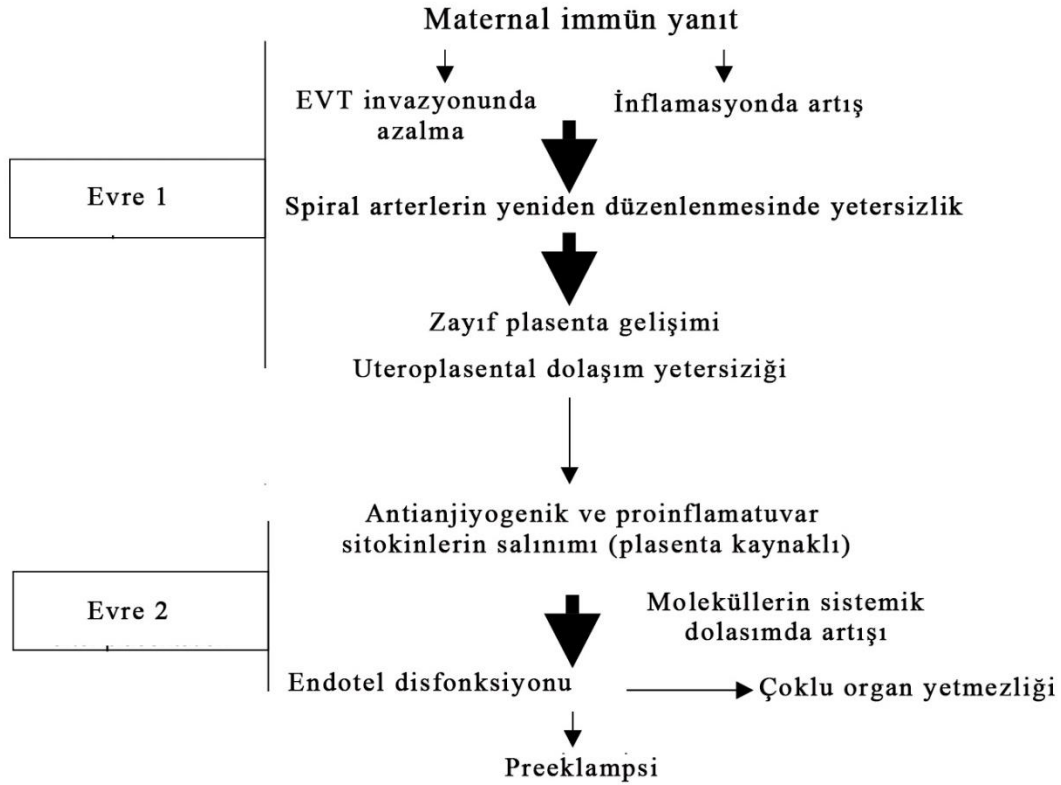
4.8.1. Tanımı ve Yaygınlığı

International Society for the Study Hypertension in Pregnancy (ISSHP)'nin 2021 kılavuzuna göre preeklampsi, gebeliğin 20. haftasından sonra proteinürinin eşlik ettiği ($>+2$ dipstick yöntemiyle, $>0,3$ g/gün 24 saatlik idrarda protein ölçüm yöntemiyle) veya etmediği, hipertansiyon (>140 mmHg sistolik, >90 mmHg diastolik) ile seyreden klinik bir durumdur (116). Pek çok sistem üzerinde etkilidir (117, 118). Anne ve fetus üzerinde ölümcül antenatal ve postnatal sonuçlar oluşturur. Doğum sonrası fetus ve anne üzerinde kalp damar hastalıkları açısından risk gelişir. Yaygınlığı %2-8 arasında değişir (119-121). Özellikle gebelik takibinin iyi yapılamadığı sosyoekonomik düzeyi düşük ülkelerde yaygınlığı %10'a kadar çıkar. Uluslararası yaygınlığı son kaynaklara göre %4,6'dır (122). Her yıl preeklampsiden ortalama 46.000 anne ölümü, 500.000 perinatal ölüm gerçekleşir (123). Gebeliğe bağlı ölümlerin arasında üçüncü sırada yer alır (118).

4.8.2. Preeklampsi Patofizyolojisi

Preeklampsi gelişiminde, anormal plasenta oluşumu, anormal spiral arter yeniden şekillenmesi, plasenta yetersizliği, endotel işlev bozukluğu, immün dengenin bozulması yer alır (87). Gebeliğin ilk yarısında spiral arterler fetus kaynaklı iki farklı trofoblast tarafından kuşatılır ve bu durum spiral arterlerde gebelikle ilişkili kan akımı olan “uteroplasental dolaşım” gelişiminde etkin rol oynar. Bu trofoblastlar endovasküler ve intertisyel trofoblastlardır. İlk grup trofoblast spiral arter boşluğunun içini kaplarken, ikinci grup bunun çevresini sarar. İkinci grubun temel amacı endovasküler trofoblastların invazyonu sırasında gereken desidua yatağının oluşturulması için myometriyumun invazyonudur. Spiral arterler bu süreç sonunda tonus kaybeder ve daha yüksek akım oluşturacak şekilde genişler. Preeklampside bu yeniden şekillenme süreci gerçekleşemez ya da yeterli düzeyde gerçekleşmez. Bunun sonucu olarak gerekli kan akımı sağlanamaz ve hipoksi meydana gelir. Bu da plasentada iskemi yaratır. Oluşan hipoksiye ikincil olarak anjiyogenik denge bozulur. Oluşan antianjiyogenik moleküller sFlt-1 (çözünebilir vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü) ve çözünebilir endoglin (sENG) trofoblastlar tarafından kan dolaşımına verilir. Bu moleküller var olan VEGF-A, PlGF, TGF β 1 gibi proanjiyogenik faktörlere bağlanarak bunların etkisini baskılar (118). Bu durum maternal endotelde işlev bozukluğuna neden olur. Eş zamanlı endometriyumdaki immün dengenin de bozulması sürecin gelişiminde etkilidir.

Gelişen hipoksi plasentada stres yaratır ve serbest oksijen radikali oluşumuna neden olarak patogeneze katkıda bulunur (124). **Şekil 12’de** preeklampsi patogenezi özetlenmiştir.



Şekil 12. Preeklampsi patofizyolojisi.

Preeklampsi patogenezinde iki aşamalı teori kabul görür. Birinci aşamada, ekstrasvillöz trofoblastların (74) invazyonunda yetersizlik ve zigota yönelik bozulmuş immün tolerans gelişimi izlenir. Bu da plasenta gelişiminde ve plasenta dolaşımında yetersizlikle sonuçlanır. İkinci aşamada, yetersiz dolaşıma ikincil anormal gelişen plasentadan antianjiyogenik ve proinflamatuvar sitokinler üretilerek kana verilir ve endotel disfonksiyonu gelişir. Endotel disfonksiyonu çoklu organ yetmezliğine ve preeklampsi gelişimine neden olur (125). EVT: Ekstrasvillöz trofoblast

4.8.3. VEGFR-2 ve Preeklampsi

VEGFR-2, plasentada ve fetüste damar oluşumunda etkilidir (126). Etkisini endotel hücrelerinde mitotik aktiviteyi artırarak ve hücrelerin çoğalmasını sağlayarak gösterir (127). VEGFR-2 ek olarak endotel geçirgenliğini artırır, damar dışına sızıntı süreçlerinden de sorumlu

tutulur. Bu etkilerini PLC/PKC/MAPK ve PI3K/AKT yolları üzerinden gerçekleştirir (124). VEGFR-2'nin bu etkisi preeklampsinin gelişiminde, semptomların oluşumunda ve hastalığın tanısında önemli yer tutar. Ayrıca bu özelliklerinden preeklampsiye yaklaşımda da faydalanılır. Preeklampsi hastalarında bu molekülün hedefi olarak bilinen ve bakılan bölgeler arasında trofoblastlar, plasenta koryon villusları, damar endotel bölgeleri, maternal serum sayılabilir. Ayrıca hedef bölgeler olan beyin, böbrek üzerine de bazı çalışmalarda odaklanılmıştır. Trofoblastlarda çalışılan noktalardan biri yayılma kapasiteleridir. Bu noktada hücre dışı matris elemanlarının preeklampsi olgularındaki değişiklikleri (dekorin) üzerine çalışılır (128). Bir diğer önemli çalışma noktası trofoblastlardan salgılanan özel moleküllerin organlarda yarattığı hasar ve moleküllerin miktarı ve türüyle ilgili açıklayıcı yaklaşımlardır. Burada preeklampsi ön tanısı için ve hastalığın takibi için işaret bir molekül tanımlama üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalarda en çok öne çıkan molekül sFlt-1 olarak bilinen çözünebilir VEGFR-1 reseptör antagonistidir. Preeklampitik gebelerin kan plazmalarında yüksek seviyede bulunur ve hastalığın tanı ve takibi için önemlidir. Ayrıca bu olguların klinik semptomlarından sorumlu tutulur. Bu molekülün varlığıyla eş zamanlı olarak kandaki VEGFR-2 seviyelerinin azaldığı da izlenmiştir. Preeklampside kan beyin bariyeriyle ilişkili birçok in vitro çalışma tasarlanarak kan beyin bariyerinin üzerindeki VEGFR-2 etkisi test edilmiştir (129). Farklı bir odak noktası olan endotel yüzeyinde ise farklı yönlü çalışmalar bulunur. Preeklampsi olgularında VEGFR-2 damar endotelinde azalır.

Plasentanın önemli bir parçası olan göbek kordonunda ise bu konuda yapılan çalışmalarda yine benzer noktalar üzerinde durulmuştur. Kordona ait endotel hücreleri ve damar duvarları daha çok inceleme alanı olarak görülür. Burada da yapılan bir çalışmada Almasry ve arkadaşları preeklampitik olgularda VEGFR-2 miktarının endotelde azalmış olduğu, kaslarda ise ifadesinin olmadığı yönünde bir bulgu gözlemlemişlerdir. Wharton jölesinde ise bu molekülün ifadesinde azalma görülmüştür (102).

4.8.4. Preeklampsinin Sınıflandırılması

Ness ve Roberts 1996’da yaptıkları çalışmada preeklampsinin heterojen bir doğası olduğunu ortaya koymuş, preeklampsiyi birbirinden farklı iki gruba ayırmıştır (130). İlk grup “plasental preeklampsi” ve ikinci grup “maternal preeklampsi” dir. Bir diğer ayrımı ise preeklampsinin başlangıç zamanı temel alınarak yapılmıştır. Bunda ise 24-34 hafta arasında gelişen “erken başlangıçlı”, 34. haftadan sonra başlayan “geç başlangıçlı” preeklampsi olarak adlandırılır. Bu iki grup arasındaki zaman farklılığı aslında temelde patofizyolojideki farklılığı ifade eder. Erken başlangıçlı olanda daha çok plasenta hipoksisi etkili iken, geç dönemde daha çok normal gelişim göstermiş olan plasentanın artan ihtiyaçları karşılamadaki yetersizliği ve buna bağlı maternal endotelde yarattığı işlev bozukluğu ön plana çıkmaktadır (131). Daha sonraki yayınlarda plasental preeklampsi “tip 1”; maternal preeklampsi ise “tip 2” preeklampsi olarak adlandırılır. Hastalığın bu iki alt türü yalnızca patofizyoloji açısından değil aynı zamanda yaygınlık açısından da farklıdır. Özellikle maternal preeklampsi, plasental preeklampsiye göre hem hafif seyreder, hem de daha yaygındır. Öte yandan plasental preeklampsi yaygınlık açısından azdır, hem de şiddetli bir kliniğe sahip olduğu için doğum sonrası sorunlar daha sık görülür. Ayrıca preeklampsi olgularında var olan klinik durumun şiddeti dikkate alınarak, hafif ve şiddetli preeklampsi olarak iki farklı tür daha göze çarpar (132). Bu son grup sınıflandırmada temel alınan klinik iken ilk sınıflandırmada patofizyoloji daha çok ön plana çıkar. **Tablo 7’**de preeklampsinin gelişim zamanı dikkate alınarak bir sınıflandırma verilmiştir.

Tablo 7. Preeklampsi sınıflandırması (130).

Sınıflandırma	Preeklampsi	Tanımlama
Gelişim zamanı	GH < 34 hafta	Erken başlangıçlı preeklampsi
	GH ≥ 34 hafta	Geç başlangıçlı preeklampsi
	GH < 37 hafta	Preterm preeklampsi
	GH ≥ 37 hafta	Term preeklampsi
Klinik şiddet	>140 mmHg sistolik; >90 mmHg diastolik	Hafif preeklampsi
	>160 mmHg sistolik; >110 mmHg diastolik	Şiddetli preeklampsi

4.8.5. Preeklampsi ve Anjiyogenez Çalışmaları

Preeklampsi çok yönlü ve birbirinden farklı mekanizmaları bünyesinde barındırır. Hastalığın oluşum sürecinde plasentada değişiklikler meydana gelir. Bunlar anjiyogenez dengesinin bozulması, immünite etkileri gelişimi, genetik yapıdaki değişiklikler olarak üç grupta değerlendirilir. Placenta ise yapısında embriyon ve uterustan parçalar barındıran hibrid bir organdır. Placenta gelişimi döllenmeyle başlayan bir dizi hücreyel olayla şekillenen uzun bir süreçtir. Bu süreç; hücre bölünmesi, hücre göçü, yapışma, apoptoz ve yine kendi içinde basamakları olan anjiyogenezi içerir. Sonuç olarak preeklampsi gelişim sürecinde anjiyogenez etkilenir. Bu nedenle anjiyogenez preeklampsi gelişiminde farklı yönleriyle incelenmiştir.

Preeklampside placenta kan akımını sağlayan damarların yeniden şekillenmesi bozulmuştur ve CD31, VEGFR-1, CD34 gibi damarla ilişkili farklı moleküllerin ifade düzeylerinde azalma izlenmiştir (133). Morfolojik ve immünohistokimyasal çalışmalarda, koryon villuslarında ifade bulan anjiyogenik belirteçlerde de azalma izlenir. Ayrıca villuslarda atrofi gelişir ve apoptotik değişiklikler meydana gelir. Apoptoz ilişkili proteinlerde de artış ve anti-apoptotik moleküllerin ifade düzeylerinde azalma gelişir. Villuslara ait olan damarlarda ifade bulan gelişim belirteçleri olan CD31 ve VE-kaderin seviyelerinde kontrollere göre azalmalar gözlenmiştir (135). Fakat literatürde bu moleküllerde artış gösteren yayınlar da bulunur (134). Hücrelerde anjiyogenez azalır, placenta hipoksisine ikincil gelişen olaylar da preeklampside anjiyogenezin bozulmasının sonucudur. İlk olarak oluşan bu durumda kana verilen antianjiyogenik moleküller endotel üzerinde değişiklikler meydana getirir. Özellikle endotel hücrelerindeki eNOS aktivitesinin azalmasıyla preeklampsi belirtilerinin ortaya çıkmasına yönelik çalışmalar bulunur (135, 136). Bazı çalışmalarda meydana gelen placenta hipoksisinin arkasında, mitokondriyon ilişkili işlev bozukluklarının olduğu görülmüştür (137). Temelde çalışmalar, anne kanında antianjiyogenik moleküllerin artışının nedenleri ve sonuçları üzerine odaklanır. Bu konuda yapılan çalışmalarda sFlt-1 ve sEng isimli iki adet çözünebilir inhibitör molekül bulunur, bu moleküllerin hedefi ise endotel hücrelerindenki VEGF, VEGFR-2 ve TGF β 1 molekülleridir. Bu iki molekül anjiyogenezin başlaması ve devamlılığı açısından önemlidir. Ayrıca anjiyogenezin sadece reseptör düzeyinde değil aynı zamanda ara basamakların da etkilendiğini gösteren çalışmalar bulunur. Bunların bir kısmı da matriks metalloproteinazların anjiyogenezdeki etkileri üzerinedir. Bir grup çalışmada anjiyogenezin inflamasyon aracılı bozulduğuna ilişkin sonuçlar bulunur. Villuslardan alınan

örneklerde yapılan doku kültürlerinde oluşturulan hipoksiyle proinflamatuvar ve anti- anjiyogenik özellikleri olan serumlar elde edilir.

4.8.6. Göbek Kordonu ve Preeklampsi

Göbek kordonu yapısında arterleri ve venleri içeren ve özel bağ doku içeren bir plasenta ekidir. Dolayısıyla yapısındaki dokuları ilgilendiren hastalıklardan etkilenebilir. Özetlersek göbek kordonu damar kökenli hastalıklardan, hibrit bir yapı olmasından dolayı immün olaylardan ve yüksek bağ doku içermesi nedeniyle var olan bağ dokusunu etkileyebilecek iç ve dış faktörlerden etkilenir. Yapının plasenta eki olması ve plasentanın da yüksek damar ağı içermesi nedeniyle öncelikle çalışmalar, var olan hastalıkların göbek kordonunun damarlarını etkilediği düşüncesiyle umbilikal arterler ve venler yönünde yoğunlaşmıştır. Bugün literatürde damar duvarını inceleyen pek çok temel ve klinik çalışma bulunur. Bu hastalıklardan en iyi bilinenlerinden biri preeklampsidir. Preeklampsinin yukarıda aktarılan gelişim süreci dikkate alındığında hastalığın göbek kordonu damarları üzerinde etkisi olması, beklenen bir durumdur. Yapılan pek çok çalışmada arter, ven boşlukları ve duvarları yapısal olarak incelenmiştir. Bu çalışmalarda daha çok ışık mikroskopi teknikleri kullanılmıştır. Bir grup çalışmada ise yapılar, ince yapı düzeyinde incelenmiştir. Endotel üzerindeki değişiklikler üzerine yoğunlaşmıştır. Endotelde polimorfik değişikliklerin arttığı, endotel bütünlüğünün azaldığı, piknozis gibi değişiklikler olduğu izlenir. Ayrıca arter duvarlarında sağlıklı kontrollere göre yapısal olarak kollajen miktarında ve kollajen oranlarında tip I kollajen lehine artış görülmüştür. Ek olarak elastin miktarında preeklampside azalma izlenir. Preeklampside damardaki değişiklikler biyokimyasal olarak da incelenmiştir. Damar duvarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinde azalma gözlenir (138, 139). Preeklampside stroma üzerine yoğunlaşan çalışmalar, literatürde çok bulunmamaktadır. İmmün yöntemlerle yapılan kordon çalışmaları bulunur. Bu çalışmalarda özellikle bazı önemli moleküllerin ifade düzeylerinin göbek kordonu düzeyinde incelenmesi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Özellikle de damarların gelişiminde etkili olan moleküller olan VEGF-A ve onun reseptörleri olan VEGFR-1 ve 2 incelenmiştir. Bu incelemelerde iki farklı yöntemsel bakış dikkat çeker, ilkinde alınan kesitler tek boyutlu incelenmiştir. Yani zamansal olarak var olan değişim üzerinde durulmamıştır. Bir diğer grupta ise zamansal değişiklikler PCR düzeyinde incelenmiştir. Bu çalışmalarda ise preeklampside değil sağlıklı domuzlarda, plasenta ve göbek kordonundan gebeliğin farklı dönemlerinde alınan doku örneklerinde VEGF ve iki reseptörü VEGF-1 ve 2'nin gebelikteki değişimi immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir (140).

4.8.7. Preeklampsi ve iGK-MSH

Preeklampsi ve iGK-MSH ile ilgili yapılan çalışmalar üç grup altında incelenebilir. İlki preeklampsinin hücreler üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmalardır. Bu çalışmalarda preeklampsili olgulardan alınan hücrelerde değişen yapı genetik ve biyokimyasal düzeyde incelenir (141). İkinci grup, hücrelerin preeklampsi üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmalardır. Bu çalışmalar özellikle hayvan modelleri üzerinde yapılır, farklı yollarla hayvan modelleri yaratılır ve alınan hücrelerin modele aktarımı, ekimi yoluyla hücrelerin model üzerinde yarattığı değişiklikler histolojik ve moleküler düzeyde incelenir (142). Bu çalışmalarda ek olarak iGK-MSH ile eşkültür çalışmaları da bulunur. Bazı çalışmalarda iGK-MSH'in preeklampsi üzerinde etkili olacağı düşünülen genleri değiştirilerek çeşitli uygulamalar yapılır (143). Üçüncü grup çalışmalar ise hücrelerden elde edilen hücre dışı veziküllerin preeklampsiden nasıl etkilendiği ve preeklampsiye nasıl etki ettiği şeklindedir. Bu çalışmalar son 10 yılda hücre dışı veziküllere yönelik bilgi birikiminin artmasıyla çoğalmıştır. Burada da iGK-MSH'den elde edilen ekzozomların in vivo ve in vitro yaklaşımlarla preeklampsi üzerindeki etkileri doku düzeyinde, moleküler, biyokimyasal ve klinik açıdan incelenir (144-147).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Grupların Belirlenmesi ve Olguların Seçilmesi

Çalışma için 3 grup belirlendi. Preeklampsinin türü bağımsız değişken olarak alındı. Bağımsız değişken sayısı dikkate alınarak gruplardaki varyansı tek yönlü ölçmek için One Way ANOVA testi yapılmasının gerekliliği anlaşıldı. Etki büyüklüğü orta derecede belirlendi. 0,5 etki büyüklüğü katsayısıyla alfa hata değeri ve anlamlılık değeri 0,05, beta hata değeri 0,2 şeklinde belirlenerek $1-\beta$ değeri 0,8 olarak belirlendi⁵. Bu parametrik değerler ışığında istenilen gücü sağlayan olgu sayısı 67 olarak hesaplandı. Her gruptan 22 olgu, toplamda 66 olguyla deneyin gerçekleştirilmesine karar verildi.

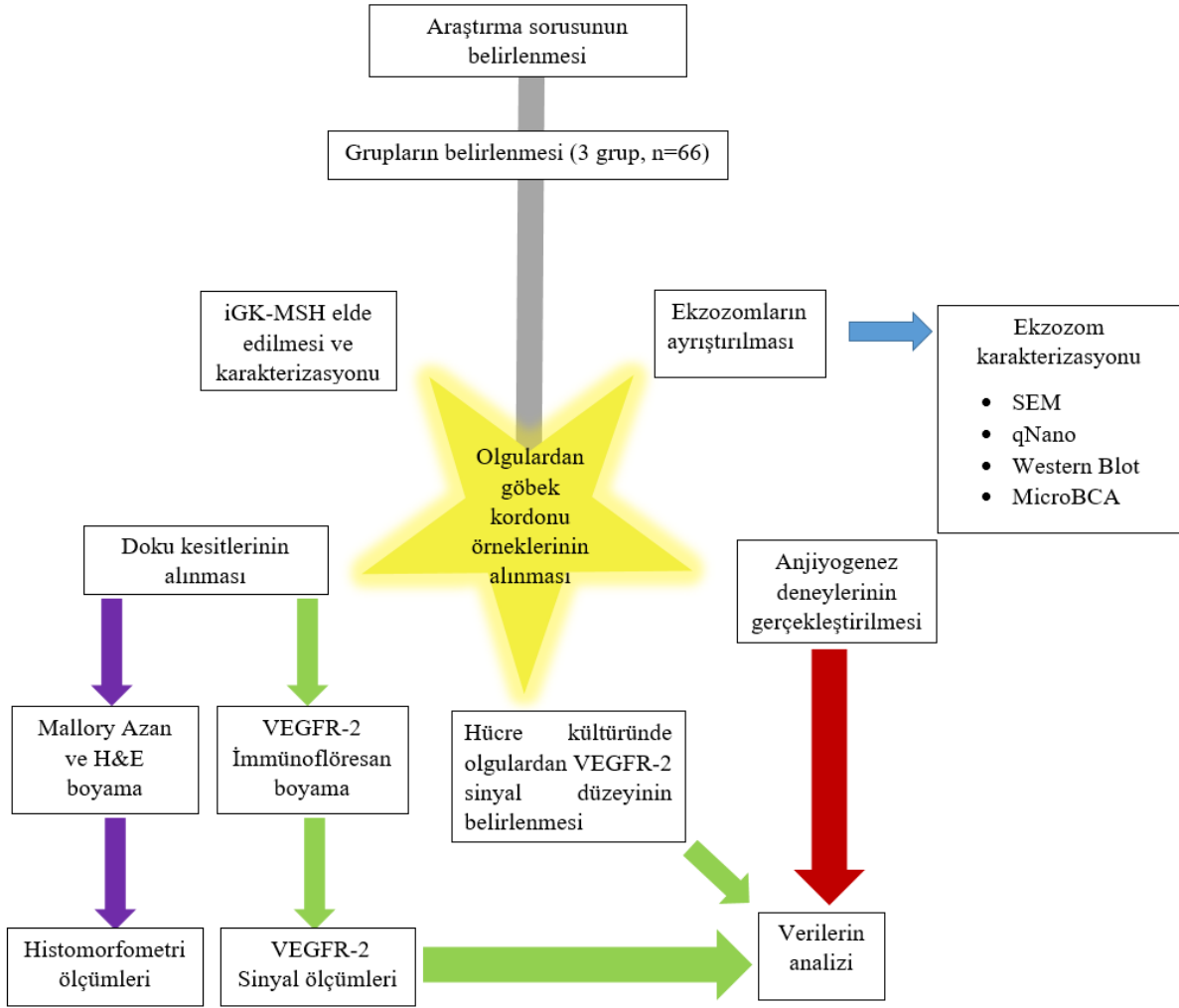
Preeklampsiyle ilişkili literatür taranarak deney grupları oluşturuldu:

1. *Erken preeklampsi (EPE)*: 24-34. gebelik haftaları arasında, ISSHP tanı kriterlerine uygun, dörder saat aralıklarla yapılan iki farklı ölçümde >140 mmHg sistolik ve >90 mmHg diastolik kan basıncı ve idrarında $>+2$ proteinüri (dipstik yöntemiyle) saptanan gebelerden doğan infantların göbek kordonları (n=22).
2. *Geç preeklampsi (GPE)*: >34 . gebelik haftası sonrasında, ISSHP tanı kriterlerine uygun, dörder saat aralıklarla yapılan iki farklı ölçümde >140 mmHg sistolik ve >90 mmHg diastolik kan basıncı ve idrarında $>+2$ proteinüri (dipstik yöntemiyle) saptanan gebelerden doğan infantların göbek kordonları (n=22).
3. *Kontrol*: Gebelikte, normal sistolik ve diastolik kan basıncı değerlerine (<140 mmHg sistolik, <90 mmHg diastolik) sahip olgulardan doğan infantlardan elde edilen göbek kordonları (n=22).

Hastalardan ve 1. derece yakınlarından alınan hikayelerden elde edilen bilgiler kullanılmıştır. Tanı koyulan gebelerde dışlama kriterleri:

⁵ Yapılan çalışmalarda beta hata değeri 0,2'ye kadar alınabilir. Bu da $1-\beta$ değerinin en az 0,8 olarak alınabileceği anlamına gelir.

- Gebelik öncesi bir kronik hastalık hikayesi olması (diabetes mellitus, astım, KOAH, kardiyovasküler sorunlar).
- Gebelik öncesinde hipertansiyon hikayesi olması ve ilaç kullanıyor olmak
- Gebelik öncesinde ve gebelikte ilaç kullanımı olması



Şekil 13. Tez akış şeması.

5.2. Doku Örneklerinin Alınması ve Taşınması

Temmuz 2022 - Ocak 2024 arasında, T.C. Ankara Şehir Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Perinataloji Bilim Dalı, Riskli Gebelikler Bölümü'ne başvuran gebelerin göbek kordonları kullanıldı. Kriterlere uyan 66 gebenin yapılan sezaryen işlemi (C/S) sonrası elde edilen göbek kordonları alındı. Her bir gebenin aydınlatılmış onamı yazılı olarak alındı. Doğumdan sonra, göbek kordonlarından plasentaya yakın bölümünden ortalama 12-15 cm uzunluğunda bir

parça kesildi. Göbek kordonlarının nekrozlu, ödemli, kan bulaşı olan bölgeleri ayrıştırıldı. Ayrıştırılan örnekler, içinde %1 Amfoterisin B (Capricorn Scientific, AMP-B, Almanya) + %1 Penisilin– Streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B, Almanya) içeren 150 mL Leibovitz-15 (L-15) (Capricorn Scientific, L15-XA, Almanya) tamponlu taşıma çözeltisine koyularak +4 °C’de ortalama 12-24 saat saklandı. Alınan dokular buz içerisinde taşınarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı’na getirildi. **Şekil 14** hasta dosyası ve taşıma solüsyonu içindeki kordonu gösterir. Olgular 24 saat içinde işleme alındı. İki olgu, taşıma koşullarındaki gecikmeden dolayı 36 saat içinde işleme alındı. Fakat süreler literatürle uyumludur (148).

A

Kontrol

Tel: _____

AD/SOYAD: _____ Tc: _____

YAŞ: 33 yıl, Kilo: 74 Boy: 162 cm

OBSTETRİK ÖYKÜ: G3 P1 Y1A1 (ESK C/S)

TANIDA GEBELİK HAFTASI: 36

GHT/KR HT/PREEKLAMPSİ/KR. HT ZEMİNİNDE PREEKLAMPSİ: Kontrol

HAFİF PREEKLAMPSİ/ŞİDDETLİ PREEKLAMPSİ: —

ÖNCEKİ GEBELİKTE PREEKLAMPSİ ÖYKÜSÜ: —

EK HASTALIK: —

İLAÇ KULLANIMI: —

USG:

BPD: 35.5 HC: 35.3 AC: 36 FL: 36+2 EFW: 2700 gr.

UMBİLİKAL ARTER S/D: 2.16 PI: 0.8

MCA PI: 1.4 DUCTUS VENOSUS PI: 0.54

UTERİN ARTER PI: SAĞ: 0.64 SOL: 0.72

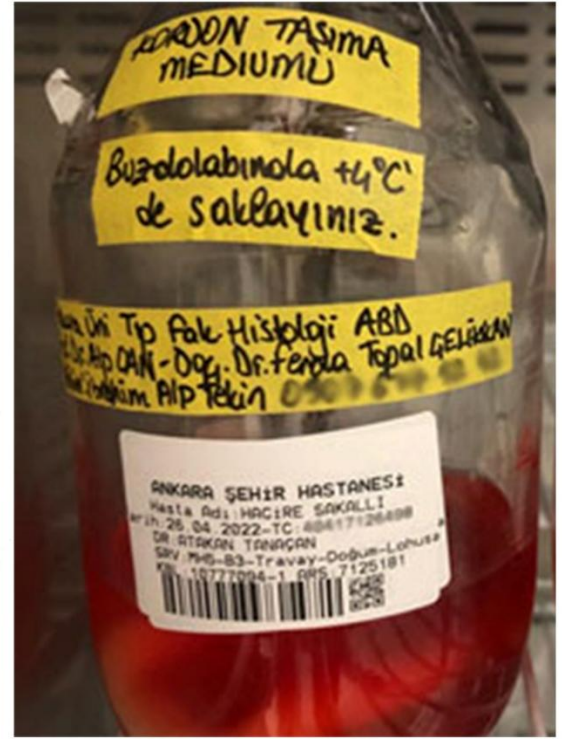
24 SA. İDRARDA PROTEİN: — TİT PROTEİN: — negatif

PLT: 239. AST: 15 ALT: 8 HB: 9.8 HCT: 30.3

DOĞUMDA GEBELİK HAFTASI: 36 DOĞUM KİLOSU: 2610 gr-

APGAR 1/5 DK: 6/8 DOĞUM ŞEKLİ: C/S

B

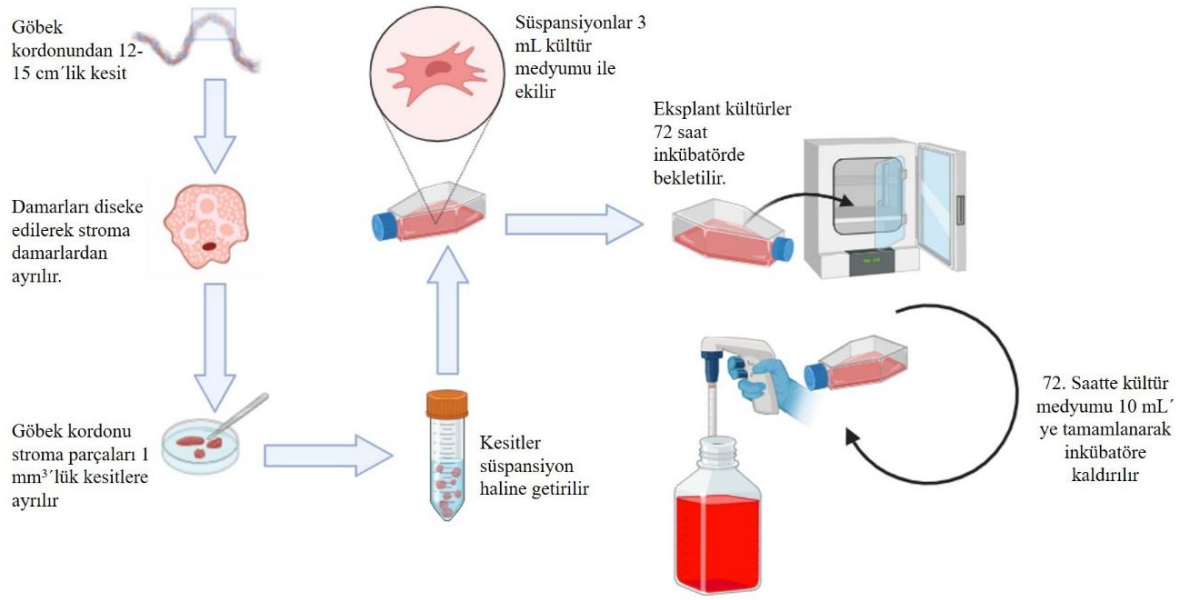


Şekil 14. Hasta dosyası ve L-15 taşıma çözeltisi içerisindeki göbek kordonu örneği.

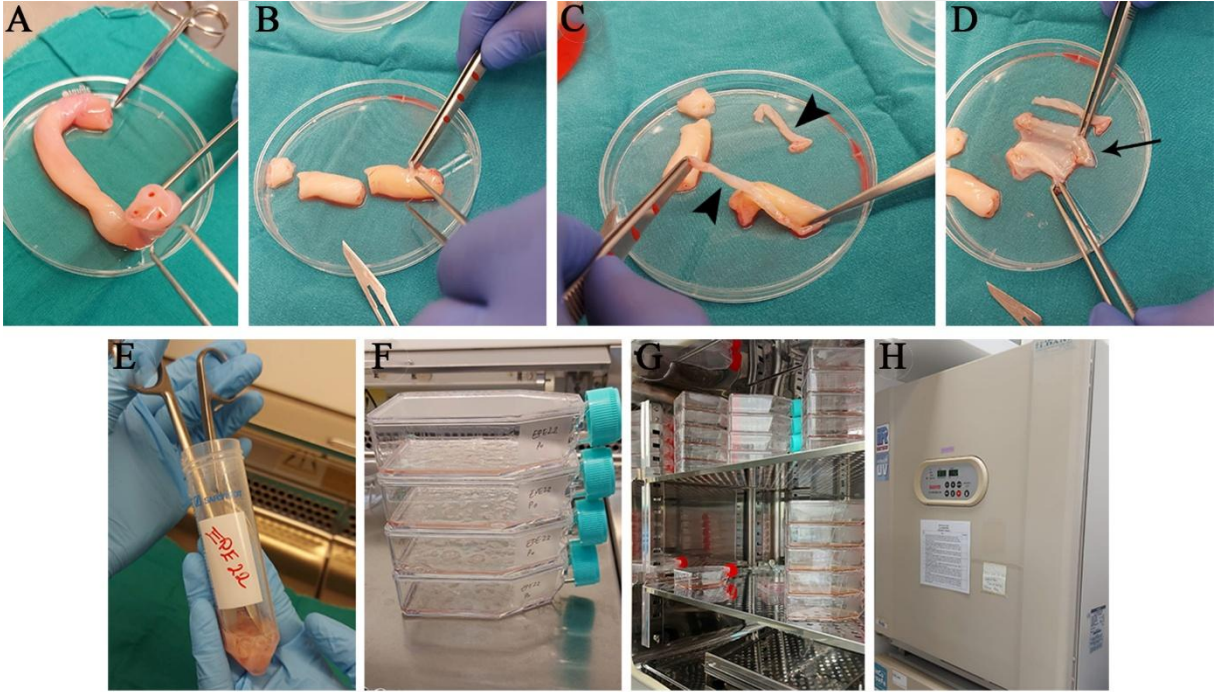
A: Olguların toplanması sürecinde hastadan alınan klinik bilgiler. **B:** L-15 taşıma çözeltisinin içinde alınan kontrol olgusuna ait bir göbek kordonu örneği.

5.3. iGK-MSH Eksplant Kültürünün Oluşturulması ve Kültür Süreci

Tüm hücre kültürü işlemleri öncesinde, laminar kabin (Thermo Electron Corporation, Holten LaminAir, ABD) 15 dk UV sterilizasyon işlemine alındı. Su banyosu (Memmert, D91126, Almanya) ve hava temizleyici (Sanyo, ABC VW24A, Japonya) hazırlandı. Dokular daha önce hazırlanan steril cerrahi set (iki adet dişli penset, bir adet 20 numara uçlu bistüri, bir adet cerrahi yeşil örtü, bir adet plastik petri kabı) kullanılarak ayrıştırıldı. Doku, taşıma çözeltisinden (L-15) çıkarılarak, petri kabına yerleştirildi; nekrotik doku, şiş, kıvrık ve ölü bölgeler tekrar kontrol edilerek işleme geçildi. Çıkarılan dokulardan 1 cm kalınlığında iki kesit alındı. Kalan doku beşer cm'lik parçalara ayrıldı. Steril bistüriyle arterler arasındaki bölgeye ince bir kesi atıldı ve bu bölgeden dişli pensetler yardımıyla stroma ayrıldı. Açılan dokuda damarlar stromadan çıkarıldı. Kalan stroma, 5 mL DMEM Ham's F12 (Biological Industries, BI01-170-1A, İsrail) (%1 AMP + %1 PS + %1 L-glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B, Almanya) + %20 FBS (Gibco, 10082847, ABD) içeren) içerisinde, steril makas yardımıyla 50 mL konik santrifüj tüplerinde 1 mm'lik parçalar olacak şekilde mekanik olarak parçalandı ve 200g'de 10 dk santrifüj edildi (Hettich, D78532, Almanya). Santrifüj sonrası çökelti üzerinde kalan bölüm atıldı ve kalan çökelti flask başına 3 mL %20 FBS içeren DMEM Ham's F12 ile tamamlandı. Resüspansiyon sonrası 3 mL süspansiyon 75 cm²'lik flasklara (Sarstedt, Cat No:83.3912.001) ekildi. Ekilen örnekler, 37 °C %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılarak 48-72 saat yapışması için beklendi. Süre sonunda flasklara 6 mL daha DMEM Ham's F12 eklenerek dokular inkübatörde çoğalmaya bırakıldı. **Şekil 15**'te eksplant kültür işlemleri **Şekil 16**'da laboratuvarımızda yaptığımız eksplant kültürünün fotoğrafları verilmiştir.



Şekil 15. Göbek kordonu stromasından MSH ayrıştırma işlemleri.



Şekil 16. Eksplant kültür oluşturulan iGK-MSH ve hücre kültürü süreci

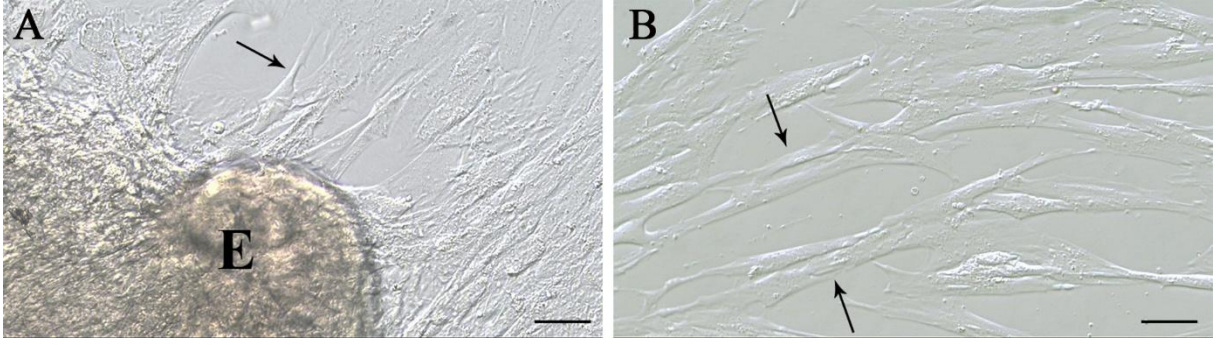
A. Göbek kordonunun iki arter bir ven yapısının kontrol edilmesi. **B, C.** Göbek kordonundan ven ve arterlerin diseke edilmesi. Ok: göbek kordonu stroması, ok başı: arter. **D.** Stromanın ortaya çıkarılması. **E.** Wharton jölesinin ~1 mm³ büyüklüğünde parçalara ayrılması. **F.** Ayrıştırılan doku

parçalarının ekildiği kültür flaskları. **G.** İnkübatörde izlenen flasklar. **H.** %21 O₂ koşulları sağlanan CO₂ gazlı inkübatör.

5.4. Pasajlama İşlemleri

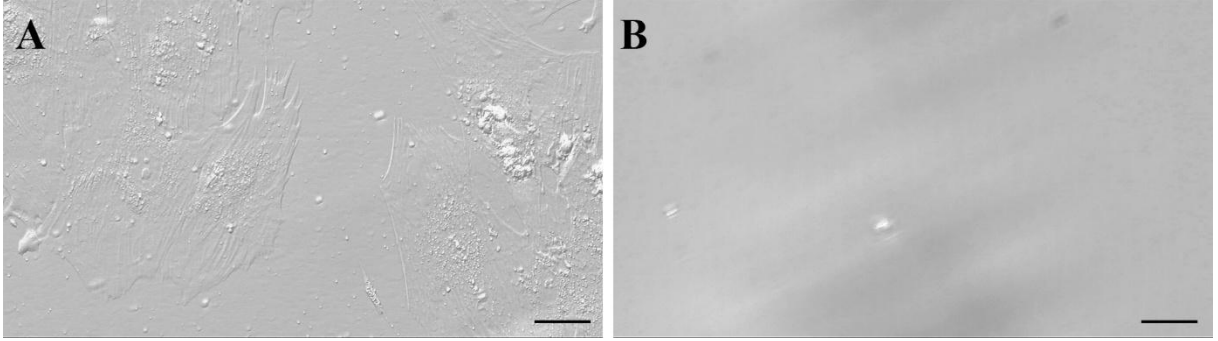
Doku kültürlerinin ilk kontrolü, 10. günde ters mikroskop (Olympus IM 71) altında yapıldı. Kültürün yapısal özellikleri kaydedildi. Sonrasında sırasıyla üç günde bir kez kültür kontrolü yapıldı. İzlemler sırasında hücrelerin kültür ortamı değiştirildi. Kültür ortamı çekildikten sonra taze DMEM Ham's F12 (%1 AMP+%1 PS+%1 L-glutamin+%20 FBS içeren) eklendi. Hücreler %80-90 yaygınlığa ulaştığında pasajlandı. Pasajlama öncesi hücreler Ca⁺² ve Mg⁺² içeren Dulbecco PBS (D-PBS) (Capricorn Scientific, PBS-2A, Almanya) ile yıkanarak tortu, yapışmayan parçalar ve metabolik artıklardan arındırıldı⁶. Her bir flaska 3-4 mL tripsin-EDTA (Capricorn Scientific, TRY-3B, Almanya) konularak 6-8 dk inkübatörde bekletildi. Süre sonunda hücreler kaldırılarak, ters mikroskopta 5x büyütme altında incelendi. Hücrelerin kalktığından emin olunduktan sonra - yapışan, hareket etmeyen hücreler yoksa- kullanılan tripsin-EDTA miktarının yaklaşık iki katı kadar (6-8 mL) %10 FBS içeren DMEM'le tripsin aktivitesi inhibe edildi. Kaldırma işlemi sonrası hücreler 50 mL'lik konik santrifüj tüplerinde (Corning, CLS430829, USA) toplandı. Toplanan süspansiyon 200g'de 10 dk çevrildi. Santrifüj sonrasında çökelti üzerinde kalan bölüm atıldı ve çökelti tekrar her flask için 5 mL DMEM Ham's F12 ile resüspande edildi. Ardından 75 cm²'lik flasklara ekildi, homojen dağılım sonrası 5 mL daha çözelti eklenerek inkübatöre kaldırıldı. Hücrelerin doku kültürlerinden ilk tomurcuklandıkları ve pasajlama sırasındaki görüntüleri **Şekil 17** ve **Şekil 18**'de verilmiştir.

⁶Eğer PBS kullanılıyorsa dikkat etmek gerekir. PBS Ca⁺² ve Mg⁺² içermediği için hücresel bağlantılar zayıflayabilir ve bu durum hücre kaybına neden olabilir.



Şekil 17. Eksplant kültürü.

Hücrelerin doku parçalarından tomurcuklanmasını gösteren 10. gün mikrografları. Ölçüm çubuğu: 10 µm. E: Eksplant, Ok: iGK-MSH



Şekil 18. Tripsinizasyon işlemi.

A: Tripsinizasyon öncesi hücre kültüründe yaygınlık. **B:** Tripsinizasyon sonrasında kültür flaskları. Ölçüm çubuğu:10 µm.

5.5. Dondurma İşlemleri

Pasaj 1 (P₁) hücreler 5. gün kontrol edildi. Çözelti rengi değişmiş ve metabolik artıkları artmış hücrelerin kültür ortamları değiştirildi; ardından hücreler tekrar 7-10. günler arasında kontrol edildi. Hücreler %80-90 yaygınlığa ulaştığında dondurma işlemleri uygulandı. Bu işlemlerde, kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler D-PBS ile yıkanıp, 3 mL tripsin-EDTA eklenerek 6-8 dk 37 °C’de inkübatörde bekletildi. Hücreler kalktıktan sonra üzerine DMEM Ham’s F12 (%1 AMP + %1 PS + %1 L-glutamin + %10 FBS içeren) kültür ortamı eklenerek enzim aktivitesi inhibe edildi. İnhibisyon sonunda hücre süspansiyonu 50 mL konik santrifüj tüplerine konarak 200g’de 10 dk santrifüj edildi. İşlem sonrası ViCell® hücre sayım cihazında (Beckman

Coulter, SGL 383080, ABD) canlılık oranı ve hücre sayısı belirlendi. Ardından hücreler 1,8 mL'lik dondurma tüplerine (kriyoviallere) alındı. Dondurma işleminde 1620 μ L DMEM Ham'S F12 içine 160 μ L dimetilsulfoksit (DMSO) (Sigma, D4540, Almanya) damla damla eklendi. Dondurma tüpleri kademeli soğutma işlemi için Mr. Frosty® (Nalgene, 5100-0036) içinde 48-72 saat -80 °C'de bekletildi. Sonrasında -196 °C sıvı azot tankına ekzozom ayırıştırma deneylerine kadar bekletilmek üzere kaldırıldı (Şekil 19).



Şekil 19. Mr. Frosty® ve azot tankı depolama sistemi.

5.6. Hücrelerin Tanımlanması

Dondurulmuş hücreler azot tankından (-196 °C'den) çıkarıldı, 37 °C'de su banyosunda 90 sn⁷ boyunca çözdürüldü ve 10 mL DMEM Ham's F12 (%1 AMP+%1 PS+%1 L-glutamin+%10 FBS içeren) kültür ortamına damla damla eklendi. DMSO'yu uzaklaştırmak amacıyla hücre süspansiyonu, 200g'de 10 dk santrifüj edildi. Çökelti, DMEM Ham's F12 (%1 AMP+%1 PS+%1 L-glutamin+%10 FBS içeren) ile kültüre edildi (P₂). Hücreler pasajlanarak P₃'e ulaştığında kaldırıldı, sayıldı ve akım sitometreyle tanımlamasını yapmak amacıyla hazırlandı. Kaldırma

⁷ 90 sn literatürde önerilen süredir, fakat koyulan DMSO ve kültür medyumunun oranına göre ayrıca dondurulan süspansiyon büyüklüğüne, ortam sıcaklığı ve su banyosunun sıcaklığına göre süreler 3 dk'ya kadar uzayabilir.

sonrası 1×10^6 hücre alındı ve bu hücrelerin pozitif yüzey belirteçleri olan anti-CD73, anti-CD90 ve anti-CD105 ile negatif yüzey belirteçleri olan anti-CD34, anti-CD11b, anti-CD19, anti-CD45, anti-HLA-DR antikorlarıyla (insan mezenkimal stromal hücre analiz kiti, BD; 562245) işaretleme yapıldı. 200 μ L PBS içinde resüspande edilen hücrelerin üzerine 20 μ L antikor süspansiyonu eklendi ve 20 dk buz üzerinde bekletildi. Bekletme sonrası 200g'de 10 dakika santrifüj edilerek çökelti üzerindeki bölüm atıldıktan sonra, çökelti üzerine 100 μ L PBS eklenip resüspande edilerek akım sitometre cihazında (BD C6 Accuri, ABD) okutuldu (**Şekil 20**) ve belirteçlerin ifadesi gösterildi.



Şekil 20. Hücre sayım ve akım sitometri cihazı.

5.7. Ekzozom Ayrıştırma İşlemleri

Her bir gruptan altışar hücre, P₄ veya P₅'te kültüre edildi (n=6). Kültür ortamı toplanarak ekzozomlar kademeli olarak sırasıyla ultrasantrifüjle (Beckman Coulter XPN-100, ABD) (**Şekil 21A**) ayrıştırıldı. Her grup hücrede tanımlama ve anjiyogenez deneyleri için %80-90 yaygınlıkta 4 adet 175 cm² flaskla çalışıldı. Tüm ekzozom ayrıştırma deneylerimiz öncesinde ekzozom içermeyen (exosome-free FBS, 18 saat 100.000g'de santrifüj edilerek elde edildi) FBS kullanıldı, hücreler 48 saat boyunca 37 °C'de DMEM Ham's F12 (%1 AMP + %1 PS + %1 L-glutamin + %10 ekzozom free FBS içeren) kültür ortamı içinde bekletildi. 4 adet 175 cm²'lik flasktan 80 mL kültür ortamı toplandı, üzerine 25 mL D-PBS konularak 105 mL'ye tamamlandı⁸. Toplanan kültür ortamı, 4 adet steril ultrasantrifüj tüpüne 35'er mL (344058, Beckman Coulter, ABD) olacak şekilde aktarıldı. Ultrasantrifüj cihazında SW32Ti rotor içinde 2.000g'de +4 °C'de 30 dk ve

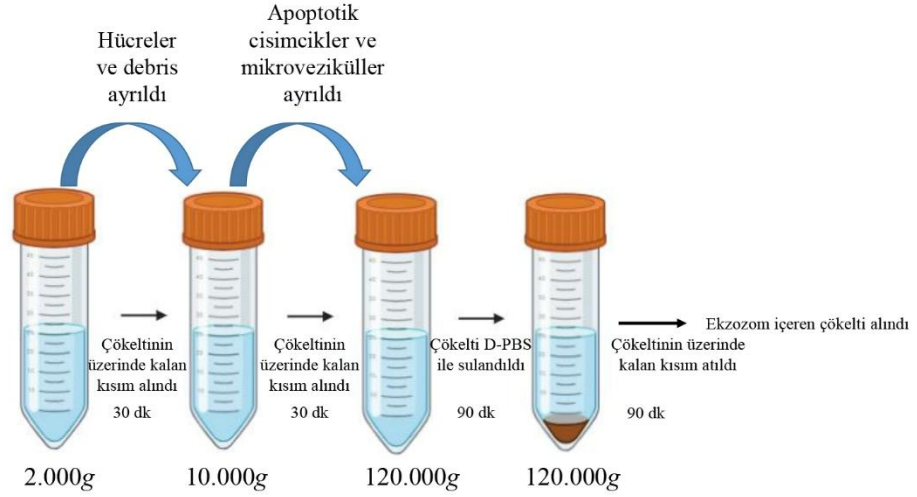
⁸ Ultrasantrifüj tüplerinin herbiri 35 mL sıvı aldığından dolayı ve tamamının aynı yükseklikte olmasına dikkat edilmesi gerekçesiyle bu seyreltme işlemi gerçekleştirildi.

10.000g'de +4 °C'de 30 dk çevrilerek her defasında çökelti üzerinde kalan bölümleri toplandı. Daha sonra 120.000g'de 90 dk +4 °C'de çevrilerek dipte kalan ve ekzozom içeren çökelti üzerine PBS konularak resüspande edildi. Son aşamada elde edilen süspansiyon beşer mL ultrasantrifüj tüplerine (344057, Beckman Coulter, ABD) aktarılarak SW55Ti rotor içinde 120.000g'de 90 dk +4 °C'de tekrar çevrilerek ekzozom içeren tüplerdeki çökelti üzerinde tanımlama ve miktar ölçümü deneylerine başlandı (**Şekil 21B, 21C**). Tüp oluşum deneylerinde daha sonra kullanılacak olan ekzozom çökeltileri PBS ile sulandırıldı ve %10 DMSO ile -80 °C'de saklandı. Protein miktar ölçümü ve Western Blot deneylerinde kullanılacak ekzozom çökeltileri ise PMSF proteaz inhibitörü (Abcam, ab141032, İngiltere) içeren 1x RIPA lizis tamponu (Cell Signaling Technology, 9806S, ABD) içinde -80 °C'de saklandı. Ultrasantrifüjleme basamakları **Şekil 22**'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 21. Ultrasantrifüj cihazı ve malzemeleri.

A. Beckman Coulter XPN-100 yer tipi soğutmalı ultrasantrifüj cihazı **B.** SW32Ti ve SW55Ti rotorlar. **C.** Rotorlarla uyumlu godeler ve tüpler. En solda 35 mL ve en sağda 5 mL'lik tüpler



Şekil 22. Ekzozomların ayrıştırılmasında kullanılan diferansiyel ultrasantrifüj aşamaları.

5.8. Ekzozomların Tanımlanması

Ekzozom görüntülenmesinde taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Zeiss 438 VP), yüzey belirteçlerinin gösterilmesine (CD9 ve CD63) yönelik Western Blot, boyut ve sayılarının belirlenmesinde ayarlanabilir dirençli darbe algılama sistemi (qNano®), ekzozom içeriğindeki protein miktarının belirlenmesinde MikroBCA analizleri kullanıldı.

5.8.1. Ekzozomların Boyut ve Sayılarının Belirlenmesi

Elde edilen ekzozomların boyut ve yoğunluk çalışması ayarlanabilir dirençli darbe algılama sistemi kullanılarak yapıldı. Bu yöntem qNano Exoid® (Izon Biosciences) isimli cihaz ve Exoid Control Suite yazılımı kullanılarak uygulandı. Ultrasantrifüj işlemiyle elde edilen ekzozom çökeltisi PBS ile resüspand edildi. Çalışma sırasında üretici firma tarafından ekzozom çalışmalarında tavsiye edilen NP150 isimli nanopor kullanıldı. Sistem hazır hale getirildikten sonra alt haznesine ekzozomların resüspand edilmesinde kullanılan PBS tamponu konulduktan sonra üst hazneye ters pipetleme tekniğiyle 40 µL ekzozom süspansiyonu eklendi. Okuma işlemi 47 mm'lik nanopor gerginliği, 700 mBar basınç ve 0,47 mV voltaj kullanılarak gerçekleştirildi ve 500 adet parçacık sayılana kadar devam edildi. Okuma işlemi sırasında elde edilen değerler boyut için; nA bozulma ve yoğunluk için; dakikadaki parçacık adedi olacağı için gerçek boyut ve yoğunluk değerlerine üretici firma tarafından önerilen CPC100 isimli ayarlama (kalibrasyon) boncuklarının aynı cihaz

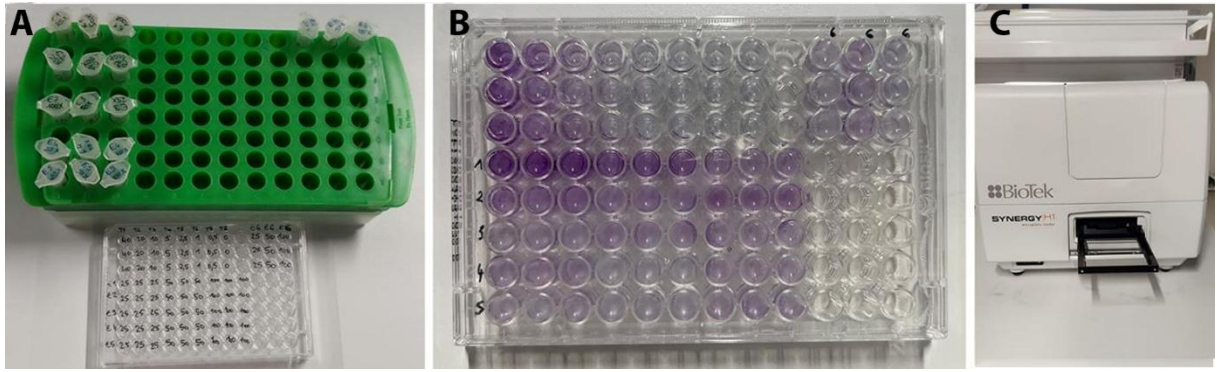
ayarlarında okunmasıyla ulaşıldı. Elde edilen sonuçlar Izon Data Suite yazılımı kullanılarak analiz edildi.

5.8.2. Ekzozomların SEM ile Gösterilmesi

SEM’de ekzozomların görüntülenmesi için %2,5 glutaraldehitte fikse edilen ekzozomlar 1,2 cm çapında yuvarlak cam lameller üzerine yayılarak desikatörde kurutuldu ve 6-7 nm kalınlığında altın palladyumla kaplanarak ZEISS LEO 438VP ve ZEISS Merlin® FE-taramalı elektron mikroskoplarıyla (SEM-field emission gun) incelenerek görüntülendi.

5.8.3. Ekzozomların Protein Miktarlarının MicroBCA Yöntemi ile Ölçülmesi

BCA protein kitiyle (Abcam, ab207002, İngiltere) ekzozom örneklerindeki toplam protein içeriği belirlendi. Kit içeriğinde bulunan Bovine Serum Albumin 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0 µg/mL olacak şekilde PBS ile sulandırılarak protein standartları oluşturuldu. -80 °C’de RIPA lizis tamponu içinde saklanan üç farklı gruba ait (Kontrol, EPE, GPE) ekzozom örnekleri ayrı ayrı üç farklı seyreltme oranında çalışıldı (**Şekil 23A**). Her bir BSA standardı ve protein örneğinden 150 µL 96 kuyucuklu plakaya kondu. BSA standartlarını ve örneklerini içeren her oluğa 150 µL çalışma çözeltisi eklendi. 30 saniye süreyle karıştırıldı. 96 kuyucuklu plakanın üzeri yapıştırıcıyla (sealer) kapatıldı ve 37 °C’de 2 saat bekletildi (**Şekil 23B**). Bekletme sonrası plaka, sealer üzerinde sıvı kalmaması için 5 saniye hafifçe sallandı. Mikroplaka okuyucusunun (BioTek Synergy H1 Microplate Reader, ABD) emilim (absorbans) dalga boyu 562 nm’ye ayarlanıp tüm BSA standartları ve örneklerin emilimi (OD562) kaydedildi (**Şekil 23C**). Microsoft Excel programıyla x ekseninde protein miktarı değerleri ve y ekseninde optik dansite değerleri olacak şekilde standart eğri çizmek için $y=mx+n$ formülüyle grafik oluşturularak R^2 değeri belirlendi. Bilinmeyen örnekler için bu grafikten elde edilen formülde bu örnekler için elde edilen optik yoğunluk (OD) (y değeri) kullanılarak X değerleri belirlendi ve bu şekilde toplam protein miktar ölçümü yapıldı.



Şekil 23. Protein analizi.

5.8.4. Ekzozomların Yüzey Belirteçlerinin Western Blot İle Gösterilmesi

RIPA lizis tamponu içinde saklanan -80°C 'de ekzozom örneğinden alınan $10\ \mu\text{L}$ 'lik parça protein miktarı ölçümü için kullanıldı. Bunun için MicroBCA[®] analizi yapılarak protein konsantrasyonları belirlendi. Elde edilen miktara göre kaç μL örnek yükleneceğine karar verildi. Jele $20\ \mu\text{L}$ örnek yüklendi ve yürütüldü. Yürümesi tamamlanan jel $15\ \text{dk}$ $1\times$ Towbin transfer tamponuyla çalkalayıcıda muamele edildi. Membran ve jel sandviç yöntemiyle Western Blot transfer aparatına (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, 170-3930, 170-3935, Bio-Rad, ABD) yerleştirildi. Bu işlem için sünger $1\times$ Towbin transfer tamponuyla ıslatıldı. Üzerine bir adet kalın transfer kâğıdı transfer tamponuyla ıslatılıp kondu ve onun üzerine jel kondu. Jel üzerine membran düzgün bir şekilde yerleştirilip sırasıyla transfer tamponuyla ıslatılmış kâğıt ve sünger kondu. Hava kabarcığı kalmaması için silindirik bir malzemeye üstünden bastırıldı. Daha sonra sıkıştırma aygıtına jel tarafı siyah tarafa gelecek şekilde konularak sıkıştırıldı. Transfer aygıtına yine siyah taraf siyah tarafa gelecek şekilde yerleştirildi. Towbin transfer tamponuyla ($1\times$) $100\ \text{V}$ 'de $1\ \text{saat}$ transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer buz üstünde yapıldı, ayrıca tankın içine de buz aküsü konuldu. Proteinlerin taşındığı membran $\%5\ \text{BSA}$ 'lı (w/v) TBST içinde (bloklama tamponu) $1,5\ \text{saat}$ oda sıcaklığında çalkalayıcıda blokladı. Bloklama tamponu dököldü ve zar üç kez onar dakika TBST ile yıkandı. Bloklama tamponunun içinde ilgilenilen proteine özgü primer antikor (CD9 ve CD63) uygun oranda seyreltilerek $12-16\ \text{saat}$ çalkalayıcıda $+4^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalandı. Zar beşer dakika dört kez TBST ile çalkalayıcıda bekletildi. Zar, bloklama tamponu içinde uygun oranda seyreltilerek hazırlanmış sekonder antikorla oda sıcaklığında çalkalayıcıda bir saat bekletildi. Zar, beşer dakika dört kez TBST ile çalkalayıcıda bekletildi. Görüntüleme için "çalışma çözeltisi" içinde membran beş dk oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletildi ve görüntülendi. Çalışma çözeltisi

ışığa duyarlı olduğundan bu işlem karanlıkta gerçekleştirildi. Primer ve sekonder antikorları zardan temizleyip yeni antikor uygulanması için membran iki kez beş dk TBST ile yıkandı. Çalkalayıcılı su banyosunda 50 °C’de 30 dk çalkalandı. Üç kez beşer dk TBST ile yıkandı. Bloklama aşamasından itibaren protokol aynı şekilde housekeeping antikor anti-beta aktin (Cell Signaling Technology, 4970S, A.B.D.) için uygulandı. Her aşamanın sonunda görüntüsü Li-cor (Odyssey Fc Imaging System, Li-Cor Biosciences, ABD) sistemi kullanarak tarandı ve kaydedildi.

5.9. Doku Takibi ve Preparat Hazırlama İşlemleri

5.9.1. Kriyokesit Alma

Kesit alma birkaç aşamada gerçekleştirildi:

1. Blok hazırlama
2. Lam hazırlığı ve saklanması
3. Dokuların kesilmesi ve saklanması

5.9.1.1. Kriyoblok Hazırlama İşlemleri

Alınan örnekler taşıma çözeltisinin (L-15) içinden çıkarıldı. Çıkarılan örneklerden, petri kabının içinde 1 cm kalınlıktaki doku, %3,5’luk paraformaldehit çözeltisinde (Sigma Aldrich, 30525-89-4, ABD) +4 °C’de 24-48 saat bekletildi. Süre sonunda, 1,2 M süktroz çözeltisinin (%0,01 PFA içeren) içine alındı. Dokular, çözeltinin dibine çökene kadar beklendi. Kriyomikrotom (Thermo Shandon Cryotome, 7720227, ABD) -20 °C’ye ayarlanarak soğutuldu, ardından doku 0,5 cm’lik kalınlığa inceltirilerek tam kat olacak şekilde yüzeyi kriyomatriksle (Epredia™, 6769006, ABD) kapatıldı ve 10 dk bekletilerek -20 °C’ye kaldırıldı.

5.9.1.2. Uygun Lam Hazırlanması

Stok poli-L-lizin (%10’luk) çözeltisi (Sigma Aldrich, P8920, ABD) distile su kullanılarak %1’lik olacak şekilde seyreltilti. Çözelti içinde (70-80 mL) etüvde 36 °C’de 10 dk boyunca bekletildi. Kaplanan lamalar, 24-48 saat kurumaya bırakılarak oda sıcaklığında karanlıkta saklandı ve üç ay içinde kullanıldı.

5.9.1.3. Dokuların Kesilmesi ve Saklanması

Kriyomikrotomun sıcaklığı -20 °C'ye ayarlandı. Dokular -20 °C'den çıkarıldı ve kriyomatriksle tutucuya yerleştirildi. Soğuması için 5 dk beklendi. Bu sırada lamaların üzerine alınacak olan dokunun bilgileri yazıldı. Kriyomikrotom 10 µm kalınlığa ayarlandı. Soğuma sonunda doku yerleştirilerek, 10 µm'lik kesitler alındı. Daha önceden hazırlanmış poli-L-lizinle kaplı olan lamaların üzerine alındı. Alınan dokular +4 °C'de saklandı.

5.10. İmmünoflöresan Boyama İşlemleri

5.10.1. Dokuların İmmünoflöresan İşaretlenmesi

Kalınlığı 10 µm olan kriyokesitler, immünoflöresan boyama işlemlerinden geçirildi. Her grup için seçilen örnekler hidrofobik kalemle (Pap-pen®) çevrelenerek %2 normal goat serum içeren antikor bloklama tamponunda +4 °C'de bir saat bekletildi. Sonrasında primer antikor olan anti-VEGFR-2 rabbit IgG (Thermo Scientific, PA5-16487, ABD) 1/50 seyreltme oranıyla uygulandı. Kontrol grubuna PBS eklendi. İlk antikor uygulaması sonrası on altı saat (gece boyu) +4 °C'de nemli ortamda bekletildi. Süre sonunda üç kez PBS (Sigma Aldrich, P4417, ABD) ile yıkandıktan sonra, Fluorescein isothiocyanate (FITC) - goat anti-rabbit sekonder antikorunu uygulaması yapılarak (Abcam, 97171, İngiltere) 1/200 seyreltme oranıyla uygulanarak, iki saat karanlıkta 37 °C'de bekletildi. Süre sonunda PBS ile tekrar yıkanmasının ardından 6 µL Hoechst 1 µg/mL (Molecular Probes, 33258) ve 1:1 PBS/gliserol içeren kapatma medyumunu kullanılarak lamelle kapatıldı ve +4 °C'ye kaldırıldı.

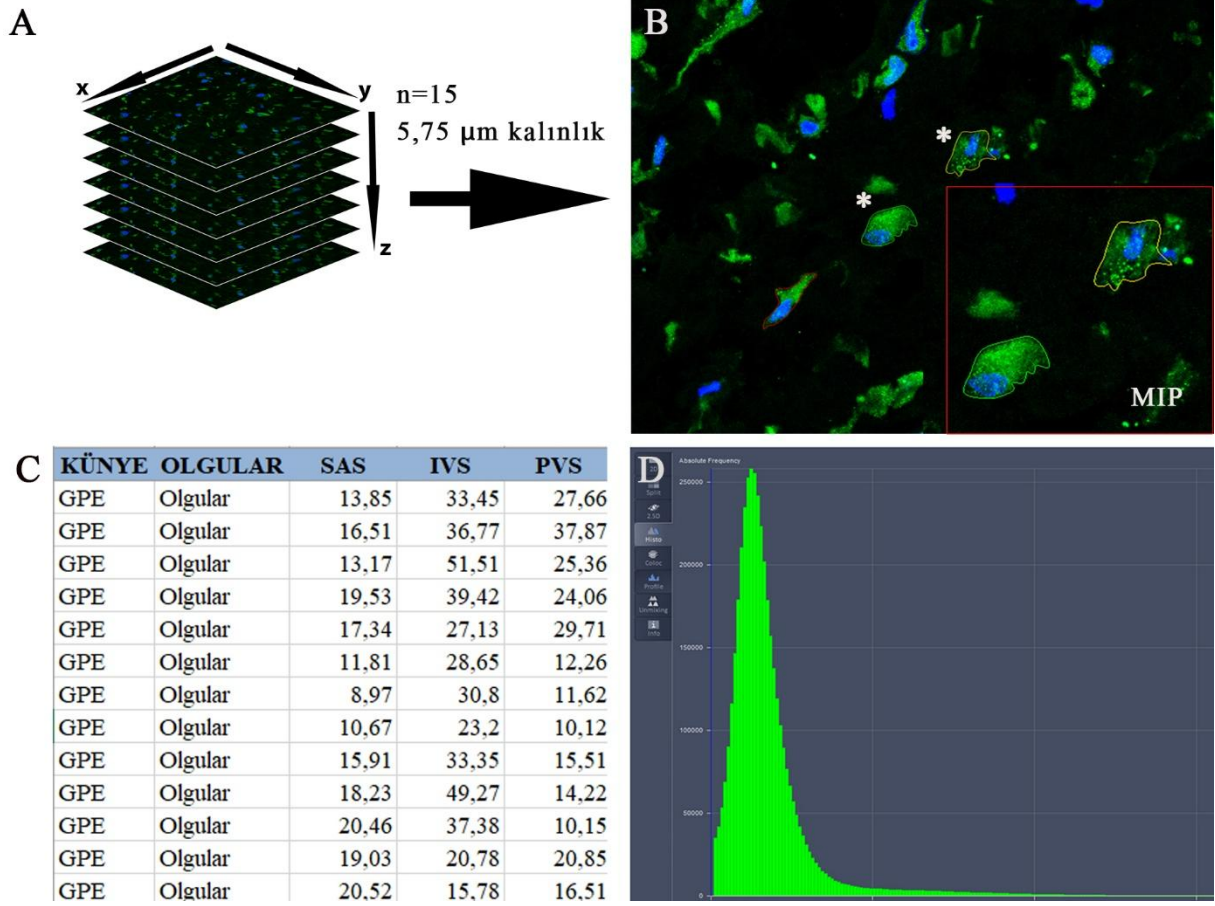
5.10.2. Hücrelerin İmmün İşaretlenmesi

Daha önceden 24 kuyucuklu petri kabı içinde 12 mm yuvarlak lamel üzerine ekilmiş ve tespit edilmiş olan Kontrol, EPE ve GPE gruplarına ait P₄ hücreleri, anti-VEGFR-2 antikoruyla işaretlendi. Yuvarlak lamel twizzer yardımıyla kaldırılarak PBS ile yıkandı. Hücrelerin bulunduğu yüzü, anti-VEGFR-2 primer antikor (1:50 dilüsyonda) damlası üzerine bırakıldı ve 1,5 saat 37 °C'de bekletildi. İnkübasyon sonrası 12 mm yuvarlak lameller PBS ile üçer kez daldırma yöntemiyle yıkandı ve yıkanan 12 mm yuvarlak lamellerin hücre bulunan kısmı FITC goat anti rabbit sekonder antikor (1:200) üzerine bırakıldı ve 1,5 saat 37 °C'de bekletildi. İnkübasyon sonrası

lameller yeniden üçer kez PBS ile yıkandı ve lam üzerine 3 µL Hoechst 1 µg/mL (Molecular Probes, 33258) ve 1:1 PBS/glisero1 içeren kapatma medyumunu kullanılarak kapatıldı. +4 °C'ye kaldırıldı.

5.11. Görüntüleme İşlemleri

VEGFR-2 antikoruyla işaretlenmiş olan üç farklı gruba ait on farklı olgu (toplam otuz olgu), konfokal süper çözünürlük mikroskopunda görüntü1endi. Göbek kordonuna ait üç farklı alandan (SAS, IVS, PVS) ortalama 5,75 µm kalınlığındaki bir doku kesitinden x, y ve z eksenlerinde, %50 iç içe geçmiş on beş seri görüntü iki ayrı kanaldan alındı. Alınan görüntülerdeki hücreler, sınırlarından çevrilerek ölçülecek alan belirlendi. Belirlenen alandan her hücre için hücre içindeki sinyal yoğunluğu ölçüldü. Her bir olgu Zen Black görüntüleme programında değerlendirildi. Toplam 345 hücreden elde edilen (mean intensity) ortalama yoğunluk değeri ölçüldü. Ölçülen değeri Excel 2016 programına kaydedildi ve SPSS V22.0'da istatistiksel analiz için değerlendirildi. Yapılan ölçümler, görüntüleme ve kayıtlar **Şekil 24**'te gösterilmiştir.



Şekil 24. Görüntüleme, kayıt ve ölçüm işlemleri.

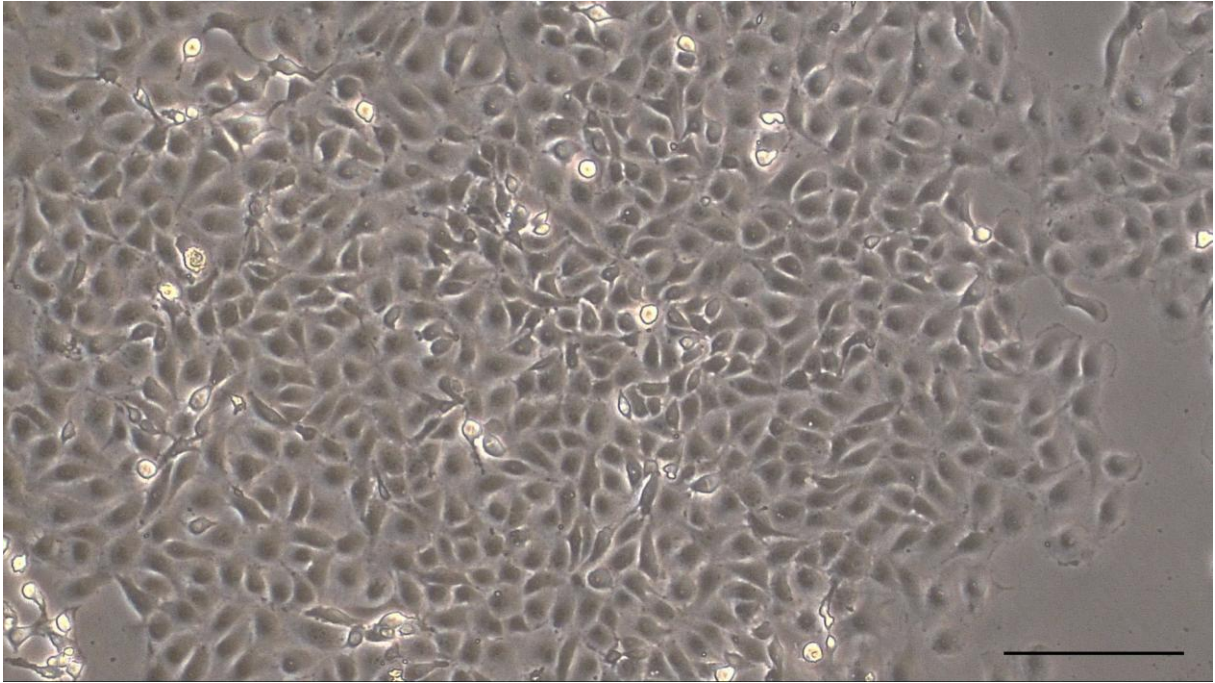
A: Görüntüler 5,75 µm kalınlıkta anti-VEGFR-2 ile işaretlenen kesitlerden üç ekseninde % 50 iç içe geçmiş şekilde alındı. **B:** Alınan seri görüntüler “maximum image projection” (MIP) formatında kaydedildi. * çevresi belirlenerek ölçüm yapılan hücreler. **Küçük resim:** İşaretli hücrelerin daha büyük büyütmesi. **C:** Histogramdan elde edilen grafiğin Excel 2016 programında bölgelere göre oluşturulan ortalama yoğunluk değerlerinin kaydını gösteren bir örnek. **D:** Görüntülerin ölçümlerinden elde edilen bir histogram örneği.

5.12. Anjiyogenez Deneyleri

İn vitro anjiyogenez deneylerinin HUVEC hücre hattı üzerinde yapılmasına karar verilerek öncelikle bu hücrelerin temin edilmesi ve kültür koşullarının oluşturulması sağlandı.

5.12.1. HUVEC Propagasyonu

HUVEC hattı S.B.Ü. Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Labotatuvarı'ndan temin edildi. Hücreler DMEM Ham's F12 (%1 AMP+%1 PS+%1 L-glutamin+%10 FBS içeren) hücre ortamında ekildi ve 75 cm²'lik flasklara yapışıp büyüyen hücreler ters mikroskop altında düzenli olarak izlendi. İki kez pasajlanmasının ardından deneyler için hazır hale getirildi. Hücreler literatürde belirtildiği şekilde kaldırım taşı görüntüsü oluşturdu (**Şekil 25**) (149). Hücreler %90 yaygınlığa ulaştığında tripsin-EDTA ile kaldırılarak alt kültür yapıldı. Bu hücreler de %90 yaygınlığa ulaştığında DMEM Ham's F12 (%1 AMP+%1 PS+%1 L-glutamin+%20 FBS içeren) + %10 DMSO içeren ortamda dondurma tüpleri (kriyovial) içinde dondurularak anjiyogenez deneylerinde kullanılmak üzere -196 °C'ye kaldırıldı.



Şekil 25. HUVEC hücre kültürü kaldırım taşı görünümü.

HUVEC %100 çoğalma aşamasında alınmış görünümü Hoffman modülasyon mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya). Ölçüm çubuğu: 20 µm.

5.12.2. Anjiyogenezin HUVEC Üzerinde Gösterilmesi

5.12.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deney grupları **Tablo 8**'de verilmiştir.

Tablo 8. Deney grupları.

GRUP	KISALTMA	TANIMLAMA
Kontrol	Kontrol	Sağlıklı doğumlar (anne ve bebekte hastalık yok)
Erken başlangıçlı preeklampsi	EPE	Gebeliğin 24-34 haftası arası preeklampsi tanısı almış bireylerden doğan bebekler
Geç başlangıçlı preeklampsi	GPE	Gebeliğin >34 haftası preeklampsi tanısı almış bireylerden doğan bebekler

5.12.2.2. Anjiyogenez Deneylerinin Gerçekleştirilmesi

Dondurulmuş HUVEC çözündürülerek DMEM Ham's F12 (%1 AMP+%1 PS+%1 L-glutamin+%10 FBS içeren) kültür ortamına ekildi. Hücreler %60-70 yaygınlığa ulaştığında kültür medyumları çekildi, yerine FBS içermeyen medyum eklendi ve hücrelere literatürde belirtildiği şekilde 24-36 saat boyunca açlık prosedürü uygulandı (150).

Daha öncesinde -20 °C'de saklanan büyüme faktörleri azaltılmış Matrigel (Corning, 354230, ABD) alikotları deneyden önce çözülmesi için +4 °C'ye alındı, 24 saat boyunca bekletildi⁹. Pipet uçları ve 24 kuyucuklu petri kapları bir gece önceden -20 °C'ye bırakıldı ve soğuması sağlandı. Deney başlangıcından önce 24 kuyucuklu petri kaplarının (Greiner Bio-One CellStar 662160, Avusturya) sekizer kuyucuğu 1/3 oranında FBS içermeyen DMEM Ham's F12 ile sulandırılmış 100 µL Matrigelle (3mg/mL) kaplandı. Matrigelin kaplama sonrası fazlası petri kabı hafifçe eğilerek nazikçe çekildi. Kaplama işlemleri buz üzerinde gerçekleştirildi¹⁰. Kaplanan petri kabı 90 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

PBS içinde -80 °C'de saklanan ekzozom örnekleri hastalardan kaynaklanan farklılıkları ortadan kaldırmak için bir araya getirilerek kullanıldı. Anjiyogenez deneylerinde ekzozomlar,

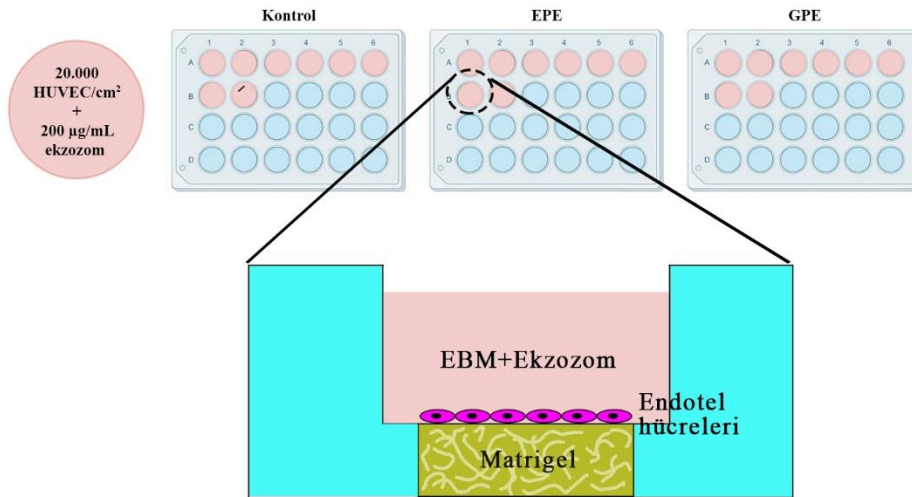
⁹ Matrigelin sağlıklı erimesi için deney öncesinde 16-24 saat +4°C'de bekletilmesi önerilmektedir.

¹⁰ Matrigel oda sıcaklığında jelleşerek akışkanlığını kaybeder ve koloidal bir yapı kazanır bu nedenle tüm kaplama işlemleri buz üzerinde mümkünse +4°C'de yapılmalıdır.

toksik etki oluşmaması için DMSO'yu uzaklaştırmak amacıyla 90 dk 120.000g'de ultrasantrifüj işleminden geçirildi. Hücre kültüründe kullanılacak doza uygun şekilde elde edilen ekzozom çökeltisi endotel hücre ortamıyla (EBM, CC3156, Lonza EBM-2 Basal Medium, İsviçre) sulandırıldı.

HUVEC kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler D-PBS ile yıkanıp tripsin-EDTA ile 37 °C'de bekletildi, 8-10 dk sonunda hücreler kalktıktan sonra üzerine DMEM Ham's F12 (%1 AMP+%1 PS+%1 L-glutamin+%10 FBS içeren) kültür ortamı eklenerek enzim aktivitesi inhibe edildi. Toplam hücre süspansiyonundan 1 mL alınarak hücre sayım cihazıyla sayım yapıldı.

Her deney için 20.000 hücre/cm² ekilebilecek miktarda hücre ayrıldı. 200g'de 10 dk santrifüj edilen süspansiyonun çökelti üzerinde kalan kısmı atıldı ve hücre çökeltisi sırasıyla kontrol, EPE, GPE gruplarında Endotel Hücresi Bazal Ortamıyla (EBM) resuspanse edildi. Resüspansiyonun ardından Matrigel kaplanmış 24 kuyucuklu petri kabının 8 kuyucuğuna 20.000 hücre/cm² ekildi ve deney gruplarına 200 µg/mL ekzozom eklendi (**Şekil 26**). Ekilen hücreler %21 O₂ ortamında kültüre edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı ve dörder saat aralıklarla takip edildi, 12. saatte fotoğrafları çekildi ve kaydedildi. Deney 18. saatte sonlandırılarak hücreler 24 kuyucuklu petri kabı içinde %3,5 PFA ile 30 dk fikse edildi, PBS ile yıkanarak +4 °C'ye kaldırıldı.



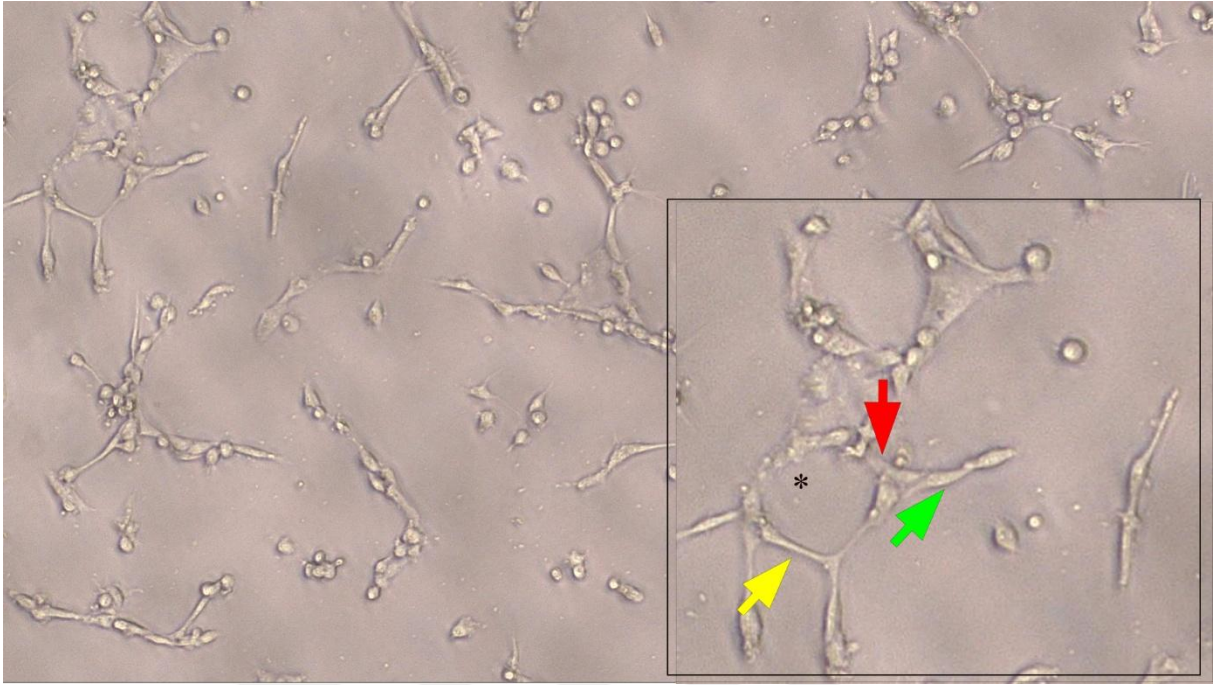
Şekil 26. İn vitro anjiyogenez deney şeması.

5.12.2.3. Anjiyogenez Deney Görüntülerinin Analizi

Deneyin 12. saatinde her kuyucuktan 5x objektif büyütmesinde en az beşer fotoğraf alındı. ImageJ Angiogenesis Analyzer eklentisiyle 12. saatteki görüntüler analiz edildi. Düğüm sayısı, dal sayısı, toplam dal uzunluğu, ağ sayısı, toplam uzunluk parametreleri istatistik analize dahil edilmek üzere kaydedildi. Düğüm sayısı, anjiyogenez filizlenmesinin ilk sürecinde hücre düğümlerinin oluşumuna karşılık gelir. Dal sayısı anjiyogenez filizlenmesinin bir ölçütüdür. Ağ sayısı lümen oluşturmuş hücrelerin olgun anjiyogenez ölçütüdür. Toplam uzunluk, hücre tübül yapılarının oluşumu ve bunların bir ağ oluşturmak üzere her hücreye yayılması sürecini iyi tanımlar (151). Parametrelerin tanımlamaları **Tablo 9** ve **Şekil 27**'de verilmiştir. Analize yönelik örnek görüntü **Şekil 28**'de verilmiştir.

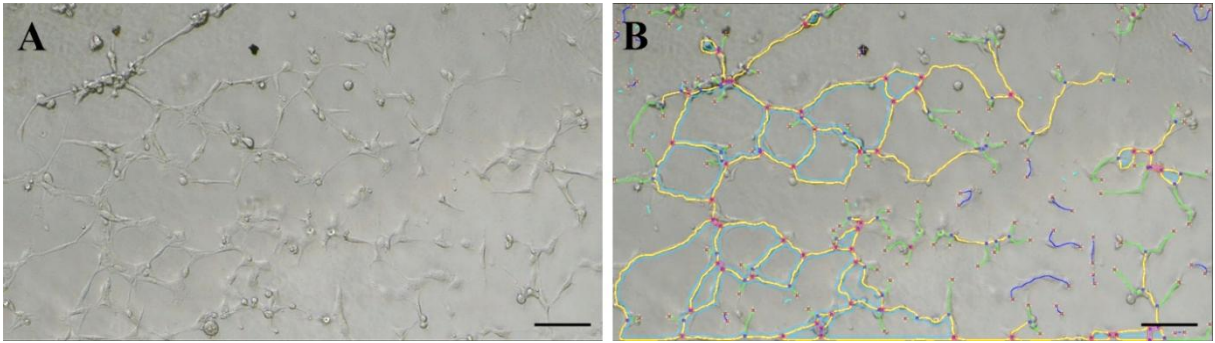
Tablo 9. Anjiyogenez ölçütleri (152, 153).

Ölçüt	Tanımlama
Düğüm	Sonraki dokuz pikselde en az üç bitişik piksele sahip pikseller
Dal	Bir kavşak ve bir ekstremitayla bağlantılı ikili çizgi
Segment	İki kavşakla bağlantılı ikili çizgi
İzole Segment	Bir bağlantı noktasına ve uç noktaya çok yakın bağlanmış bir ikili hat
Ağ	Etrafı segmentlerle çevrili kapalı alanların haritası
Toplam uzunluk	Analiz edilen alandaki segmentlerin, izole elemanların ve dalların uzunluklarının toplamı.



Şekil 27. Anjiyogenez ölçütlerinin gösterimi 5x büyütme.

Büyük resimde **yeşil ok: dal**, **kırmızı ok: düğüm**, **sarı ok: segment**, * ağı gösterir (153, 154).



Şekil 28. ImageJ Anjiyogenez analizi.

A: Tüp oluşumunu gösteren bir faz-kontrast görünümü. 5x büyütme. **B:** ImageJ Angiogenesis Analyzer eklentisiyle görüntü analiz süreci ve ölçülen parametreler, **Sarı: segment**, **kırmızı: düğüm**, **mavi: ayrı yapılar**, **yeşil: dal**, **açık mavi: ağı**

5.13. Örneklerden qRT-PCR ile VEGFR-2 İfade Düzeyinin Analizi

Çalışmada EPE, GPE ve kontrol gruplarına ait toplam 9 biyolojik örnek (her grup için n=3) kullanıldı. Üç farklı gruba ait 1 cm'lik göbek kordonu parçası iki arteri ve bir veni çıkartıldıktan

sonra kalan göbek kordonu stromasının bir parçası qRT-PCR analizleri için Eppendorf tüpleri içinde -80 °C'ye kaldırıldı. Deneylere başlarken yaklaşık 10-30 mg doku (toplam 9 örnek her gruptan 3 örnek havuz yapılarak çalışıldı) RNA içermeyen Eppendorf tüpe alındı. Üzerine 1 mL Trizol eklendi ve sonikatör (DLAB, D-160, Çin) ucu %20-30 güçte 10-20 saniye 3'er kez Eppendorf tüpe daldırıldı. Bu işlemler buz üzerinde yapıldı. Doku tamamen parçalanıp homojen bir çözelti elde edildiğinde oda sıcaklığında beş dakika inkübe edildi. Tüplere 200 µL kloroform eklendi ve iyice çalkalanıp on beş saniye vortekslendi. Oda sıcaklığında beş dakika inkübe edildikten sonra 4 °C'de 12000 g'de on beş dakika santrifüjlendi (Thermo Scientific, Servall Legend Micro 21R, ABD). Elde edilen çözeltide üst faz RNA, orta faz DNA ve alt faz protein ile organik atıklar içermektedir. Üst faz (RNA) (yaklaşık 500 µL) yeni bir Eppendorf tüpüne alındıktan sonra üzerine eşit hacimde soğuk izopropanol eklendi. Çözelti 20 °C'de 10 dakika bekletildikten sonra 4 °C'de 12000 g'de on dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası dipteki beyaz RNA çökeltisi üzerine 1 mL %75 soğuk etanol eklendi ve kısa bir süreliğine vortekslendi. Çözelti 4 °C'de 7500 g'de beş dakika santrifüjlendi. Etanol dikkatlice döküldükten sonra çökelti tamamen kurumamasına dikkat edilerek havada 5-10 dakika kurutuldu. Çökelti 20-50 µL RNAaz içermeyen suyla resüspande edildi. RNA örnekleri -80 °C'de ileri işlemlere kadar saklandı (**Şekil 29**).

Deneylerin devamında RNA örneklerinden miktar ölçümü ve kalite kontrolü için spektrofotometrik ölçüm cihazı NanoDrop (BioSpec, Nano Spektrofotometre, ABD) kullanıldı. Cihaz başlatıldıktan sonra RNA modu seçildi ve boş okuma için 1-2 µL RNAaz içermeyen su damlatıldı. Devamında 1-2 µL RNA örneği cihaza yüklendi ve ölçüm yapıldı. Ölçümler sonucunda derişim (ng/µL), A260/A280 oranı ~ 1,8-2,1 değeri RNA saflığı için uygun olarak belirlendi ve çalışmaya dahil edildi. cDNA sentezinin yapılması için toplam RNA miktarının eşit olması gerektiğinden eşitleme için toplam miktar 1000 ng olacak şekilde her örnekten ne kadar alınacağı hesaplandı.

cDNA sentezi devamında cDNA sentezi için RNA şablonları ve 4x Süper RT qPCR Karışımı (Medchem, HY-K0510A, ABD) buz üzerinde çözündükten sonra çözeltileri nazikçe ve karıştığından emin olana kadar karıştırıldı. Buz üzerindeki PCR tüpüne 5 µL 4x Süper RT Karışımı, toplam RNA miktarı 100 ng'a denk gelecek kadar tüpe eklendi. Tüm tüplerin son hacmi 20 µL olana kadar ve 20 µL'ye kadar RNAaz içermeyen su eklendi. Bileşenler iyice karıştırıldıktan sonra santrifüjle tüp dibine çöktürüldü. Termal döngü (Thermocycler) cihazına tüpler yerleştirildikten

sonra sırasıyla 25 °C’de beş dk, 55 °C’de on beş dk ve 85 °C’de iki dk programıyla çalıştırıldı. Devamında karışımın üzerine 80 µL RNAaz içermeyen su eklenerek -20 °C’ye kaldırıldı.

VEGFR2	F	CAAGTGGCTAAGGGCATGGA	60.03	20	181
NM_002253.4	R	ATTTCAAAGGGAGGCGAGCA	59.96	20	
GAPDH NM_001289745.3	F	TGCACCACCAACTGCTTAG	57.98	19	176
	R	GATGCAGGGATGATGTTC	52.81	18	

qRT-PCR deneyleri için her örneğe toplam 10 µL’lik reaksiyon karışımı eklendi. İçeriğinde sırasıyla 5 µL 2x EvaGreen Master Mix (Bio-Rad, SsoFast EvaGreen Supermix, Birleşik Arap Emirlikleri), 0,5 µL ileri primer (10 µM), 0,5 µL geri primer (10 µM), 2 µL cDNA ve 2 µL RNaz içermeyen su konarak hazırlandı. Üçlü biyolojik tekrarlar qRT-PCR deneylerinde analiz edilen her belirteç için kullanılan primerler aşağıda verilmiştir. Ardından qRT-PCR deneyleri için termal döngü programında (Biorad, CFX96 Real-Time System, Birleşik Arap Emirlikleri) cihaz ayarları yapıldı: 95 °C’de 2 dakika 1 döngü ile DNA denatürasyonu, 95 °C’de 10-15 saniye denatürasyon, 58-60 °C’de 15-30 saniye 40 döngü ile primer bağlanması, 72 °C’de 20-30 saniye uzama ve sinyal toplama aşamaları gerçekleştirildi. Son olarak erime eğrisi analizi için 60 °C’den 95 °C’ye kadar (0,5 °C/saniye artış ile) 1 döngü gerçekleştirildi.

Deneylerin devamında qRT-PCR ürününü değerlendirmek için agaroz jelde yürütme işlemi gerçekleştirildi. İlk olarak %2’lik jel için 2 g agaroz 100 mL 1x Tris-asetat-EDTA tamponunda mikrodalgada tamamen eriyene kadar ısıtıldı. Hafifçe soğuduktan sonra üzerine 7 µL Red Safe eklendi ve çözelti kalıba döküldükten sonra tarak yerleştirildi. Oda sıcaklığında 20-30 dakika donması ve katılaşması beklendi. Elektroforez için jel dökme işlemi sonunda tarak çıkartıldı, jel tanka yerleştirildi ve üzerine 1x Tris-asetat-EDTA tamponu döküldü. Her ürün için 5 µL qRT-PCR ürünü ve 1 µL 6x yükleme boyası (master mix içeriyorsa eklenmez) karıştırıldı ve her bir kuyucuğa 3 µL olacak şekilde DNA ladder örnekleri yüklendi. 150 V’da 30-45 dakikada bandın yeterince ayrılması gözlemlenene kadar elektroforez deneyi gerçekleştirildi. Son olarak örneklerin değerlendirilmesi amacıyla görüntüleme sistemi (Biorad, ChemiDoc MP Imaging System, Birleşik Arap Emirlikleri) kullanılarak jel görüntüsü alındı. Kontrol, EPE ve GPE olgularındaki her örnek için VEGFR-2 genine ait Ct değeri, aynı örneğe ait GAPDH Ct değeriyle normalize edilerek ΔCt

değeri hesaplandı. Grup karşılaştırmaları $\Delta\Delta Ct$ yöntemiyle yapıldı ve bağıl gen ifade düzeyleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile hesaplandı. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA testi ile yapıldı ve $p<0.05$ anlamlı kabul edildi. PCR değerlerinin hesaplanması **Tablo 10**'da verilmiştir.

Tablo 10. PCR daki değerlerin hesaplanması

1. ΔCt Hesaplaması

Hedef gen: VEGFR-2

Kontrol geni: GAPDH.

$\Delta Ct = Ct_{\text{hedef}} - Ct_{\text{GAPDH}}$

2. $\Delta\Delta Ct$ Hesaplaması

Her deney grubu için ΔCt değerleri, kontrol grubunun ortalama ΔCt değerine göre karşılaştırılarak $\Delta\Delta Ct$ hesaplanmıştır:

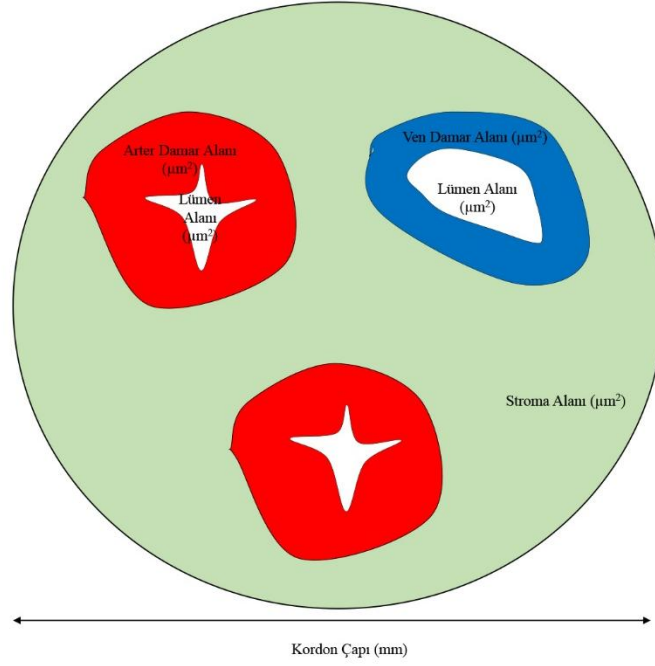
$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Örnek}} - \Delta Ct_{\text{kontrol}}$

3. Kat Değişimi Hesaplaması (Fold Change)

İlgili genin ifade düzeyindeki relatif artış veya azalış şu formülle hesaplanmıştır:

Relatif Gen İfadesi (Fold Change) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Bu hesaplama sonucu elde edilen değerler, her deney grubunda hedef genin kontrol grubuna göre artış veya azalışını göstermektedir.



Şekil 30. Histomorfometrik ölçüm parametreleri.

Rutin H&E ve Mallory Azan trikrom boyasıyla boyanan kesitlerden kesitteki ölçümler gerçekleştirildi ve Excel 2016 programına kaydedildi.

Tablo 11. Histomorfometrik ölçüm parametreleri.

ÖLÇÜLEN DEĞERLER	TANIMLAMA
Arter damar alanı	Damarların kas tabakasının stromayla komşu olduğu bölgelerden çizilen kapalı alandan yapılan ölçüm
Arter lümen alanı	Damarın endotel sınırından geçen kapalı alanlardan yapılan ölçüm
Ven damar alanı	Damarların kas tabakasının stromayla komşu olduğu bölgelerden çizilen kapalı alandan yapılan ölçüm
Ven lümen alanı	Damarın endotel sınırından geçen kapalı alanlardan yapılan ölçüm
Kordon çapı	Kordonun tam kesitinin dışından farklı yönde yapılan iki farklı ölçümün ortalaması
Kordon alanı	Kordonun tam kesitinin dışından çevrilerek alınan ölçüm

Tablo 12. Hesaplanan histomorfometrik değerler.

ÖLÇÜLEN DEĞERLER	HESAPLAMA
Arter duvar alanı	Arter damar alanı-Arter lümen alanı
Arter lümen indeksi	Arter lümen alanı/Arter damar alanı
Ven duvar alanı	Ven damar alanı-Ven lümen alanı

Ven lümen indeksi	Ven lümen alanı/Ven damar alanı
Stroma alanı	Toplam kordon alanı- Toplam damar alanı
Toplam damar alanı	Arter ve ven damar alanlarının toplamı

5.15. Verilerin İstatistiksel Analizi

Deney gruplarından elde edilen tüm veriler bilgisayar ortamına aktarılarak sayısallaştırıldı. Gerekli hata kontrolleri ve düzeltmeler yapıldı.

Endotel hücrelerinin in vitro ortamda anjiyogenez performansını belirlemek amacıyla, her bir deney grubundaki her bir kuyudan en az 5, en çok 20 fotoğraf alındı. Kontrol grubundaki kuyulardan 80, EPE grubundan 56 ve GPE grubundan ise 83 olmak üzere toplam 219 adet fotoğraf elde edildi. Kuyulardan elde edilecek ölçüm değerlerinin fotoğraf sayılarından etkilenmesini önlemek amacıyla, her kuyu için çekilen tüm fotoğrafların ortalaması alınarak, her kuyuyu temsil eden tek bir ortalama değer hesaplandı.

Ölçülen değişkenlerin deney gruplarında normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testiyle incelendi. İncelenen değişkenlerden ağ sayısının (Nb meshes), gruplarda normal dağılmadığı, diğer tüm değişkenlerin tüm deney gruplarında normal dağılıma uyduğu görüldü. Normal dağılıma uyan değişkenlerin gösteriminde ortalama $\pm$ standart sapma, normal dağılmayan değişkenler için ise ortanca (çeyreklikler arası genişlik – ÇAG (IQR)) değerleri verildi.

Deney grupları arasında ölçüm değerlerini karşılaştırmak için Ağ Sayısı (Nb meshes) değişkeninde Kruskal-Wallis non-parametrik varyans analizi, diğer tüm değişkenler için ise ANOVA analizi uygulandı. Karşılaştırılan değişkenlerde gruplar arasında fark bulunduğunda, farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirleyebilmek için Scheffe post-hoc testi veya Bonferroni düzeltmeli post-hoc ikili karşılaştırmalar yapıldı. Düğüm sayısı, dal sayısı, toplam dal uzunluğu, ağ sayısı, toplam uzunluk parametrelerine ait bulgular verildi.

Göbek kordonunun farklı bölgelerinden ölçülen sinyal seviyelerinin normal dağılıma uymadıkları görüldü. Deney grupları ve farklı bölgeler arasında sinyal seviyelerini karşılaştırmak için Kruskal-Wallis non-parametrik varyans analizi kullanıldı. Fark bulunduğunda, farkın kaynağını belirleyebilmek için Bonferroni düzeltmeli post-hoc ikili karşılaştırmalar yapıldı.

Histomorfometrik ölçüm değerlerinden bazılarının normal dağılıma uydukları, bazılarının ise uymadıkları belirlendi. Histomorfometrik değerleri tanımlarken normal dağılan değişkenler için ortalama±Standart Sapma, diğerleri için Ortanca (ÇAG) değerleri verildi. Deney grupları arasında histomorfometrik özellikleri karşılaştırmak için verinin yapısına göre ANOVA veya Kruskal-Wallis testi uygulandı. Fark bulunduğunda Bonferroni düzeltmeli post-hoc ikili karşılaştırmalar yapıldı.

İstatistiksel analiz ve hesaplamalar için IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY, IBM Corp.), PCR hesaplamaları ve grafiği için GraphPad Prism 9 uygulaması kullanıldı. Diğer tüm tablo ve grafik düzenlemelerinde Microsoft Excel 2016 programı kullanıldı. İstatistiksel kararlarda $p<0,05$ anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

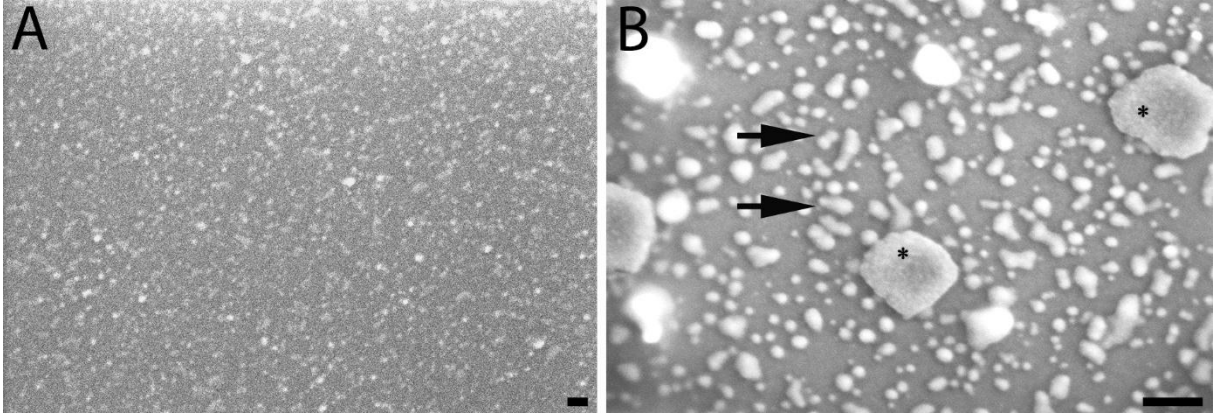
Gerçekleştirilen deneyler ve toplanan veriler sonrasında elde edilen bulgular 5 kategoride değerlendirildi. Bunlar sırasıyla; (i) göbek kordonu histomorfometri bulguları, (ii) hücre kültürü bulguları, (iii) doku ve hücrelerden immünoflöresan işaretleme bulguları, (iv) ekzozom tanımlama ve doğrulama bulguları, (v) in vitro anjiyogenez deney bulguları.

6.1. Ekzozom Tanımlanması

Tüm gruplardan elde edilen kültür hücrelerinin son 48 saatinde aç bırakılmasından sonra (ekzozom içermeyen FBS katkılı kültür medyumunu) toplanan kültür sıvısından ayrıştırılan ekzozom örnekleri aşağıdaki teknikler kullanılarak tanımlandı.

6.1.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SEM ile görüntülemeye, hücrelerden elde edilen hücre dışı veziküller, standart SEM takiplerinden sonra yüksek büyütme (>80K) SEM analizlerine alındı. Ekzozomlarla tutarlı boyutta küresel yapılar, yer yer agregatlar izlendi (Şekil 31).



Şekil 31. Ekzozom SEM gözlemi.

Ayrıştırmak üzere işleminden geçirilen sıvı materyalin taramalı elektron mikroskobunda (SEM) yapılan gözlemlerinde 50-150 nm çapında ekzozomlarla uyumlu küresel yapıların yanı sıra agregatlar (yıldızlar) izlendi. Büyütme oranı: 140 kx

6.1.2. Ekzozomlarda Protein Miktarının Belirlenmesi

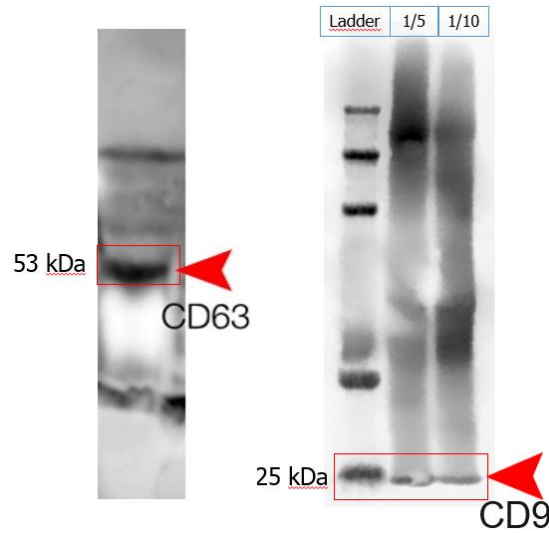
Hücrelerden ekzozom ayırıştırma öncesi yapılan canlılık oranı Kontrol olgularında %74, EPE olgularında %76, GPE olgularında %76 idi (**Tablo 13**). Hücre sayıları kontrol grubunda $134,49 \times 10^6$, EPE $140,67 \times 10^6$, GPE $132,48 \times 10^6$ olarak izlendi. MicroBCA yöntemiyle ölçülen protein miktarı, kontrol grubunda 2380,58 μg , EPE grubunda 698,73 μg , GPE grubunda 816,04 μg olarak ölçüldü.

Tablo 13. Ekzozom protein miktarları ve hücre sayıları.

Olgu türü	Pasaj	Canlılık Oranı	Ekzozom protein (μg)	Toplam hücre (milyon hücre)
Kontrol	P ₄₋₅	%74	2380,58	134,49
EPE	P ₄₋₅	%76	698,73	140,67
GPE	P ₄₋₅	%76	816,04	132,48

6.1.3. Western Blot ile Ekzozom Yüzey Proteinlerinin Gösterilmesi

Ekzozom zarında bulunan tetraspaninlerden (CD9, CD63, CD81) biri olan CD63 proteinine uygun olarak 53 kDa'da ve CD9'a uygun olarak 25 kDa'da bant varlığı Western Blotla belirlendi (**Şekil 32**).



Şekil 32. Western Blot yöntemiyle ekzozomların CD63 ve CD9 protein içeriğinin belirlenmesi.

6.1.4. Ekzozomların Boyut ve Sayılarının Belirlenmesi

qNano[®] cihazıyla Ayarlanabilir Dirençli Darbe Algılama yöntemi kullanılarak, elde edilen ekzozomların boyut ve yoğunluk çalışması sonucunda, P₃'teki hücrelerin kültür ortamlarından, ortalama $20,4 \times 10^6$ hücreden ultrasantrifüjle elde edilen ekzozomların ortalama sayıları $6,28 \times 10^9$ ve ortalama boyutları literatürde belirtilen boyut aralığına uygun olarak 158,6 nm bulundu (**Tablo 14**).

Tablo 14. Ekzozom sayı ve boyutları¹¹.

Örnek No	Pasaj Sayısı	Toplam Hücre Sayısı	Toplam Ekzozom Sayısı	Boyut ort. (nm)
1	P ₃	$21,6 \times 10^6$	$14,12 \times 10^9$	179
2	P ₃	26×10^6	$3,48 \times 10^9$	122
3	P ₃	$13,9 \times 10^6$	$1,244 \times 10^9$	175
Ortalama		$20,5 \times 10^6$	$6,28 \times 10^9$	158,6

6.2. Göbek Kordonu Histomorfometri Bulguları

Olgulardan elde edilip laboratuvara getirilen kordonların PFA tespitiinden sonra yapılan dondurma kesitlerinin H&E ve MA ile yapılan boyamaları üzerinde alınan ölçümlere göre arter kesitlerinin alanları ölçülerek ortalamalar karşılaştırıldı. Kontrol olgularında (n=15) $3,85 \pm 1,17$, EPE olgularında (n=14) $3,68 \pm 0,82$, GPE olgularında (n=14) $4,17 \pm 1,25$ mm² olarak ölçüldü. Gruplar arası arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,529) (**Tablo 15**).

Tablo 15. Arter kesit alanı.

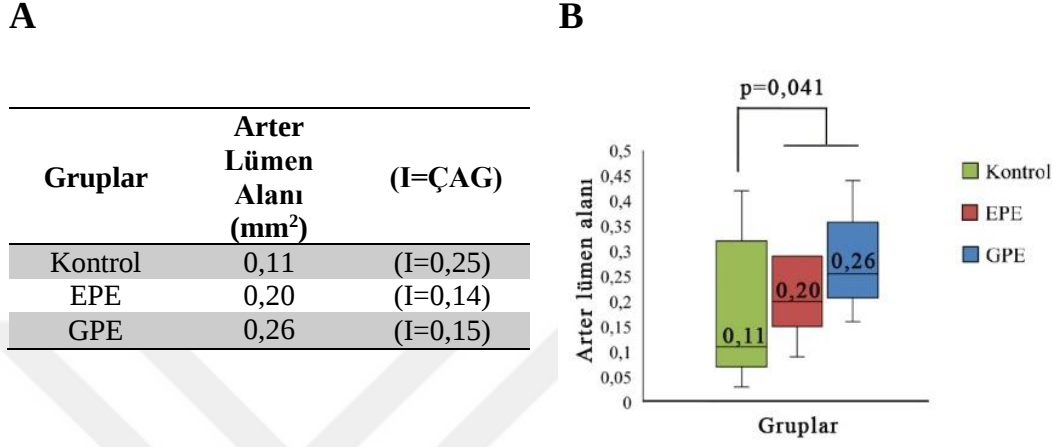
Gruplar	Arter Kesit Alanı (mm ²)
Kontrol	$3,85 \pm 1,17$
EPE	$3,68 \pm 0,82$
GPE	$4,17 \pm 1,25$

ort+std.

Histomorfometrik verilerden arter lümen alanı, kontrol olgularında ortalama $0,11$ ($I=0,25$), EPE olgularında $0,20$ ($I=0,14$), GPE olgularında $0,26$ ($I=0,15$) olarak ölçüldü. Gruplar arası fark

¹¹ Ekzozom bulguları TTU-2022-2303 nolu BAP projesiyle yürütülen ortak çalışmalar sonucunda elde edilmiştir.

istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,041$). Post-hoc anlamlılık testinde gruplar arasındaki farkın kontrol gruplarından kaynaklandığı görüldü (**Şekil 33**).



Şekil 33. Arter lümen alanı verileri ve grafiği.

A: Arter lümen alanını gösteren tablo. EPE ve GPE olgularında arter lümen alanı geniştir.

B: Kontrol olguları ve preeklampsi olguları (EPE ve GPE) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

Boyali kesitler üzerinde ven kesit alanları ölçülerek gruplar arasındaki fark değerlendirildi. Ölçümlerde kontrol grubunda $7,78\pm2,52$, EPE grubunda $5,58\pm1,70$ ve GPE grubunda $6,31\pm2,80$ olarak ölçüldü. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,084$) (**Tablo 16**).

Tablo 16. Ven kesit alanı.

Gruplar	Ven Kesit Alanı (mm ²)
Kontrol	7,78±2,52
EPE	5,58±1,70
GPE	6,31±2,80

Ven lümen alanları ölçülerek gruplar arasındaki fark değerlendirildi. Kontrol olguları $2,40\pm0,23$, EPE olguları $2,07\pm0,48$, GPE olguları $2,46\pm0,58$ olarak ölçüldü. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,135$) (**Tablo 17**).

Tablo 17. Ven lümen alanı.

Gruplar	Ven Lümen Alanı (mm ²)
Kontrol	2,40±0,23
EPE	2,07±0,48
GPE	2.46±0.58

Göbek kordonunun toplam çap ölçümleri kontrol olgularında 11,01±1,23, EPE olgularında 10,14±2,19, GPE olgularında 10,19±1,48 olarak ölçüldü. Kordon çaplarında gruplar arasında oluşan fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,282) (**Tablo 18**).

Tablo 18. Toplam kordon çapı.

Gruplar	Kordon Çapı (mm)
Kontrol	11,01±1,23
EPE	10,14±2,19
GPE	10,19±1,48

Toplam kordon alanı kontrol olgularında 86,27±14,87, EPE olgularında 82,51±28,71, GPE olgularında 86,37±30,77 olarak ölçüldü. Kordon alanı gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,927) (**Tablo 19**).

Tablo 19. Toplam kordon alanı.

Gruplar	Kordon Alanı (mm ²)
Kontrol	86,27±14,87
EPE	82,51±28,71
GPE	86,37±30,77

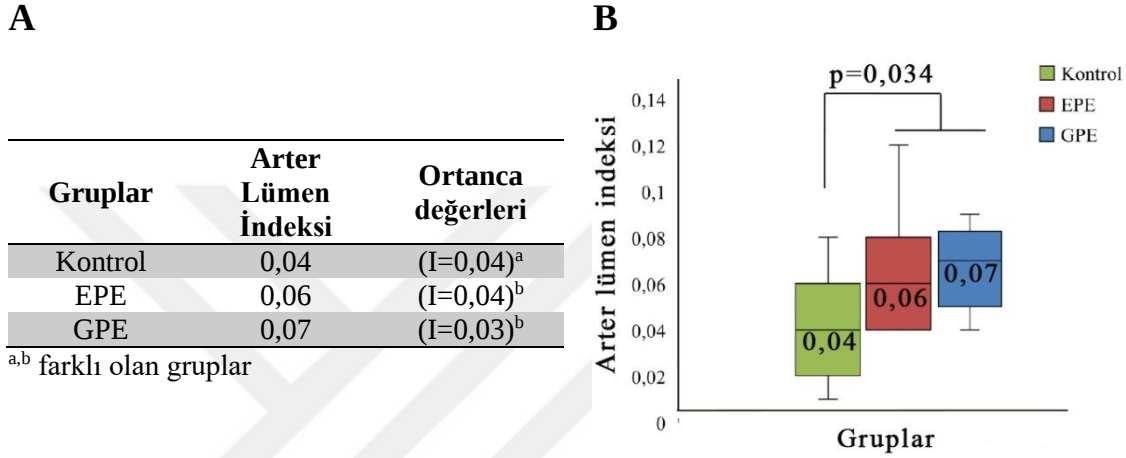
Ölçümlerle elde edilen değerlerden hesaplanan bulgular aşağıda **Tablo 20-25**'te özetlenmiştir. Önce damarlarla ilgili, sonra stromayla ilgili sonuçlar verilmiştir.

Arter duvar alanları ölçülerek gruplar arasındaki fark değerlendirildi. Ölçümlerde kontrol grubunda 3,68±1,09, EPE olguları 3,40 ± 0,68, GPE olguları 3,85±1,19 olarak hesaplandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,481) (**Tablo 20**).

Tablo 20. Arter duvar alanı.

Gruplar	Arter Duvar Alanı (mm ²)
Kontrol	3,68±1,09
EPE	3,40±0,68
GPE	3,85±1,19

Histomorfometrik verilerden arter lümen indeksi (lümen alanı/kesit alanı), kontrol olgularında 0,04 ($I=0,04$), EPE olgularında 0,06 ($I=0,04$) GPE olgularında ise 0,07 ($I=0,03$) olarak hesaplandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,034$). Post-hoc analize göre kontrol gruplarıyla EPE ve GPE grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (**Şekil 34**).



Şekil 34. Arter lümen indeksinin veri ve grafiği.

A: Arter lümen indeksini gösteren tablo. Arter lümen indeksi preeklampsi olgularında kontrollere göre yüksektir. **B:** Arter lümen indeksi preeklampsi olgularıyla kontrol olguları arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunur. Preeklampsi olguları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Ven duvar alanları ölçülerek gruplar arasındaki fark değerlendirildi. Ölçümlerde kontrol olguları $4,71\pm1,42$ EPE olguları $3,50\pm1,23$, GPE olguları $4,04\pm1,62$ olarak hesaplandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,132$) (**Tablo 21**).

Tablo 21. Ven duvar alanı.

Gruplar	Ven Duvar Alanları (mm ²)
Kontrol	4,71±1,42
EPE	3,50±1,23
GPE	4,04±1,62

Ven lümen indeksi kontrol gruplarında 0,39 ($I=0,08$), EPE olgularında 0,36 ($I=0,09$), GPE 0,37 ($I=0,19$) olarak hesaplandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,588$) (**Tablo 22**).

Tablo 22. Ven lümen indeksi.

Gruplar	Ven Lümen İndeksi
Kontrol	0,39 ($I=0,08$)
EPE	0,36 ($I=0,09$)
GPE	0,37 ($I=0,19$)

Kordon stroma alanı ölçümlerinde kontrol grupları $71,10 \pm 12,07$, EPE $69,92 \pm 27,23$, GPE $71,73 \pm 28,33 \text{ mm}^2$ olarak hesaplandı. Gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($p=0,987$) (**Tablo 23**).

Tablo 23. Kordon stroması alanı.

Gruplar	Kordon Alan Değeri (mm^2)
Kontrol	$71,10 \pm 12,07$
EPE	$69,92 \pm 27,23$
GPE	$71,73 \pm 28,33$

Göbek kordonunda arter ve venlerin toplam damar alanı hesaplanarak gruplar arasında karşılaştırıldı. Kontrol olgularında $15,52 \pm 4,64$, EPE olgularında $12,59 \pm 3,46$, GPE olgularında $14,64 \pm 4,48 \text{ mm}^2$ olarak bulundu. Üç grup arasında toplam damar alanı açısından istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmadı ($p=0,227$) (**Tablo 24**).

Tablo 24. Kordon damar alanı.

Gruplar	Kordon Damar Alanı (mm^2)
Kontrol	$15,52 \pm 4,64$
EPE	$12,59 \pm 3,46$
GPE	$14,64 \pm 4,48$

Tablo 25. Gruplar arası histomorfometrik ölçüm ve hesaplama değerleri.

Histomorfolojik Ölçüm	Kontrol (n=15)	EPE (n=14)*	GPE (n=14)	p
Arter Alanı (mm^2)	$3,85 \pm 1,17$	$3,68 \pm 0,82$	$4,17 \pm 1,25$	0,529
Arter Lümen Alanı (mm^2)	0,11 (0,25) ^a	0,20 (0,14) ^b	0,26 (0,15) ^b	0,041
Ven Alanı (mm^2)	$7,78 \pm 2,52$	$5,58 \pm 1,70$	$6,31 \pm 2,80$	0,084
Ven Lümen Alanı (mm^2)	2,83 (2,09)	2,30 (0,90)	1,72 (1,50)	0,129
Kordon Çapı (mm)	$11,01 \pm 1,23$	$10,14 \pm 2,19$	$10,19 \pm 1,48$	0,282

Kordon Alanı (mm ²)	86,27±14,87	82,51±28,71	86,37±30,77	0,927
Arter Duvar Alanı (mm ²)	3,68±1,09	3,40±0,68	3,85±1,19	0,481
Arter Lümen İndeksi	0,04 (0,04) ^a	0,06 (0,04) ^b	0,07 (0,03) ^b	0,034
Ven Duvar Alanı (mm ²)	4,71±1,42	3,50±1,23	4,04±1,62	0,132
Ven Lümen İndeksi	0,39 (0,08)	0,36 (0,09)	0,37 (0,19)	0,588
Stroma Alanı (mm ²)	71,10±12,07	69,92±27,23	71,73±28,33	0,987
Kordon Toplam Damar Alanı (mm ²)	15,52±4,64	12,59±3,46	14,64±4,48	0,227

*Bu gruptaki olguların 6 tanesi gelişme geriliği olmayan, geri kalan 8 tanesi 2200-2500 g arası doğum ağırlığında olup klasik olarak gelişme geriliği tanımına uyan olgularıdır.

Tablo 25'te ölçülen ve hesaplanan tüm histomorfometrik değerler özetlendi. Bu parametrelerden sadece arter lümen alanı ve buna bağlı olan arter lümen indeksinin kontrol olgularında, EPE ve GPE olgularından anlamlı düzeyde küçük olduğu görüldü. Diğer ölçüm parametrelerin tamamında gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi.

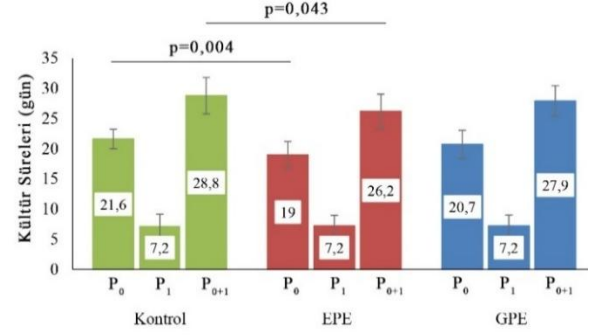
6.3. Hücre Kültürü Verileri

Temmuz 2022-Mayıs 2024 arasında üç gruptan (Kontrol, EPE ve GPE) toplam 71 olgu alınarak kültür işlemleri gerçekleştirildi. Bu olguların 24 tanesi kontrol, 23 tanesi EPE, 24 tanesi GPE olgusudur. Ancak, tüm olgular kültür işlemlerine dahil edilse de toplamda 7 olguda (2 Kontrol, 1 EPE, 2 GPE) kültür işlemlerinde hücre üremesi gerçekleşmedi. Eksplant kültürlerden filizlenen hücrelerin ekimden ilk pasajlama işlemine kadar geçen ilk büyüme sürecinde, (P₀) %100 büyüme oranına erişme süresi ve ilk pasajlamadan sonra (P₁) ikinci kez %100 çoğalma oranına ulaşma süreleri kaydedildi. P₀ ve P₁ değerleriyle ikisinin toplam süresi her olgu için tek tek hesaplandı ve olgular arasında karşılaştırma yapıldı. Kontrol olgularında P₀ süresi 21,63±1,62 gün, EPE olgularında 19±2,0 gün, GPE olgularında 20,73±2,34 gün olarak ölçüldü. Kontrol olgularıyla EPE olguları arasındaki P₀ farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,004). P₁ farkı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=1.000). Toplam kültür süresiye (P₀+P₁) kontrol grubunda 28,8±3,03 gün, EPE grubunda 26,20±2,88 gün, GPE grubunda 27,93±2,54 gün olarak hesaplandı. Toplam kültür süresi gruplar arasında karşılaştırıldığında kontrol ve EPE olgularının ortalaması arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,043) (**Şekil 35**).

A

Pasaj	Kontrol	EPE	GPE
P ₀	21,63±1,6 ^a	19±2,20 ^b	20,73±2,3 ^a
P ₁	7,19±1,97	7,20±1,781	7,20±1,821
P ₀₊₁	28,8±3,0 ^a	26,20±2,8 ^b	27,93±2,5 ^a

^{a,b}: fark gösteren gruplar

B

Şekil 35. Hücre kültürü verileri ve grafiği.

A: Hücre kültür sürelerini gösteren tablo. P₀ süreleri erken başlangıçlı preeklampside azalmıştı.

B: Grupların kültür sürelerini gösteren grafik. Kontrol gruplarıyla erken başlangıçlı preeklampsinin P₀ süreleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunur.

6.4. Kordonda ve Kültür Hücrelerinde VEGFR-2 İfadesi

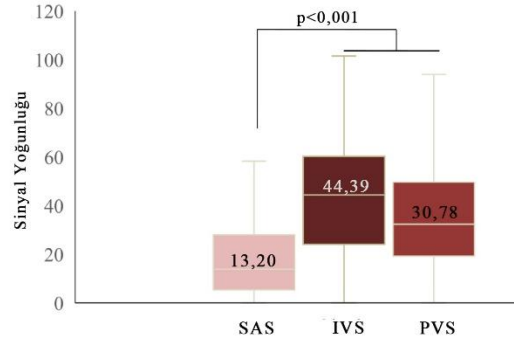
6.4.1.Kordonda VEGFR-2 ifadesi

Çalışmada yer alan üç gruptan alınan göbek kordonu kesitlerinde yapılan immünoflöresan VEGFR-2 işaretlemesi stromanın üç farklı (SAS, IVS, PVS) alanındaki stroma hücrelerinde, süper çözünürlük konfokal mikroskobuyla görüntülendi. Görüntülemeler ardışık kesitlerde alındı ve pozitif sinyal yoğunlukları kantitatif bir yöntem olan sinyal integrasyon tekniğiyle ölçüldü. Her gruptan 10 kesit ve her kesitte de ortalama 10 hücredeki sinyal yoğunluğu ölçüldü; toplam ölçülen hücre sayısı 345 idi. Hücrelerin %10'unda (n=30, %8,7) sinyal yoğunluğunun 0 olduğu görüldü. Sinyal alınabilen hücrelerde sinyal yoğunluğu gri değeri (0-255) üzerinden ölçüldü. Ölçülen ortalama sinyal yoğunluğu minimum 0,1, maksimum 105,81 idi. Bölgeler arası sinyal yoğunluğu gruplar arasındaki farkın gözlemlenmediği ölçümlerde, tüm gruplarda VEGFR-2 sinyal yoğunluğu SAS'te diğer alanlardaki sinyal şiddetine göre anlamlı derecede ($p<0,001$) zayıf bulundu (**Şekil 36**).

A

Gruplar	Min	Maks	Ortanca (ÇAG)
SAS	0,00	64,83	13,20 (<i>I</i> =25,75)
IVS	0,00	101,45	44,39 (<i>I</i> =36,25)
PVS	0,00	105,81	30,78 (<i>I</i> =30,72)

^{a,b}: fark gösteren gruplar

B

Şekil 36. Bölgelere göre sinyal ortanca değerleri (tüm olgular).

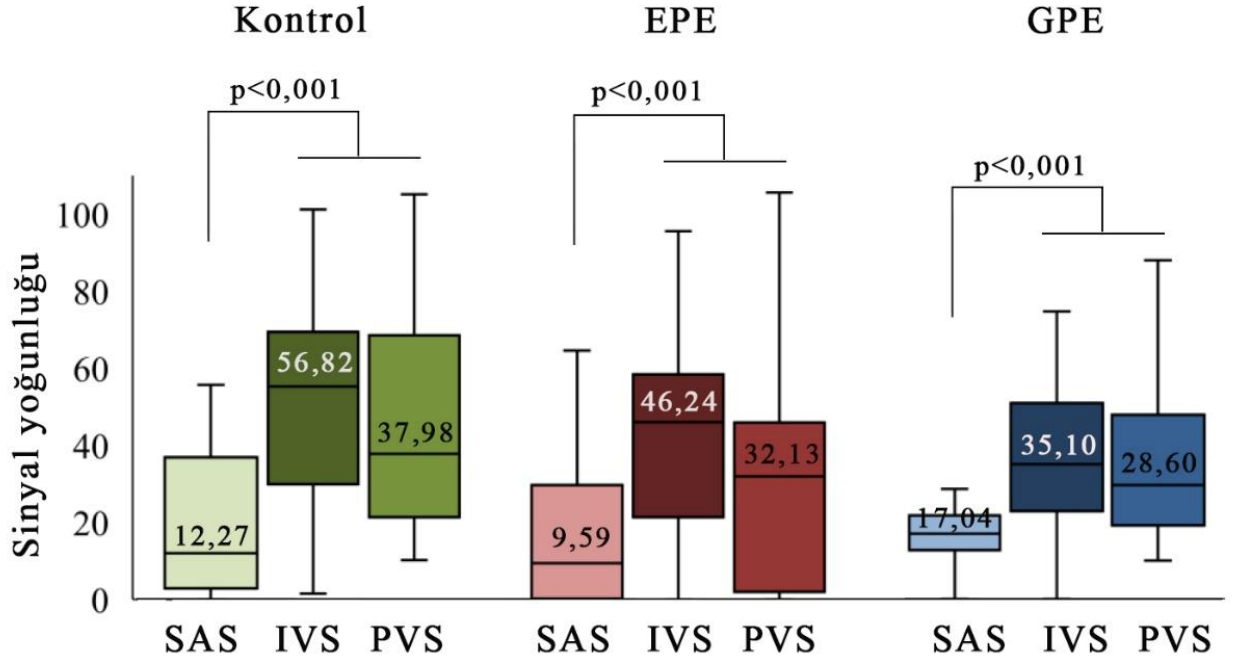
A: SAS diğer iki alandan daha zayıf sinyal şiddeti gösterir. IVS en kuvvetli sinyal şiddetine sahiptir. **B:** SAS, IVS ve PVS arasındaki sinyal şiddet farkı istatistiksel olarak anlamlıdır.

Tablo 26. Gruplar ve bölgeler arası sinyal yoğunluğu (piksel)

Grup	Bölge	Min	Maks	Ortanca (ÇAG)	χ^2	p
Kontrol	SAS*	0,01	55,94	12,2701 (33,99)	29,13	<0,001
	IVS	4,33	101,45	56,8212 (38,92)		
	PVS	10,44	105,35	37,9872 (47,27)		
EPE	SAS*	0,00	64,83	9,59 (29,46)	13,91	<0,001
	IVS	0,00	95,79	46,24 (37,01)		
	PVS	0,00	105,81	32,13 (43,91)		
GPE	SAS*	0,00	45,35	17,04 (8,95)	29,61	<0,001
	IVS	0,00	74,71	35,10 (28,08)		
	PVS	10,12	88,02	28,60 (19,61)		

*Grup içi farkı yaratan bölge.

İkinci olarak bölgeler arasındaki VEGFR-2 sinyal yoğunluğu farkı deney grupları arasında değerlendirildi. Kontrol grubunda SAS bölgesinin sinyal düzeyinin IVS ve PVS bölgelerinden anlamlı miktarda düşük olduğu görüldü (sırasıyla $Z=4,893$; $p<0,001$ ve $Z=4,545$; $p<0,001$). Benzer şekilde EPE grubunda da SAS bölgesinin sinyal düzeyinin IVS ve PVS bölgelerinden anlamlı miktarda düşük olduğu bulundu (Sırasıyla $Z=3,604$; $p<0,001$ ve $Z=2,230$; $p=0,026$). GPE grubunda SAS bölgesinin sinyal seviyesi IVS ve PVS'ye göre düşük bulundu ($Z=4,471$; $p<0,001$ ve $Z=0,856$; $p<0,001$) (**Tablo 26** ve **Şekil 37**).



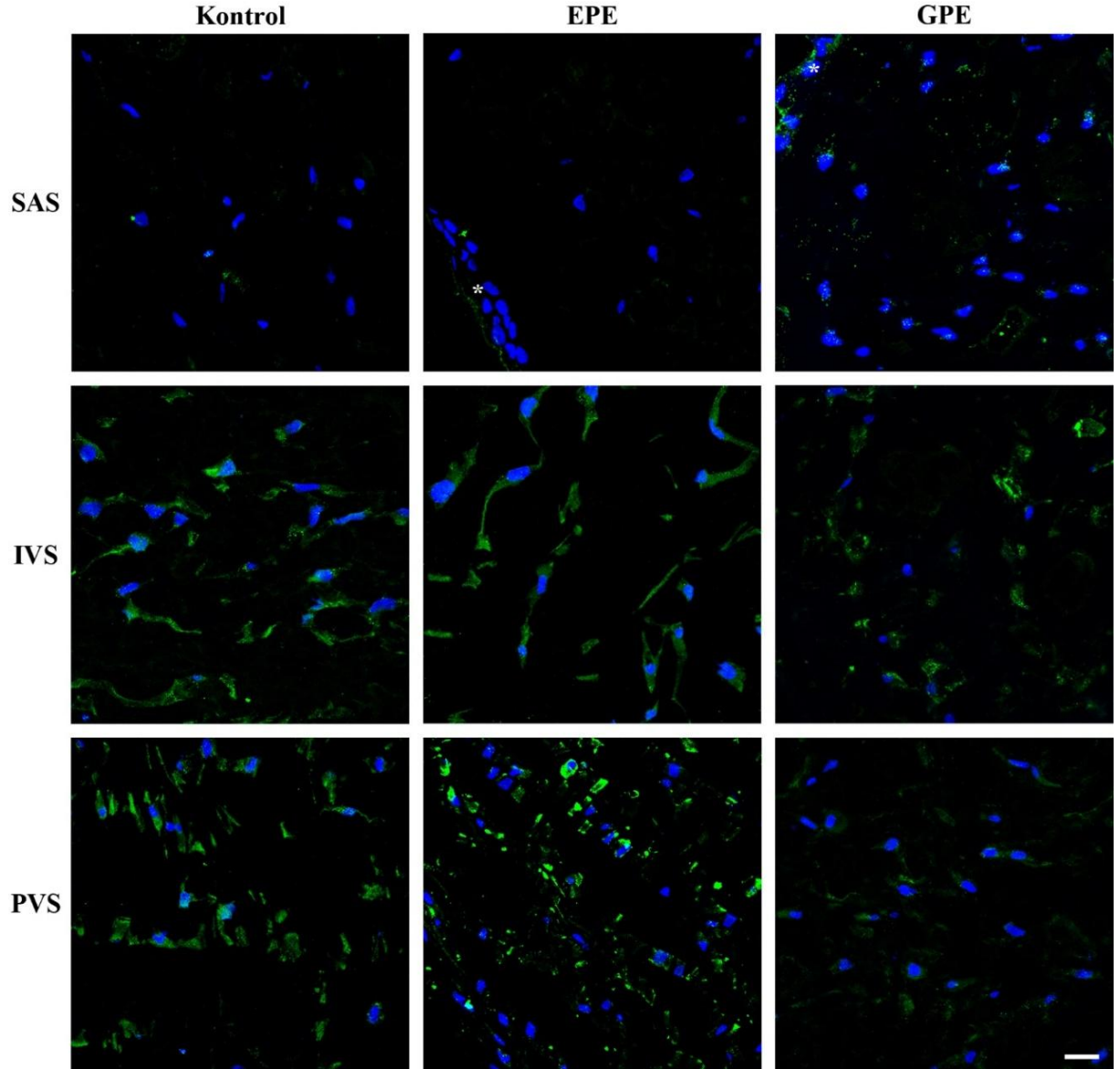
Şekil 37. Gruplar arası ve her gruptaki bölgeler arası sinyal yoğunluğu değerlendirmesi.

Tüm gruplarda VEGFR-2 sinyal yoğunluğu SAS'te diğer alanlardaki sinyal şiddetine göre anlamlı derecede ($p<0,001$) zayıf bulundu.

Tablo 27. Bölgelerin gruplar arası sinyal yoğunluğu farkı.

Grup	Bölge	Min	Maks	Ortanca (ÇAG)	χ^2	p
SAS	Kontrol	0,01	55,94	12,27 (33,99)	4,210	0,122
	EPE	0,00	64,83	9,59 (29,46)		
	GPE	0,00	45,35	17,04 (8,95)		
IVS	Kontrol	4,33	101,45	56,82 (38,92)	5,017	0,081
	EPE	0,00	95,79	46,24 (37,01)		
	GPE	0,00	74,71	35,10 (28,08)		
PVS	Kontrol	10,44	105,35	37,98 (47,27)	4,000	0,135
	EPE	0,00	105,81	32,13 (43,91)		
	GPE	10,12	88,02	28,60 (19,61)		

Bu konuyla ilgili son hesaplama üç gruptaki her bir alanın gruplar içinde birbiriyle kıyaslamasıyla yapıldı. Göbek kordonunun aynı bölgesinden ölçülen sinyal yoğunlukları arasında bir fark bulunmadı, tüm gruplarda SAS diğer alanlara göre daha zayıf VEGFR-2 sinyal yoğunluğuna sahipti (Tablo 27). Şekil 38 gruplarda yapılan dokuya ilişkin immünoflöresan görüntülemeleri göstermektedir.



Şekil 38. Göbek kordonu farklı bölgelerinden alınan immünoflöresan görüntüler.

*Amniyon epitelini gösterir. Gruplar arasında bölgelerde sinyal yoğunlukları arasında bir fark gözlenmedi. SAS, IVS ve PVS'ye göre sinyal yoğunluğu açısından zayıf gözlendi. IVS ve PVS sinyal yoğunlukları IVC lehine gözlene de istatistiksel anlamlılık gözlenmedi. Yeşil: FITC, mavi: DAPI. Ölçüm çubuğu: 20 µm.

6.4.1. Hücrede VEGFR-2 İfadesi

Her gruptan P₃'e ulaşan kültür hücrelerinde VEGFR-2 düzeyleri ve hücre içi dağılımı immünoflöresan tekniğiyle işaretlenip yüksek çözünürlüklü konfokal mikroskopta kaydedildi. Her

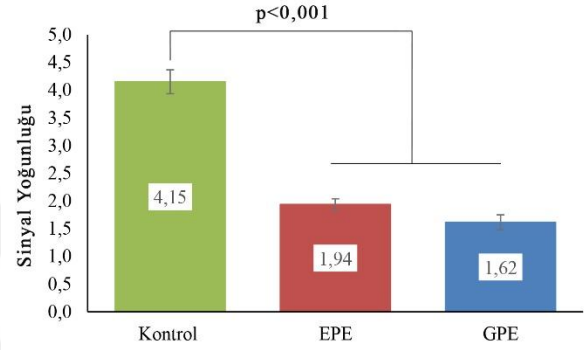
örnekten en az 27 hücre olmak üzere toplam 101 hücrenin sitoplazmasından yapılan sinyal integrasyon hesaplamalarına göre, kontrol grubunda $4,15 \pm 0,22$, EPE grubunda $1,94 \pm 0,1$, GPE grubundaysa $1,62 \pm 0,14$ olarak ölçüldü. Olgulara ait minimum, maksimum ve ortalama değerler **Şekil 39**'da verilmiştir.

A

Grup	En küçük (min)	En büyük (156)	Ort $\pm$ SD
Kontrol	2,16960	9,72851	$4,15 \pm 0,22$
EPE	0,79701	3,94859	$1,94 \pm 0,1$
GPE	0,2500	3,63238	$1,62 \pm 0,14$

^{a,b}: fark gösteren gruplar

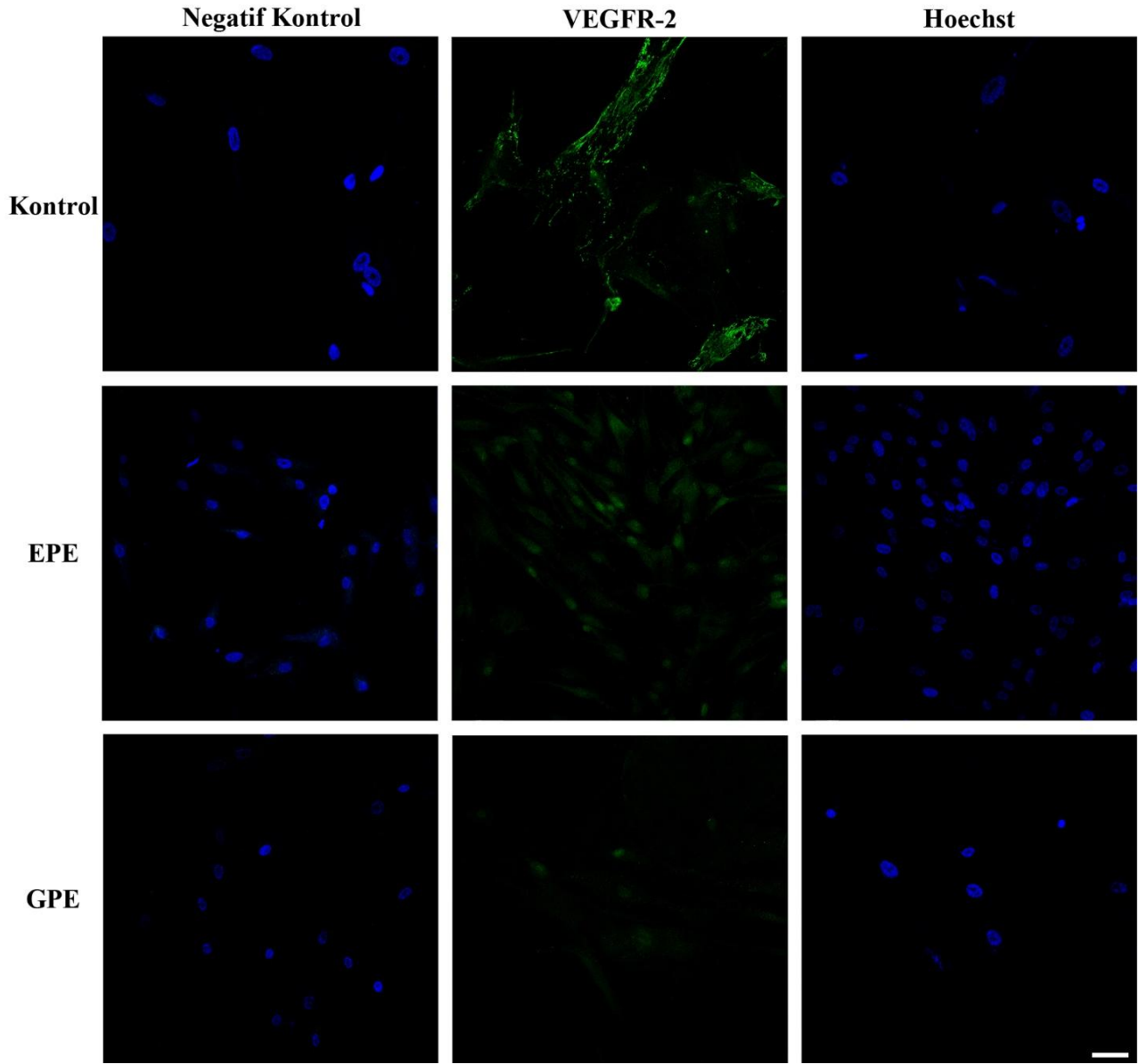
B



Şekil 39. Hücre kültürü VEGFR-2 sinyal yoğunluk değerleri.

A: Hücre kültürü sinyal değerlerini gösteren tablo. **B:** kontrol olguları preeklmps gruplarından güçlü sinyal yoğunluğu gösterdi. EPE grupları GPE gruplarından yüksek gözlemlendi fakat fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Hücre kültürlerinden yapılan ölçümlerde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,001$). Farkın hangi gruplardan kaynaklandığını anlayabilmek için Bonferroni post-hoc testi uygulandı. Post-hoc test sonuçlarına göre kontrol gruplarına ait ortalamalar EPE ve GPE grupları ortalamalarından belirgin olarak (sırasıyla $p<0,001$ $p=0,001$) yüksek bulundu. EPE ve GPE grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,382$). **Şekil 40** hücre kültüründe tespit edilen hücrelerde gerçekleştirilen immünoflöresan işaretlemeleri göstermektedir.



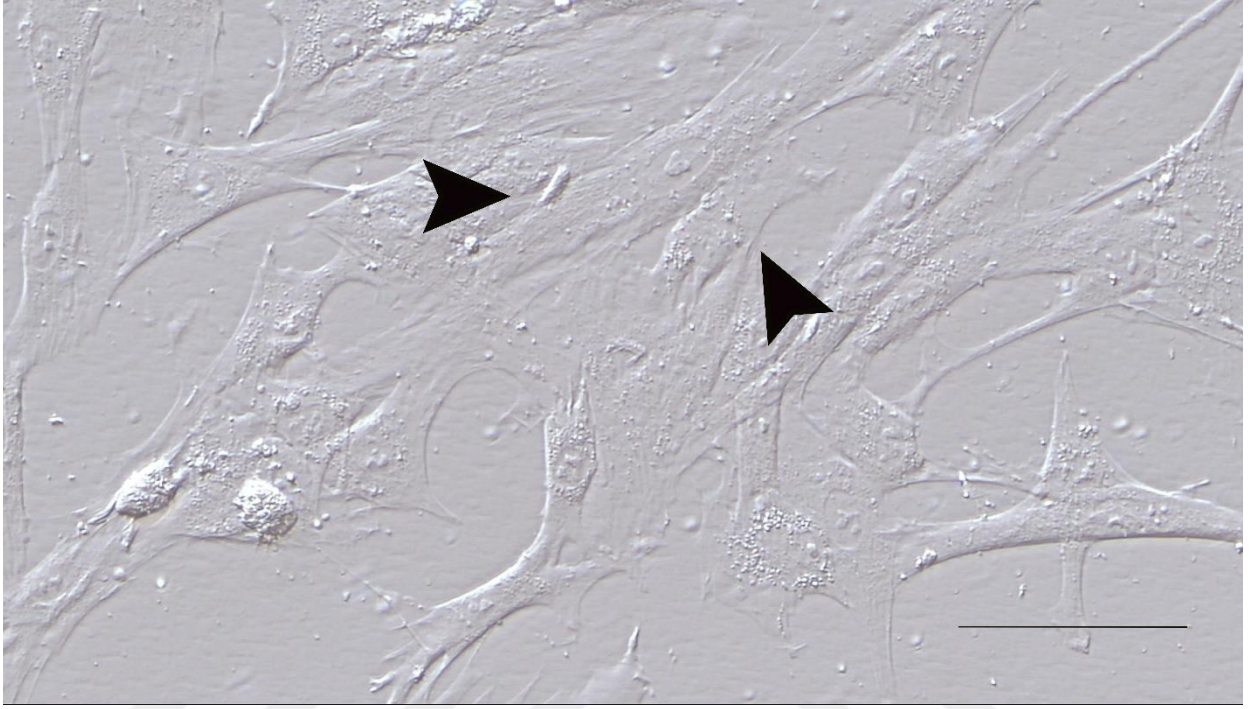
Şekil 40. Hücre kültüründe VEGFR-2 immünoflöresan boyama paneli.

Kontrol olguları EPE ve GPE gruplarından daha yoğun boyanma gösterdi. Ölçüm çubuğu: 50 μ m.

6.5. iGK-MSH karakterizasyonu

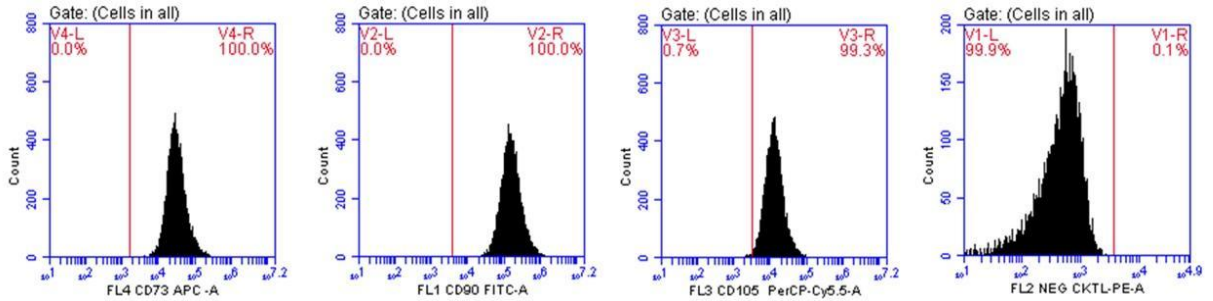
Kontrol gruplarındaki göbek kordonundan alınan doku parçalarının kültür kabına yapışmasının ardından 8-10. günlerde iğ şeklinde hücrelerin filizlenmesi ve çoğalması gözlemlendi. Hücreler ortalama 21. günde P₀'dan P₁'e geçirildi. Hücreler P₃'e ulaştığında (Şekil 41) akım sitometri yöntemiyle multipotent stroma hücrelerinin mezenkimal kök hücre belirteçlerini (CD73,

CD90 ve CD105) >%95 düzeyinde ifade ettiği, negatif belirteçleri (CD34 ve CD45) ise ifade etmediği belirlendi (Şekil 42).



Şekil 41. iGK-MSH eksplant kültürü.

İnsan göbek kordonunun eksplant kültürüyle çoğaltılan P₃ multipotent stroma hücreleri. Siyah ok başı: iGK-MSH hücreleri. Hoffman Modülasyon Kontrast Mikroskobu (Olympus; Tokyo, Japonya). 10x objektif büyütmesi. Ölçüm çubuğu 100 µm.



Şekil 42. iGK-MSH akım sitometri ölçümü.

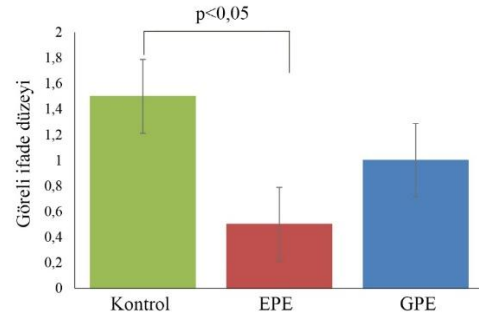
İnsan göbek kordonu multipotent stroma hücrelerinin yüzey belirteçlerinin (CD73, CD90, CD105 antikorları ve negatif) akım sitometriyle analizi.

6.6. Göbek Kordonu Stromasında VEGFR-2 Proteininin İfadesi

VEGFR-2 gen ifadesi düzeyleri, kontrol, EPE ve GPE grupları arasında karşılaştırıldı. Gen ifade düzeyleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak bağıl ifade değerleri hesaplandı. GAPDH geni referans gen olarak kullanıldı. Kontrol grubunda VEGFR-2 bağıl ifade düzeyi 1,59 olarak tespit edilirken, EPE grubunda belirgin bir azalma gözlenmiş ve ortalama ifade düzeyi 0,49 olarak bulunmuştur. GPE grubunda ise ifadesi 1,08 düzeyindedir. İstatistiksel analiz sonucunda, kontrol ile EPE grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Kontrol ile GPE grubu arasındaki fark anlamlı değildir. EPE ile GPE grubu arasındaki fark da anlamlı bulunmamıştır. Bu veriler, EPE grubunda VEGFR-2 gen ifadesinin anlamlı düzeyde baskılandığını; GPE grubunda ise ifade düzeyinin kontrol grubuna benzer olduğunu göstermektedir. **Şekil 43** gruplar arasındaki VEGFR-2 protein ifade düzeylerini göstermektedir.

Görelî Gen İfadesi (GAPDH'e göre kat artışı) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Olgu No	Kontrol	EPE	GPE
1	1,08	0,49	0,95
2	2,19	0,34	1,00
3	1,50	0,65	1,15
Ort	1,59	0,49	1,03



Şekil 43. Gruplar arası PCR ifade düzeyleri.

Kontrol olguları EPE olgularından anlamlı farklılık gösteren ifade düzeyleri gösterdi. EPE ve GPE arasında istatistiksel bir fark gelişmedi.

6.7. İn vitro Anjiyogenez

Tüm gruplarda P_3 'e ulaşmış kültür hücrelerinden elde edilen, dondurularak saklanmış ve kullanım öncesi çözölmüş ekzozomlar HUVEC hücre hattıyla 20.000 hücre/cm² olacak şekilde Matrigel® ile kaplanmış plastik petri yüzeylerinde in vitro anjiyogeneze alındı ve 18 saat süreyle izlendi. 12-14 saat aralığında anjiyogenezin maksimum düzeye ulaştığı (**Şekil 47**), daha sonra HUVEC'lerin çoğalmasıyla birlikte bu organizasyonun bozulduğu izlendi. 12-14 saatlik dilimde gruplar 5 parametreyle değerlendirilerek anjiyogenez potansiyeli ortaya kondu. Tüm gruplarda

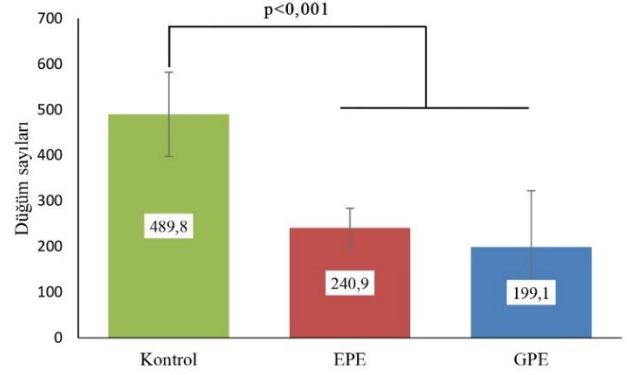
düğüm sayısı ortalaması en az 55,0, en çok ise 630,1 olarak hesaplandı. Düğüm sayısı ortalaması $293,9 \pm 155,8$ olarak bulundu.

A

Gruplar	Min	Maks	Ort $\pm$ SS
Kontrol	400,9	630,1	489,8 $\pm$ 92,3 ^a
EPE	204,7	322,2	240,9 $\pm$ 43,1 ^b
GPE	55,0	401,8	199,1 $\pm$ 123,5 ^b
Genel	55,0	630,1	293,9 $\pm$ 155,8

^{a,b}: fark gösteren gruplar

B



Şekil 44. Anjiyogenez düğüm sayıları verileri ve grafiği.

A: Kontrol grupları diğer gruplardan daha yüksek düğüm sayısı ortalaması gösterir. **B:** Kontrol olguları daha yüksek performans değerleri gösterdi, bu fark istatistiksel olarak anlamlı görüldü.

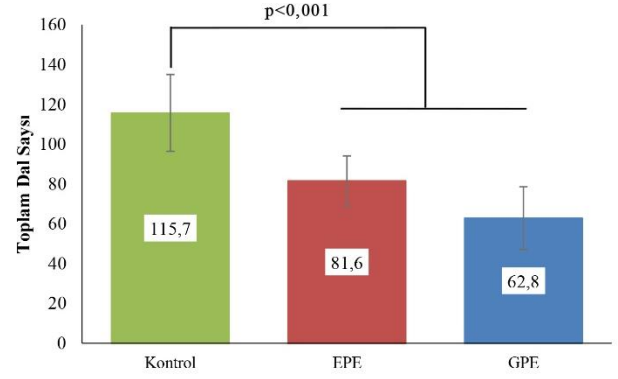
Şekil 44A'daki tabloya göre, gruplar arasında düğüm sayıları açısından en az bir grup diğerlerinden istatistiksel olarak farklı bulundu ($F=22,103$; $p<0,001$). Farklı grubu belirlemek için yapılan post-hoc ikili karşılaştırmalar sonucunda EPE ve GPE gruplarının kontrol grubundan farklı olduğu (her ikisi için de $p<0,001$), EPE ve GPE grupları arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı ($p=0,659$) belirlendi. En yüksek düğüm sayısı ortalaması kontrol grubunda, en az düğüm sayısı ortalamasının ise GPE grubunda olduğu görüldü.

Çalışma grupları arasında toplam dal sayısı ortalamalarının 31,75 ile 154,73 arasında değiştiği ve ortalamasının $83,63 \pm 26,7$ olarak belirlendi (**Şekil 45**).

A

Gruplar	Min	Maks	Ort.±SS
Kontrol	92,0	154,7	115,7 ± 19,3 ^a
EPE	66,0	105,8	81,6 ± 12,5 ^b
GPE	31,8	85,5	62,8 ± 15,8 ^b
Genel	31,75	154,73	83,63 ± 26,70

^{a,b}: fark gösteren gruplar

B

Şekil 45. Anjiyogenez dal sayısı verileri ve grafiği.

A: Gruplar arası toplam dal sayısı ortalamalarını gösteren bir tablo. **B:** Kontrol olguları daha yüksek performans değerleri gösterdi, bu fark istatistiksel olarak anlamlı görüldü.

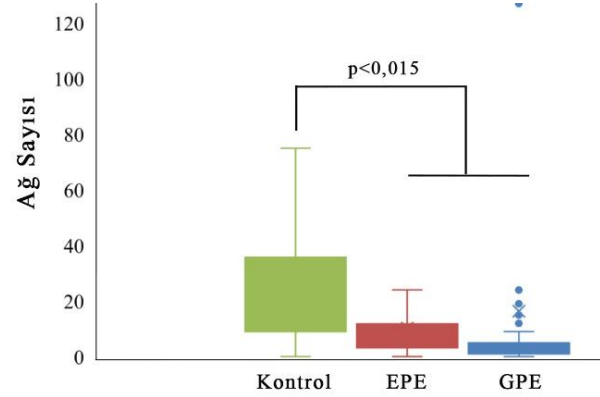
Şekil 45A'daki tabloya göre; gruplardan en az birinde toplam dal sayısı ortalaması diğerlerinden farklıydı ($F=17,067$; $p<0,001$). Farklı grubu belirlemek için yapılan post-hoc ikili karşılaştırmalar sonucunda Kontrol grubunun, EPE ve GPE gruplarından daha yüksek toplam dal sayısı ortalamasına sahip olduğu (sırasıyla $p=0,002$ ve $p<0,001$) bulundu. EPE ve GPE grupları arasında ise toplam dal sayısı ortalamalarının birbirine yakın olduğu, aralarında fark olmadığı ($p=0,066$) belirlendi.

Gruplarda ağ sayısı ortalaması en az 1,5 ve en çok 42,1 olarak belirlendi, Ağ sayısı ortancası ise 10,5 (ÇAG=20,1) şeklinde hesaplandı (**Tablo 46**).

A

Gruplar	Min	Maks	Ortanca(ÇAG)
Kontrol	18,9	42,1	24,0(I=12,7) ^a
EPE	5,3	18,7	9,6 (I=6,0) ^b
GPE	1,5	31,5	6,0 (I=27,0) ^b
Genel	1,5	42,1	10,5 (I=20,1)

^{a,b}: fark gösteren gruplar

B

Şekil 46. Anjiyogenez ağ sayıları verileri ve grafiği.

A: Gruplar arası toplam ağ sayısı ortalamalarını gösteren bir tablo. **B:** Kontrol olguları daha yüksek performans değerleri gösterdi, bu fark istatistiksel olarak anlamlı görüldü.

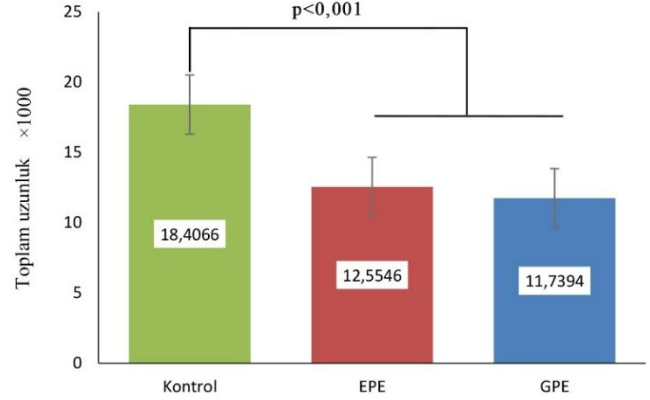
Şekil 46A'daki tabloya göre göre; deney gruplarından en az birinde ağ sayısı ortalamasının diğerlerinden farklı olduğu bulundu ($\chi^2=8,440$; $p=0,015$). Yapılan Bonferroni düzeltmeli post-hoc ikili karşılaştırmalara göre Kontrol grubunun, EPE ve GPE gruplarından yüksek ortancaya sahipti (sırasıyla $p=0,038$ ve $p=0,025$), EPE ve GPE gruplarında ise ağ sayısı ortancalarının istatistiksel olarak benzer olduğu ($p=1,000$) belirlendi.

Toplam uzunluk ortalaması deney grupları açısından incelendi. Toplam uzunluk ortalamasının 7757,0 – 22188,9 arasında değiştiği ve $13867,1 \pm 3495,6$ piksel ortalamaoya sahip olduğu hesaplandı. Deney gruplarına göre toplam uzunluk ortalamaları piksel bazında **Şekil 47**'de gösterildi.

A

Gruplar	Min	Maks	Ort±SS
Kontrol	15666,4	22188,9	18406,6 ± 2130,6 ^a
EPE	11463,0	14438,2	12554,6 ± 914,3 ^b
GPE	7757,0	15868,7	11739,4 ± 2513,8 ^b
Genel	7757,0	22188,9	13867,1 ± 3495,6

^{a,b}: fark gösteren gruplar

B

Şekil 47. Anjiyogenez toplam uzunluk ortalamaları verileri ve grafiği.

A: Gruplar arası toplam uzunluk ortalamalarını gösteren bir tablo. **B:** Kontrol olguları daha yüksek performans değerleri gösterdi, bu fark istatistiksel olarak anlamlı görüldü.

Şekil 47A'daki tablo incelendiğinde; gruplarından en az birinin toplam uzunluk ortalamasının diğerlerinden farklı olduğu ($F=23,279$; $p<0,001$) görüldü. Farklı grubu belirlemek için yapılan post-hoc ikili karşılaştırmalar sonucunda kontrol grubunun, EPE ve GPE gruplarından daha yüksek toplam uzunluk ortalamasına sahip olduğu (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,001$) hesaplandı. EPE ve GPE grupları arasında ise toplam uzunluk ortalamalarının istatistiksel olarak farksız olduğu, birbirine yakın değerler aldıkları ($p=0,701$) görüldü (**Şekil 47**).

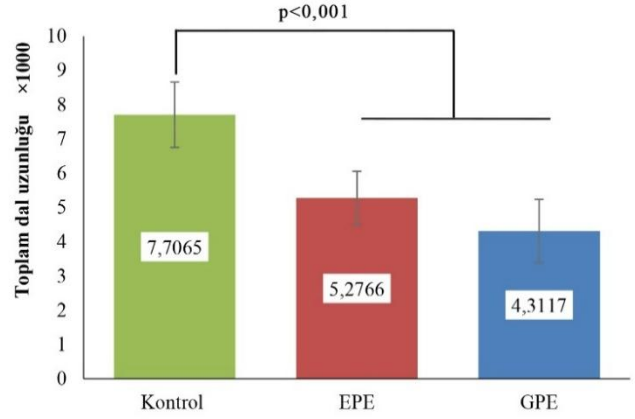
Çalışma gruplarında toplam dal uzunluğu ortalamalarının 2582,3 – 9550,6 piksel arasında değiştiği ve ortalamalarının ise $5571,0 \pm 1657,7$ piksel olduğu belirlendi. Gruplardan en az birinin toplam dal uzunluğu ortalamasının diğerlerinden farklı olduğu ($F=25,968$; $p<0,001$) görüldü (**Şekil 48**). Farklı grubu belirlemek için yapılan post-hoc ikili karşılaştırmalar sonucunda kontrol grubunun EPE ve GPE gruplarından daha yüksek toplam dal uzunluğu ortalamasına sahip olduğu (her ikisi için de $p<0,001$) bulundu. EPE ve GPE grupları arasında ise toplam dal uzunluğu ortalamalarının istatistiksel olarak farksız olduğu ($p=0,097$) görüldü.

Şekil 49 in vitro anjiyogenez deneyi sonrası elde edilen tüp oluşumuna ait görüntüleri içerir. Kontrol olguları EPE ve GPE olgularından belirgin daha iyi anjiyogenik parametre değerlerine sahiptir.

A

Gruplar	Min	Maks	Ort±SS
Kontrol	6343,7	9550,6	7706,5 ± 955,6
EPE	4010,2	6637,2	5276,6 ± 782,3
GPE	2582,3	5477,9	4311,7 ± 925,8
Genel	2582,3	9550,6	5571,0 ± 1657,7

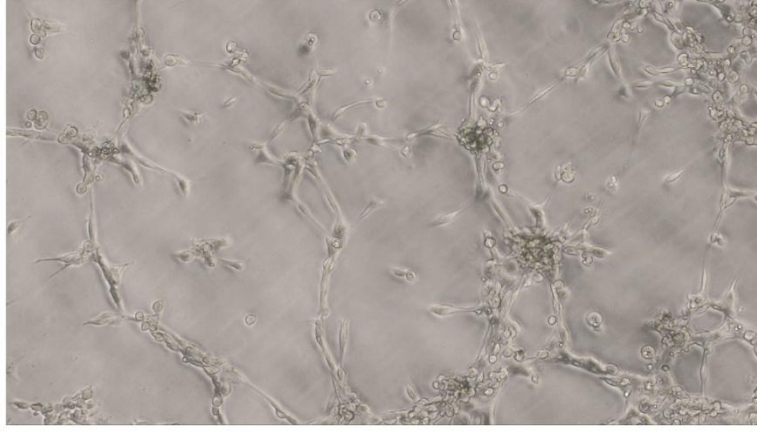
^{a,b}: fark gösteren gruplar

B

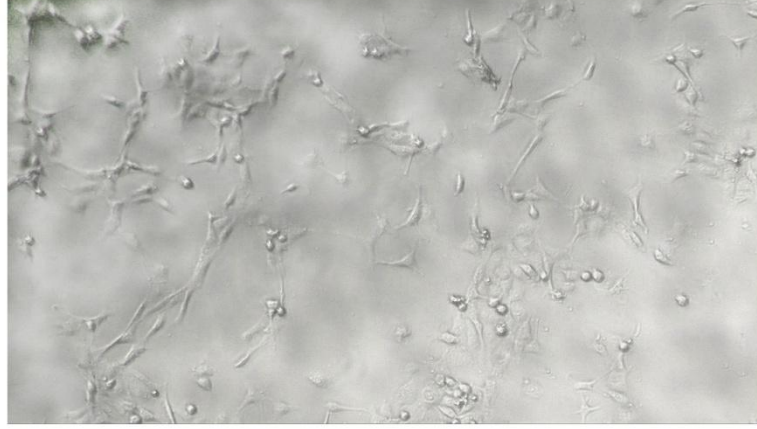
Şekil 48. Anjiyogenez toplam dal uzunluğu ortalamaları verileri ve grafiği.

A: Gruplar arası toplam dal uzunluğu ortalamalarını gösteren bir tablo. **B:** Kontrol olguları daha yüksek performans değerleri gösterdi, bu fark istatistiksel olarak anlamlı görüldü.

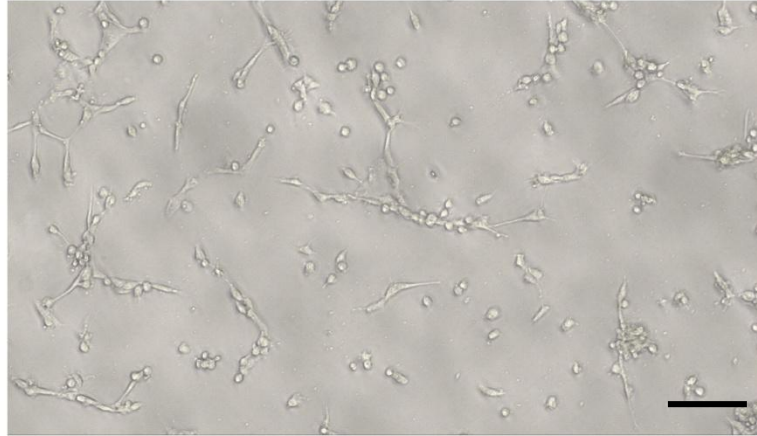
Kontrol



EPE



GPE



Şekil 49. Anjiyogenez tüp oluşum deneyi görüntüleri.

Üç grubun in vitro anjiyogenez görüntüleri. Kontrol olgularında EPE ve GPE gruplarından daha etkin anjiyogenez görülmüştür. Kontrol grubu daha belirgin yapılara sahiptir. Ölçüm çubuğu: 200 μm .

7. TARTIŞMA

7.1. Preeklampsi ve Fetal Gelişim Geriliği

Preeklampsinin farklı başlangıçlı türleri bulunur. Farklı başlangıçlı tiplerin varlığı patofizyolojideki farklılığın temelidir. Erken başlangıçlı preeklampsi daha çok plasenta kökenliyken geç başlangıçlı preeklampsi maternal kaynaklı gelişir (118). Preeklampsi etkisinin anlaşılması için preeklampsi şemsiyesi altında bulunan iki farklı tipin (EPE ve GPE) ayrı ayrı değerlendirilmesi gereklidir. Erken başlangıçlı preeklampsi IUGR ile daha sık birliktelik içerir. IUGR preeklampsiden bağımsız olarak da gerçekleşebilir. Ayrıca preeklampsi olguları gelişim geriliği gelişmeden de gerçekleşebilir. Saito ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda preeklampsinin gelişim geriliği olmadan da ilerleyebileceğini göstermiştir (157). Ayrıca Divband ve arkadaşları IUGR'nin bağımsız bir değişken olduğunu göstermiştir (158). Biz de bu bilgiler ışığında olgularımızı iki ayrı alt tipten ve IUGR etkisini dışlayarak seçtik. Bu yaklaşımla preeklampsi başlangıcının anjiyogenez üzerindeki etkisini daha etkin değerlendirmeyi hedefledik.

7.2. Anjiyogenez ve Preeklampsi

MSC hücrelerinin anjiyogenez uyarıcı ve artırıcı etkileri bilinmektedir. Divband ve arkadaşlarının göbek kordonu MSH'den elde edilen ekzozomların HUVEC üzerine verildiğinde HUVEC'in proanjiyogenik molekülleri ifade ettiğini göstermiştir (158). Bu çalışma MSH'nin endotel üzerinde in vitro anjiyogenez artırıcı etkilerini gösterir. Xiong ve arkadaşları preeklampsi modeli yaratılan olgularda desidua kökenli MSH'den elde edilen ekzozomların preeklampsi modeli yaratılan farelere enjeksiyonu sonucunda, deneklerde preeklampsi belirtilerinde azalma ve plasenta ağırlıklarında artış gözlemlenmiştir. Çalışmada, belirtilerin azaldığı dokulardan yapılan immün boyamalarda CD31+ yeni mikrovasküler damar yoğunluğunda doz bağımlı artış olduğu gözlenmiştir. Bu literatür ışığında preeklampsinin plasenta kaynaklı anjiyogenezi baskıladığı ve MSH ekzozomlarının in vivo proanjiyogenik etkilerinin varlığı eş zamanlı olarak görülür. Ancak bu bilgi erken ve geç başlangıçlı preeklampsinin anjiyogenez üzerindeki etkisini açıklamamaktadır (144).

Çalışmamızda EPE ve GPE'ye ait göbek kordonu stroma hücrelerinin endotel hücreleri üzerindeki etkisini test ettik. Preeklampsi olgularına ait göbek kordonu stromasından başarılı

şekilde ekzozom ayrıştırdık. Elde ettiğimiz ekzozomlar ile endotel hücreleri üzerinde in vitro anjiyogenez deneylerini gerçekleştirdik. Anjiyogenez üzerinde preeklampsi olgularından elde ettiğimiz ekzozomlar, kontrol olgularından elde ettiğimiz ekzozomlara göre daha zayıf etki gösterdi. Kontrol olgularıyla preeklampsi olguları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu bulgu bize preeklampsinin MSH ekzozomlarının anjiyogenik potansiyelini in vitro ortamda da etkilediğini gösterdi. Gu ve arkadaşları HUVEC üzerinde preeklampitik ekzozomlarla yaptıkları in vitro tüp oluşum deneyinde anjiyogenezin azaldığını göstermiştir (159). Bulgular çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla uyumluydu. Fakat Gu ve arkadaşları trofoblastlarla oluşturulan in vitro preeklampsi modeli üzerinden çalışılmıştır ve ekzozomlar in vitro ortamda geliştirilen preeklampsi modeli üzerinden elde edilmiştir. Ying ve arkadaşları da çalışmasında göbek kordonu kanından elde edilen ekzozomların HUVEC'in in vitro anjiyogenezini azalttığını göstermiştir (160). Her iki çalışmada preeklampsinin anjiyogenez üzerindeki etkisini anlamak açısından etkili çalışmalardır. Literatürde benzer konuyu ele alan çok az sayıda çalışma mevcuttur. Mevcut iki çalışmada da EPE ve GPE ayrımı yapılmaksızın genel preeklampitik olgular değerlendirilmiş, dolayısıyla alt gruplar arası biyolojik farklılıklar göz ardı edilmiştir. Bu çalışmalardan biri preeklampsi modelini in vitro koşullarda indükleyerek oluşturmuş, diğeri ise ekzozomları kordon kanından ayıştırmıştır. Bu durum, preeklampsi sırasında maternal-fetal etkileşimden doğrudan etkilenen stroma hücresi mikroçevresinin göz ardı edildiğini düşündürmektedir. Çalışmamızdaki ekzozomlar ise göbek kordonu stromasından ayırıştırılmış ve doğal preeklampsi seyri içinde elde edilmiştir. Bu yaklaşım, fizyolojik duruma daha yakın bir model sunması açısından önemlidir. EPE ve GPE gruplarının ayrı ayrı incelenmiş olması, çalışmamızın bir diğer özgün yönüdür. Preeklampsinin heterojen doğası göz önüne alındığında, EPE ve GPE'nin tek bir grup olarak değerlendirilmesi, kritik biyolojik farkların maskelenmesine neden olabilir. Her iki grup ortak patolojik mekanizmaları paylaşmakla birlikte, EPE genellikle plasental kökenli, GPE ise daha çok maternal endotel disfonksiyonuyla ilişkili kabul edilmektedir. Bu bağlamda, EPE olgularından elde edilen ekzozomların anjiyogenez üzerindeki etkisinin GPE'ye kıyasla biyolojik olarak daha güçlü olması dikkat çekicidir. Ancak çalışmamızda kullanılan EPE olgularında intrauterin gelişme geriliği bulunmaması ve doğum ağırlıklarının 2500 g üzerinde olması, bu grubun klasik EPE fenotipinden sapmış olabileceğini ve farklılıkların daha silik görünmesine neden olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda gözlenen anjiyogenez düşüşü, ekzozomların içerdiği proanjiyogenik faktörlerdeki azalma veya antianjiyogenik moleküllerdeki artışla ilişkili olabilir. Ekzozomların içerik farklılıklarının, stroma hücrelerinin preeklampitik mikroçevrede maruz kaldığı hipoksi,

inflamasyon ve oksidatif stres düzeyinden etkilendiği bilinmektedir (161). Ancak çalışmamızda kullanılan ekzozomlar normoksik koşullarda test edilmiş olup, bu da preeklampsiye özgü içeriklerin hücreler üzerindeki etkilerini tam olarak ortaya koymada sınırlayıcı olabilir. Ayrıca hastalardan elde edilen ekzozomların havuzlanarak kullanılması, bireyler arası biyolojik varyasyonların etkisini azaltmakla birlikte, bazı özgün molekülerin görünürlüğünü zayıflatabilir. Sonuç olarak, EPE ve GPE olgularından elde edilen ekzozomların anjiyogenezi baskılayıcı etkileri olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızda EPE grubunun IUGR içermeyen, daha hafif fenotipteki olgularla sınırlı olması, EPE ile GPE arasındaki farkın derecesini düşürmüş olabilir. Bu durum, farklı preeklampsi alt tipleri arasında ekzozom düzeyindeki olası farklılıkları saptamayı in vitro yöntemle zorlaştırmıştır. Bu noktada grupların içerisine özellikle gelişme geriliği olguları ve preeklampsi olgularıyla sadece gelişme geriliği olan olguların da eklenmesi gerekliliğini göstermiştir. Ayrıca olgulardaki heterojenitenin varlığın her ne kadar havuz işlemi yapılsa da biyolojik keskinliği azaltmış olabilir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda, gelişme geriliği olan ve olmayan EPE alt gruplarının ayrı olarak değerlendirilmesi, EPE ve GPE arasındaki farkların daha net ortaya konmasını sağlayabilir. Sonuç olarak, bu çalışma EPE ve GPE olgularından elde edilen ekzozomların anjiyogenezi baskıladığını, kontrol grubu ekzozomlarının ise anlamlı düzeyde daha yüksek anjiyogenik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Literatürde bu konuya ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunmakta olup, bu çalışmaların çoğunda preeklampsi tipleri ayrıştırılmamış ve hücre kaynakları ile modelleme yöntemleri çalışmamızdan farklılık göstermektedir. Bu bağlamda çalışmamız, hem kaynak hücre (stroma hücresi) seçimi hem de EPE-GPE ayrımı açısından literatüre özgün katkılar sunmaktadır. Gelecekte yapılacak çalışmalarda, ekzozom içeriklerinin daha ayrıntılı proteomik ve miRNA analizleri ile tanımlanması ve hipoksik koşullarda modellenmesi, preeklampsi tiplerine özgü etkilerin daha net anlaşılmasını sağlayacaktır.

7.3. Preeklampsi ve VEGFR-2

Preeklampsi, anjiyogenezi ve endotel işlevlerini olumsuz etkiler. Bu etkilerini kandaki antianjiyogenik moleküllerin düzeyini artırarak ve proanjiyogenik moleküllerin miktarını azaltarak yapar (162). Moleküllerden VEGFR-2 endotel hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilir. Preeklampitik olgularda gelişen endotel disfonksiyonu plazmadaki VEGFR ve çözünebilir VEGFR-2 seviyesindeki azalmayla ilişkili bulunmuştur. Özellikle ciddi belirtileri olan olgularda serumda VEGFR-2 seviyesini azaltan inhibitör moleküllerin varlığı belirlenmiştir. Atakul ve arkadaşları preeklampitik gebelerin kanından aldıkları serum örneklerinde VEGFR-2 seviyesini azalmış

izlemiştir. Bu moleküllerin kaynağı plasenta ve ekleridir (163). Farklı bir çalışmada İstrate ve arkadaşları koryon villuslarından alınan örneklerde preeklampitik olgularda VEGFR-2 seviyesinin azaldığını immünohistokimyasal işaretlemeyle göstermiştir (164). Bu çalışmada trofoblastlardaki ifade düzeyleri değerlendirilmiştir. Şiddetli preeklampsi olgularında Munaut ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kanda VEGFR-2 molekülünün kontrol gruplarına göre azaldığı, doğum sonrasında da serum düzeyindeki değişimin daha yavaş olduğu izlenmiştir (165). Bu çalışmada PCR ile kandaki seviyeleri değerlendirilmiştir. Almasry ve arkadaşları preeklampitik olgularda göbek kordonunda VEGFR-2 molekülünün dağılımını immünohistokimyasal olarak değerlendirmiş ve kontrol olgularında preeklampitik olgulara göre daha yoğun ifade düzeyi görülmüştür (166). Tüm bu literatür ışığında VEGFR-2'nin preeklampsiyle ilgili anjiyogenez çalışmalarında düzeyi belirgin değişen bir molekül olduğu görülür.

MSH, embriyon dışı mezodermin göçüyle gelişen göbek kordonu stromasını oluşturur, bu nedenle embriyon içi proanjiyogenik etkileri bulunur (167). Chen (168), Komaki (169) çalışmalarında MSH'den salgılanan ekzozomların in vitro ve in vivo proanjiyogenik etkileri olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar MSH'nin doğum sonrası da proanjiyogenik özellikleri gösterdiğini kanıtlar niteliktedir. Ayrıca MSH göbek kordonunda stromanın farklı bölgelerinde farklı özellikler gösterir. Literatürde bu konuya ilişkin yapılan en kapsamlı çalışmalar Karahüseyinoğlu (170), Subramanian (171), Blanco (24) tarafından gerçekleştirilmiştir. Blanco göbek kordonundaki hücreleri immünohistokimyasal olarak incelemiştir. Subramanian ise Wharton jölesi (WJ) hücreleri, perivasküler stroma ve subamniyotik stromasından ayırtırdıkları MSH'den in vitro hücre kültürü yapmış ve hücrelerin çoğalma, farklanma, canlılık gibi özelliklerini değerlendirmiştir (171). Blanco'nun çalışmasında bölgelerin histolojik ve histokimyasal olarak farklı özellikler gösterdikleri ve Subramanian'ın çalışmasında ise WJ'den ayırtırılan hücrelerin en yetkin kültür özelliklerine sahip olarak izlenmiştir. Preeklampitik olgularda yapılan kültür çalışmalarından birinde Wang ve arkadaşları (142) hücrenin çoğalma kapasitesini değiştiren obstetrik süreçleri incelemiştir. Preeklampsinin bunu olumsuz etkileyebildiği sonucuna varılmıştır. Sağlıklı kontrollerde daha iyi genişleme kapasitesi bulunmuştur.

Biz çalışmamızda preeklampside anjiyogenik etkisinin azalmış olduğunu gördüğümüz göbek kordonu MSH'deki VEGFR-2 ifadesini değerlendirdik. Hücre kültüründe izlediğimiz olguları ve olgulardan elde ettiğimiz göbek kordonlarını başarılı şekilde VEGFR-2 ile immünoflöresan işaretleme gerçekleştirdik ve göbek kordonu stromasında bulunan MSH'ye odaklandık. Hücre

kültüründe de göbek kordonu MSH'yi değerlendirdik. Literatürde göbek kordonu MSH'nin içerdiği bölgesel farklılığı göz önünde bulundurarak yaptığımız işaretlemeleri göbek kordonu stromasına ait SAS, IVS ve PVS bölgelerinde gerçekleştirdik. Hücresel yoğunluğu dikkate alarak toplam etkinin yanıltıcı olmaması için ölçüm ve değerlendirmelerimizi hücre düzeyinde gerçekleştirdik. Literatürdeki yarı nicel değerlendirmelerin (166) kısıtlılığını aşabilmek için ölçümlerizi nicel temellere dayandırdık. Ekzozom etkinliğin yanı sıra, stroma hücrelerinde VEGFR-2 düzeyinin farklılaştığı hipotezinden yola çıkarak yapılan immünofloresan işaretlemeler, anatomik bölgelere göre sınırlı farklılık gösterdi. Ölçümler sonucunda olgularda SAS bölgesindeki sinyal yoğunluğunu IVS ve PVS bölgelerinden zayıf izledik. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. IVS ve PVS arasında ise fark anlamlı değildi. Göbek kordonundaki stroma bileşenlerinin keskin sınırlarla ayrılmıyor olması, maruz kaldıkları mikroçevrenin benzerliği bu farkın oluşmasında etkili olmuş olabilir. Ayrıca bu hücre gruplarının bölge ayrımındaki belirsizlikler sonucu etkilemiş olabilir. Literatürde PVS ve IVS hücrelerinin farklanma düzeyinin SAS'ye göre yüksek olması bu sonucun alınmasında etkili olmuş olabilir. PVS ve IVS bölgesindeki hücreler daha yüksek düzeyde endotele farklanma yetkinliğine sahiptir (2, 23). Subamniyotik alanın kordonun daha periferinde yer alması, farklanmada daha immatür olması, hücrelerin zayıf sinyal vermesinde etkili olmuş olabilir (22). Ölçümlerimizde preeklamps tipleri ve kontrol grupları arasında belirgin fark gözlenmemiştir. Bu durum, VEGFR-2 protein düzeyinin translasyon sonrası düzenlemelerle korunmuş olabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan, nicel PCR sonuçları, preeklamps grubunda VEGFR-2 mRNA düzeyinin belirgin şekilde azaldığını ortaya koymuştur. Bu sonuç, stroma hücrelerinin gen düzeyinde anjiyogenez kapasitesinde bir azalmayı desteklemektedir. Andraweera ve arkadaşları preeklamptik plasentada VEGFR-2 mRNA düzeyinde kontrollere göre azalma izlemiştir (172). Bulgularımız Andraweera ve arkadaşlarının preeklamptik plasenta dokusundaki PCR verileriyle uyumludur. Bu da protein ifade düzeyinin preeklamps tarafından baskılandığını düşündürmektedir. Fakat PCR ile gösterdiğimiz bu düşüşü, immünofloresan işaretlemelerde görmedik. Stromanın boyanması göbek kordonundaki VEGFR-2 ifadesinin sadece bir parçasını oluşturur. Kordonlar arasındaki sinyal farkını oluşturan damar ve amniyon epitelinin ifade ettiği VEGFR-2 sinyal seviyesi olabilir. Çalışmamız bu açıdan sadece stromaya odaklanmıştır. Bir diğer neden olgu sayısı olabilir. Fakat olgulardaki hücrelerin sitoplazmalarından yapılan ölçümlerle bu açık giderilmeye çalışılmış ve daha net ve etkin bir sonuç elde edilmeye çalışılmıştır. Bu bulgulara göre subamniyotik stromadaki sinyal ifade düzeyindeki farklılık net olarak ortaya koyulabilmiştir. Bu da bölgeler arasında belirgin farkın varlığını ortaya

koyar. Nicel ölçüm tekniği kullanmamıza rağmen immüno Floresan yine de sınırlı nicel kapasiteye sahiptir. Bu da bize VEGFR-2 molekülünün varlığını ortaya koymuştu, fakat ifade düzeyindeki değişiklikler proteinin post translasyonel baskılandığını düşündürmektedir. Escudero ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada VEGFR-2'nin bazı alt bölgelerinde tirozin fosforilasyonunda artış bazı alt tiplerinde azalma izlemiştir (173). Bulgularımızla bu sonuç tutarlılık gösterir.

Gerçekleştirdiğimiz hücre kültürü sinyal ölçümleriyle sonucunda kontrol olgularını sinyal değerlerini, EPE ve GPE olgularından daha güçlü izledik. Kontrol olgularıyla preeklampsisi olguları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu anjiyogenez sonuçlarımızla tutarlılık gösterdi. İn vitro hücre kültür ortamı anjiyogenez sonuçlarına yansımış olabilir. Bu paralellik, VEGFR-2'nin hem hücre içi hem de hücre dışı iletişim ağlarında merkezi bir düzenleyici olduğunu desteklemektedir.

İmmün işaretlemelerimizde VEGFR-2 molekülünü sitoplazmada çekirdek çevresinde yoğunlaşmış ve sitoplazmada dağılmış noktasal olarak gözlemledik. Bu da bize VEGFR-2'nin stroma hücrelerinde bazal düzeyde sentez sürecinin devam ediyor olduğunu düşündürdü. Literatürde VEGFR-2'nin bir kısmının sitoplazmada görüldüğü endozomal yolla ifade edildiği gözlemlenmiştir (174). Bu bakımdan çekirdek çevresi ve Golgi kompleksi çevresindeki sinyal pozitifliği literatürle uyumluydu. Melincovici ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada VEGFR-2'nin endotel dışında da ifade edildiğini göstermiştir (99). Bu bakımdan stroma hücrelerinde gözlemlediğimiz sinyaller Melincovici'nin çalışmasıyla uyumludur. Ekzozomlar, sadece protein değil, aynı zamanda miRNA, lipopeptid ve çözünür reseptörler gibi birçok düzenleyici molekül taşımaktadır. Preeklampside bu içeriklerin antianjiyogenik yönde değiştiği bilinmektedir. Ancak bu değişim, her zaman stroma hücre ifadesiyle birebir örtüşmeyebilir. Literatürde in vitro ortamda kültür hücrelerinde farklı başlangıçlı preeklampsisi olgularını içeren bazal düzeyde VEGFR-2 sinyalinin ölçüldüğü bir çalışmaya rastlamadık. Bu açıdan çalışmamız bir ilk değer taşımaktadır.

7.4. Göbek Kordonu Kesitlerindeki Histomorfometrik Sonuçlar

Literatürde preeklampsinin göbek kordonu yapısını etkilediğine yönelik çalışmalar bulunur. Yapılan ölçümler daha çok arter lümen alanı ve duvar alanı, ven lümen alanı ve duvar alanı üzerinde yoğunlaşmıştır. Wharton jölesi üzerine yapılan ölçümler kısıtlıdır. Damarlara ilişkin ölçümler yapılan çalışmalarda farklılık içerir. Bazı çalışmalarda arter lümen alanı küçülmüş olarak

izlenmiştir. Thomas'ın yaptığı çalışmada lümen alanlarını kontrol gruplarına göre azalmıştır (175). Yine benzer şekilde Almasry (102) ve Chillakuru (176) da yaptıkları çalışmalarda arter lümen alanlarını kontrol gruplarına göre azalmış olarak ölçmüştür. Bu sonuçlar seçilen olgulardaki şiddetli preeklampsinin yanında var olan IUGR nedeniyle gelişmiş olabilir. Ayrıca Barnwal, Thomas ve Almasry'nin çalışmalarında olguların başlangıç zamanı ve hastalık şiddeti göz ardı edilmiştir. Öte yandan Chillakuru hastalığın şiddetini dikkate alarak bir çalışma tasarlamıştır. Chillakuru'nun çalışmasında da IUGR dikkate alınmamış; bu da sonuçları doğrudan etkilemiş olabilir. Biz de çalışmamızda arter lümeninin alanına yönelik ölçümler gerçekleştirdik. Ölçümlerimizde arter lümen alanını EPE ve GPE olgularında genişlemiş olarak bulduk. Arter lümen alanındaki artış hipertansiyonun büyük damarlardaki etkisine bağlı gelişmiş olabilir. Ayrıca lümen alanları farklı olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu da yapısal değişikliklerin moleküler değişikliklere göre daha yavaş ortaya çıkabileceğini, olgulardaki şiddetli preeklampsinin dışlanması da arterlerde istenilen düzeyde etkinin görülmesini engellemiş olabileceğini düşündürdü. Sonuçlarımız Herzog (177) ve Blanco'nun (178) çalışmalarıyla uyumludur. Bu araştırmacılar da çalışmamızla uyumlu olarak IUGR'yi çalışmalarında dikkate almıştır. Ayrıca Almasry ve Thomas'ın çalışmalarında da IUGR'nin muhtemel etkisine bağlı sonuçlar elde edilmiş olabilir. Sharony ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada duvar alanlarında gruplar arasında farkın olmadığını bulmuştur (179). Bu çalışmada IUGR dikkate alınmıştır.

Arter duvar alanına yönelik yapılan ölçülerde Almasry (166), Blanco (178) ve Barnwal duvar alanını preeklampsi gruplarında artmış olarak izlemiştir. Bu durum, preeklampsinin yarattığı endotel disfonksiyonuna bağlı olarak gelişen duvar ödeminden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca kas tabakasındaki hücrelerin intimaya göçüne bağlı gelişen intima kalınlaşması ve hipoksiye bağlı oluşan artan damar direnci bu sonucun ortaya çıkmasına neden olmuş olabilir. Özellikle yine arter lümen alanındaki gibi olguların seçimindeki yaklaşım da bu sonuçların oluşumunda etkili olmuş olabilir. Yine tespitimizle uyumlu olarak Thomas, İnan (180) ve Chillakuru'nun yaptığı çalışmalarda arter duvar alanı azalmış olarak bulunmuştur. Chillakuru'nun çalışmasında hastalık şiddetinin fark yaratmış olması olasıdır.

Literatürde ven duvar alanı ve lümen alanlarında yapılan çalışmalarda arterlerdeki gibi farklı sonuçlar elde edilmiştir. Venlerdeki değişim bazı çalışmalarda arterlerdeki kadar belirgin değildir. Örn: Thomas(181) ve Almasry'nin (166) çalışmalarında ven lümen alanı değişiklik göstermemiştir. Bunda preklampsinin ven duvarındaki kompensatuvar kontraktıl yetkinliğinin arterler kadar etkili

olmaması ve arterlerdeki gibi kas tabakasının belirgin etkilenmemesi etkili olmuş olabilir. Sharony ve Herzog'un (182) çalışmalarında ven lümen alanı etkilenmiş görünmektedir. Bunda olgu seçimlerinde yapılan farklılıklar ve yine benzer şekilde IUGR etkisinin dışlanması etkili olmuş olabilir.

Çalışmamızda literatürdekinden farklı olarak arter lümen indeksini hesapladık. Bu sayede stroma ödemeine bağlı değişen damar lümenini daha sağlıklı değerlendirebildik. Çalışmamızda arter lümen indeksini EPE ve GPE gruplarında kontrol gruplarına göre artmış bulduk. Her iki grup olgularda da bu durumun varlığı, hipertansiyona bağlı lümen alanlarında genişlemeye işaret ediyor olabilir. Bu bulgu hipertansiyonun büyük damarlar üzerindeki etkisinin gösterildiği literatür ile uyumludur (183). Duvar kalınlığında artışın gelişmemesi bulgularda damar duvarı ödemi dışlamıştır. Ek olarak hipertansiyona bağlı bir genişleme varsa preeklampsiye bağlı duvar incelmesiyle kompanse olan duvar alanı gruplar arasındaki farkın anlamlı çıkmamasına neden olmuş olabilir. Ödemin yokluğu olgularda şiddetli kliniğin var olmamasıyla açıklanabilir. Ayrıca bulgularımızda stroma alanı ölçümlerinde gruplar arası fark gözlemlenemedi. Bu durum damarlar üzerindeki baskının önüne geçmiş ve lümenin olağandan düşük görünmesini engellemiş olabilir.

Wharton jölesine yönelik literatürde yapılan ölçümler kısıtlılık içerir. Yapılan ölçümlerde Wharton jölesinin yani stromanın büyüklüğüne ilişkin farklı sonuçlar bulunur. Örn. Thomas ve arkadaşları (181) yapmış olduğu çalışmada stroma alanını artmış olarak izlenmiştir. Bu çalışmada bu artışın muhtemel nedeni stroma ödemi olarak gösterilmiştir. Fakat stroma ödeminin tespitine ilişkin bir ek yöntem tanımlanmamıştır. Birkaç çalışmada ise stroma alanı azalmış olarak izlenmiştir. Bundaki muhtemel neden şiddetli preeklampsiye bağlı göbek kordonu yüzey alanındaki azalmadır. Biz de yapmış olduğumuz ölçümlerde stroma alanında gruplar arasında bir farklılık gözlemlenemedi. Bunda gruplarımızda IUGR olmaması ve stroma ödeminin belirgin olarak bulunmaması etkili olmuş olabilir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada preeklampsinin varlığının iGK-MSH'ın anjiyogenik potansiyelini değiştirip değiştirmediğini VEGFR-2 reseptörü üzerinden ve iGK-MSH ekzozomlarının tüp oluşturma performansını değiştirip değiştirmediğini in vitro tüp oluşumu üzerinden değerlendirmeyi hedefledik. Elde ettiğimiz bulgular i) göbek kordonunun farklı bölgelerindeki iGK-MSH'ler farklı anjiyogenik potansiyele sahiptir. Preeklampsi başlangıç zamanından bağımsız olarak SAS'ın VEGFR-2 ifadesi daha zayıftır. ii) kontrol, EPE ve GPE arasında in vivo VEGFR-2 ifadesinde aynı bölgeler karşılaştırıldığında sayısal fark gözlense de istatistiksel olarak anlamlılık gelişmemiştir. iii) in vitro koşullarda hücrelerde VEGFR-2 ifadesi kontrol gruplarında preeklampsi gruplarından daha yüksektir. iv) in vitro koşullarda kontrol olgularının ekzozomları preeklampsi gruplarından daha fazla tüp oluşturma kapasitesine sahiptir. Bu bulgular ışığında “Preeklampsi iGK-MSH'nin anjiyogenik performansını etkiler” H_1 hipotezi doğrulanmış; “Preeklampsi iGK-MSH ekzozomlarının anjiyogenik performansını etkilemez” H_0 yokluk hipotezi dışlanmıştır.

Halen preeklampitik MSH'den elde edilen ekzozomların içeriği ve etkilerinin hangi molekül veya moleküllerden kaynaklandığı literatürde belirsizliğini korumakta ve aydınlatılmayı beklemektedir. Erken başlangıçlı preeklampsi ve IUGR ilişkisinin ekzozom düzeyinde test edildiği deney tasarımlarına ihtiyaç vardır. Farklı başlangıçlı preeklampsiden elde edilen ekzozomların in vivo deney tasarımlarında kullanılarak anjiyogenezi doku düzeyinde nasıl etkilediğinin gösterilmesi gerekmektedir. Bu açıdan mevcut literatür bu çalışmalardan eksiktir.

9. KAYNAKÇA

1. De Oliveira L, Peracoli JC, Peracoli MT, Korkes H, Zampieri G, Moron AF, et al. sFlt-1/PlGF ratio as a prognostic marker of adverse outcomes in women with early-onset preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2013;3(3):191-5.
2. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells.* 2007;25(11):2886-95.
3. Sadler TW, Sadler-Redmond SL, Tosney K, Byrne J, Imseis H. *Langman's Medical Embryology.* Fourteenth edition ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Philadelphia; 2019.
4. Carlson BM PNK. *Human Embryology and Developmental Biology* 6ed. St Louis, Missouri: Elsevier; 2019.
5. Di Naro E, Ghezzi F, Raio L, Franchi M, D'Addario V. Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001;96(2):150-7.
6. Miki T. Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells. *Am J Reprod Immunol.* 2018;80(4):e13003.
7. Manuel Barrios Arpi L. *Histology of Umbilical Cord in Mammals.* Histology. 2018.
8. Moore KL, Agur AMR, Dalley AF. *Clinically oriented anatomy.* Eighth edition. International edition ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018.
9. Helske S, Vuorela P, Carpen O, Hornig C, Weich H, Halmesmaki E. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. *Mol Hum Reprod.* 2001;7(2):205-10.
10. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells. *Stem Cells.* 2007;25(11):2886-95.
11. Peng J, Rochow N, Dabaghi M, Bozanovic R, Jansen J, Predescu D, et al. Postnatal dilatation of umbilical cord vessels and its impact on wall integrity: Prerequisite for the artificial placenta. *Int J Artif Organs.* 2018;41(7):393-9.
12. Liu Z, Ruan J. The role of the absence of Hyrtl's anastomosis in monochorionic pregnancy: Friend or foe?: A case report. *Medicine (Baltimore).* 2023;102(18):e33611.
13. Davies JE, Walker JT, Keating A. Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(7):1620-30.
14. Sobolewski K, Bańkowski E, Chyczewski L, Jaworski S. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly. *Biol Neonate.* 1997;71(1):11-21.

15. Stefanska K, Ozegowska K, Hutchings G, Popis M, Moncrieff L, Dompe C, et al. Human Wharton's Jelly-Cellular Specificity, Stemness Potency, Animal Models, and Current Application in Human Clinical Trials. *J Clin Med*. 2020;9(4).
16. Chi DS, Fitzgerald SM, Krishnaswamy G. Mast cell histamine and cytokine assays. *Methods Mol Biol*. 2006;315:203-15.
17. Engberg Damsgaard TM, Windelborg Nielsen B, Sorensen FB, Henriques U, Schiotz PO. Estimation of the total number of mast cells in the human umbilical cord. A methodological study. *APMIS*. 1992;100(9):845-50.
18. Takechi K, Kuwabara Y, Mizuno M. Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta*. 1993;14(2):235-45.
19. Corrao S, La Rocca G, Lo Iacono M, Corsello T, Farina F, Anzalone R. Umbilical cord revisited: from Wharton's jelly myofibroblasts to mesenchymal stem cells. *Histol Histopathol*. 2013;28(10):1235-44.
20. Angelucci S, Marchisio M, Di Giuseppe F, Pierdomenico L, Sulpizio M, Eleuterio E, et al. Proteome analysis of human Wharton's jelly cells during in vitro expansion. *Proteome Sci*. 2010;8:18.
21. Kim D-W, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang S-D, Borlongan CV. Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(6):11692-712.
22. Nanaev AK, Kohnen G, Milovanov AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta*. 1997;18(1):53-64.
23. Davies JE, Walker JT, Keating A. Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(7):1620-30.
24. Blanco-Elices C, Chato-Astrain J, Gonzalez-Gonzalez A, Sanchez-Porras D, Carriel V, Fernandez-Valades R, et al. Histological Profiling of the Human Umbilical Cord: A Potential Alternative Cell Source in Tissue Engineering. *J Pers Med*. 2022;12(4).
25. Walker JT, Keating A, Davies JE. Stem Cells: Umbilical Cord/Wharton's Jelly Derived. In: Gimble JM, Marolt D, Oreffo R, Redl H, Wolbank S, editors. *Cell Engineering and Regeneration*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 1-28.
26. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966;16(3):381-90.
27. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17(4):331-40.
28. Miclau K, Hambright WS, Huard J, Stoddart MJ, Bahney CS. Cellular expansion of MSCs: Shifting the regenerative potential. *Aging Cell*. 2023;22(1):e13759.

29. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50.
30. Murray IR, West CC, Hardy WR, James AW, Park TS, Nguyen A, et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(8):1353-74.
31. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(17):3323-48.
32. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5.
33. Lavrentieva A, Hatlapatka T, Neumann A, Weyand B, Kasper C. Potential for Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of MSC. In: Weyand B, Dominici M, Hass R, Jacobs R, Kasper C, editors. *Mesenchymal Stem Cells - Basics and Clinical Application I.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 73-88.
34. Maleki M, Ghanbarvand F, Reza Behvarz M, Ejtemaei M, Ghadirkhomi E. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int J Stem Cells.* 2014;7(2):118-26.
35. Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant.* 2015;24(3):339-47.
36. Jovic D, Yu Y, Wang D, Wang K, Li H, Xu F, et al. A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy. *Stem Cell Rev Rep.* 2022;18(5):1525-45.
37. Yu H-R, Huang H-C, Chen I-L, Li S-C. Exosomes Secreted by Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote the Ability of Cell Proliferation and Migration for Keratinocyte. *International Journal of Molecular Sciences.* 2024;25(9):4758.
38. Bongso A, Fong CY. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell Rev Rep.* 2013;9(2):226-40.
39. Xie Q, Liu R, Jiang J, Peng J, Yang C, Zhang W, et al. What is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):519.
40. Tan L, Liu X, Dou H, Hou Y. Characteristics and regulation of mesenchymal stem cell plasticity by the microenvironment - specific factors involved in the regulation of MSC plasticity. *Genes Dis.* 2022;9(2):296-309.
41. Lindsay SL, Barnett SC. Therapeutic Potential of Niche-Specific Mesenchymal Stromal Cells for Spinal Cord Injury Repair. *Cells.* 2021;10(4):901.
42. Garcia-Munoz E, Vives J. Towards the standardization of methods of tissue processing for the isolation of mesenchymal stromal cells for clinical use. *Cytotechnology.* 2021;73(3):513-22.

43. Zhou T, Yuan Z, Weng J, Pei D, Du X, He C, et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *Journal of Hematology & Oncology*. 2021;14(1):24.
44. Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, et al. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med*. 2006;18(6):1089-96.
45. Han YF, Tao R, Sun TJ, Chai JK, Xu G, Liu J. Optimization of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and culture methods. *Cytotechnology*. 2013;65(5):819-27.
46. Piwocka O, Musielak M, Ampula K, Piotrowski I, Adamczyk B, Fundowicz M, et al. Navigating challenges: optimising methods for primary cell culture isolation. *Cancer Cell Int*. 2024;24(1):28.
47. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-301.
48. Musial-Wysocka A, Kot M, Majka M. The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. *Cell Transplant*. 2019;28(7):801-12.
49. Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(9):1738-55.
50. Xie Q, Liu R, Jiang J, Peng J, Yang C, Zhang W, et al. What is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1):519.
51. Baldari S, Di Rocco G, Piccoli M, Pozzobon M, Muraca M, Toietta G. Challenges and Strategies for Improving the Regenerative Effects of Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10).
52. Chen S, Liang B, Xu J. Unveiling heterogeneity in MSCs: exploring marker-based strategies for defining MSC subpopulations. *J Transl Med*. 2024;22(1):459.
53. Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(9):1738-55.
54. Harding C, Stahl P. Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;113(2):650-8.
55. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983;33(3):967-78.
56. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci*. 2019;9:19.

57. Tschuschke M, Kocherova I, Bryja A, Mozdziak P, Angelova Volponi A, Janowicz K, et al. Inclusion Biogenesis, Methods of Isolation and Clinical Application of Human Cellular Exosomes. *J Clin Med*. 2020;9(2).
58. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling*. 2021;19(1):47.
59. Sonbhadra S, Mehak, Pandey LM. Biogenesis, Isolation, and Detection of Exosomes and Their Potential in Therapeutics and Diagnostics. *Biosensors (Basel)*. 2023;13(8).
60. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478).
61. Yellon DM, Davidson SM. Exosomes: nanoparticles involved in cardioprotection? *Circ Res*. 2014;114(2):325-32.
62. Skotland T, Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J Lipid Res*. 2019;60(1):9-18.
63. Ghadami S, Dellinger K. The lipid composition of extracellular vesicles: applications in diagnostics and therapeutic delivery. *Front Mol Biosci*. 2023;10:1198044.
64. Keller S, Ridinger J, Rupp AK, Janssen JW, Altevogt P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med*. 2011;9:86.
65. Yokoi A, Ochiya T. Exosomes and extracellular vesicles: Rethinking the essential values in cancer biology. *Semin Cancer Biol*. 2021;74:79-91.
66. Głuszko A, Szczepański MJ, Ludwig N, Mirza SM, Olejars W. Exosomes in Cancer: Circulating Immune-Related Biomarkers. *BioMed Research International*. 2019;2019(1):1628029.
67. Olejars W, Kubiak-Tomaszewska G, Chrzanowska A, Lorenc T. Exosomes in Angiogenesis and Anti-angiogenic Therapy in Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(16):5840.
68. Shi H, Yang Z, Cui J, Tao H, Ma R, Zhao Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: a promising alternative in the therapy of preeclampsia. *Stem Cell Res Ther*. 2024;15(1):30.
69. Zheng Q, Zhang S, Guo WZ, Li XK. The Unique Immunomodulatory Properties of MSC-Derived Exosomes in Organ Transplantation. *Front Immunol*. 2021;12:659621.
70. Rezaie J, Feghhi M, Etemadi T. A review on exosomes application in clinical trials: perspective, questions, and challenges. *Cell Commun Signal*. 2022;20(1):145.
71. Yang D, Zhang W, Zhang H, Zhang F, Chen L, Ma L, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*. 2020;10(8):3684-707.

72. Liu WZ, Ma ZJ, Kang XW. Current status and outlook of advances in exosome isolation. *Anal Bioanal Chem.* 2022;414(24):7123-41.
73. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed Research International.* 2018;2018.
74. Yakubovich EI, Polischouk AG, Evtushenko VI. Principles and Problems of Exosome Isolation from Biological Fluids. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol.* 2022;16(2):115-26.
75. Zhang Y, Bi J, Huang J, Tang Y, Du S, Li P. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:6917-34.
76. Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CS, Wiegmanns AP, Leimgruber A, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:27031.
77. Akuma P, Okagu OD, Udenigwe CC. Naturally Occurring Exosome Vesicles as Potential Delivery Vehicle for Bioactive Compounds. *Front Sustain Food S.* 2019;3.
78. Lai JJ, Chau ZL, Chen SY, Hill JJ, Korpany KV, Liang NW, et al. Exosome Processing and Characterization Approaches for Research and Technology Development. *Adv Sci (Weinh).* 2022;9(15):e2103222.
79. Shukla S, Currim F, Singh R. Do different exosome biogenesis pathways and selective cargo enrichment contribute to exosomal heterogeneity? *Biol Cell.* 2023;115(7):e2200116.
80. Dilsiz N. A comprehensive review on recent advances in exosome isolation and characterization: Toward clinical applications. *Transl Oncol.* 2024;50:102121.
81. Diaz G, Bridges C, Lucas M, Cheng Y, Schorey JS, Dobos KM, et al. Protein Digestion, Ultrafiltration, and Size Exclusion Chromatography to Optimize the Isolation of Exosomes from Human Blood Plasma and Serum. *Jove-J Vis Exp.* 2018(134).
82. Filipovic L, Spasojevic M, Prodanovic R, Korac A, Matijasevic S, Brajuskovic G, et al. Affinity-based isolation of extracellular vesicles by means of single-domain antibodies bound to macroporous methacrylate-based copolymer. *N Biotechnol.* 2022;69:36-48.
83. Niu Z, Pang RTK, Liu W, Li Q, Cheng R, Yeung WSB. Polymer-based precipitation preserves biological activities of extracellular vesicles from an endometrial cell line. *PLoS One.* 2017;12(10):e0186534.
84. Ribatti D, Vacca A, Dammacco F. The role of the vascular phase in solid tumor growth: a historical review. *Neoplasia.* 1999;1(4):293-302.
85. Natale G, Bocci G, Lenzi P. Looking for the Word "Angiogenesis" in the History of Health Sciences: From Ancient Times to the First Decades of the Twentieth Century. *World J Surg.* 2017;41(6):1625-34.

86. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285(21):1182-6.
87. Ali Z, Khaliq S, Zaki S, Ahmad HU, Lone KP. Altered expression of vascular endothelial growth factor, vascular endothelial growth factor receptor-1, vascular endothelial growth factor receptor-2, and Soluble Fms-like Tyrosine Kinase-1 in peripheral blood mononuclear cells from normal and preeclamptic pregnancies. *Chin J Physiol.* 2019;62(3):117-22.
88. Moore KL, Agur AMR, Dalley AF. Clinically oriented anatomy. Eighth edition. International edition ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018.
89. Redfern A, Agarwal V, Thompson EW. Hypoxia as a signal for prison breakout in cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care.* 2019;22(4):250-63.
90. Kumar V AA, Aster JC Robbins Basic Pathology 10 ed. Philedelphia, Pennsylvania: Elsevier; 2018.
91. Montemagno C, Pages G. Resistance to Anti-angiogenic Therapies: A Mechanism Depending on the Time of Exposure to the Drugs. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:584.
92. Yurchenco PD. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(2).
93. Topfer U. Basement membrane dynamics and mechanics in tissue morphogenesis. *Biol Open.* 2023;12(8).
94. Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells.* 2020;9(5).
95. Isenberg BC, Wong JY. Building structure into engineered tissues. *Mater Today.* 2006;9(12):54-60.
96. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161(2):851-8.
97. JH H. VEGF and cancer New York, N.Y 2004.
98. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer.* 2011;2(12):1097-105.
99. Melincovici CS, Bosca AB, Susman S, Marginean M, Miha C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(2):455-67.
100. Facemire CS, Nixon AB, Griffiths R, Hurwitz H, Coffman TM. Vascular endothelial growth factor receptor 2 controls blood pressure by regulating nitric oxide synthase expression. *Hypertension.* 2009;54(3):652-8.

101. Kang DH, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschki D, et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(3):806-16.
102. Almasry SM, Elfayomy AK, Hashem HE. Ultrastructure and histomorphometric analysis of human umbilical cord vessels in preeclampsia: a potential role of VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2. *Rom J Morphol Embryol*. 2016;57(2 Suppl):681-9.
103. Meissner M, Doll M, Hrgovic I, Reichenbach G, Konig V, Hailemariam-Jahn T, et al. Suppression of VEGFR2 expression in human endothelial cells by dimethylfumarate treatment: evidence for anti-angiogenic action. *J Invest Dermatol*. 2011;131(6):1356-64.
104. Jain RK, Schlenger K, Hockel M, Yuan F. Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat Med*. 1997;3(11):1203-8.
105. Staton CA, Reed MW, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol*. 2009;90(3):195-221.
106. Rahman HS, Tan BL, Othman HH, Chartrand MS, Pathak Y, Mohan S, et al. An Overview of In Vitro, In Vivo, and Computational Techniques for Cancer-Associated Angiogenesis Studies. *Biomed Res Int*. 2020;2020:8857428.
107. Norton KA, Popel AS. Effects of endothelial cell proliferation and migration rates in a computational model of sprouting angiogenesis. *Sci Rep*. 2016;6:36992.
108. Goodwin AM. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc Res*. 2007;74(2-3):172-83.
109. Beloglazova I, Zubkova E, Dergilev K, Goltseva Y, Parfyonova Y. New Insight on 2D In Vitro Angiogenesis Models: All That Stretches Is Not a Tube. *Cells*. 2022;11(20).
110. McGonigle S, Shifrin V. In vitro assay of angiogenesis: inhibition of capillary tube formation. *Curr Protoc Pharmacol*. 2008;Chapter 12:Unit12
111. Khoo CP, Micklem K, Watt SM. A comparison of methods for quantifying angiogenesis in the Matrigel assay in vitro. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011;17(9):895-906.
112. DeCicco-Skinner KL, Henry GH, Cataisson C, Tabib T, Gwilliam JC, Watson NJ, et al. Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis. *J Vis Exp*. 2014(91):e51312.
113. Zucchelli E, Majid QA, Foldes G. New artery of knowledge: 3D models of angiogenesis. *Vasc Biol*. 2019;1(1):H135-H43.
114. Laschke MW, Gu Y, Menger MD. Replacement in angiogenesis research: Studying mechanisms of blood vessel development by animal-free in vitro, in vivo and in silico approaches. *Front Physiol*. 2022;13:981161.

115. Murphy AR, Allenby MC. In vitro microvascular engineering approaches and strategies for interstitial tissue integration. *Acta Biomater.* 2023;171:114-30.
116. Magee LA, Brown MA, Hall DR, Gupte S, Hennessy A, Karumanchi SA, et al. The 2021 International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens.* 2022;27:148-69.
117. Roberts JM, Rich-Edwards JW, McElrath TF, Garmire L, Myatt L, Global Pregnancy C. Subtypes of Preeclampsia: Recognition and Determining Clinical Usefulness. *Hypertension.* 2021;77(5):1430-41.
118. Nirupama R, Divyashree S, Janhavi P, Muthukumar SP, Ravindra PV. Preeclampsia: Pathophysiology and management. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2021;50(2):101975.
119. Brownfoot F, Rolnik DL. Prevention of preeclampsia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2024;93:102481.
120. Alese MO, Moodley J, Naicker T. Preeclampsia and HELLP syndrome, the role of the liver. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2021;34(1):117-23.
121. Ives CW, Sinkey R, Rajapreyar I, Tita ATN, Oparil S. Preeclampsia-Pathophysiology and Clinical Presentations: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 2020;76(14):1690-702.
122. S S. Preeclampsia. Singapore: Springer; 2018.
123. Brownfoot F, Rolnik DL. Prevention of preeclampsia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2024;93:102481.
124. Opichka MA, Rappel MW, Gutterman DD, Grobe JL, McIntosh JJ. Vascular Dysfunction in Preeclampsia. *Cells.* 2021;10(11).
125. Kubo A, Matsubara K, Matsubara Y, Nakaoka H, Sugiyama T. The Influence of Nicotine on Trophoblast-Derived Exosomes in a Mouse Model of Pathogenic Preeclampsia. *Int J Mol Sci.* 2023;24(13).
126. Ho SJ, Chaput D, Sinkey RG, Garces AH, New EP, Okuka M, et al. Proteomic studies of VEGFR2 in human placentas reveal protein associations with preeclampsia, diabetes, gravidity, and labor. *Cell Commun Signal.* 2024;22(1):221.
127. Xiong Y, Huo Y, Chen C, Zeng H, Lu X, Wei C, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 tyrosine 1175 signaling controls VEGF-induced von Willebrand factor release from endothelial cells via phospholipase C-gamma 1- and protein kinase A-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2009;284(35):23217-24.
128. Gogiel T, Galewska Z, Jaworski S. Pre-eclampsia-associated alterations in Wharton's jelly proteoglycans. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(2):501-5.

129. Bergman L, Acurio J, Leon J, Gatu E, Friis T, Nelander M, et al. Preeclampsia and Increased Permeability Over the Blood-Brain Barrier: A Role of Vascular Endothelial Growth Receptor 2. *Am J Hypertens*. 2021;34(1):73-81.
130. Ness RB, Roberts JM. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;175(5):1365-70.
131. Schrey-Petersen S, Stepan H. Anti-angiogenesis and Preeclampsia in 2016. *Curr Hypertens Rep*. 2017;19(1):6.
132. Than NG, Romero R, Posta M, Györfy D, Szalai G, Rossi SW, et al. Classification of preeclampsia according to molecular clusters with the goal of achieving personalized prevention. *Journal of Reproductive Immunology*. 2024;161:104172.
133. Luppi P, Powers RW, Verma V, Edmunds L, Plymire D, Hubel CA. Maternal circulating CD34+VEGFR-2+ and CD133+VEGFR-2+ progenitor cells increase during normal pregnancy but are reduced in women with preeclampsia. *Reprod Sci*. 2010;17(7):643-52.
134. Escudero C, Celis C, Saez T, San Martin S, Valenzuela FJ, Aguayo C, et al. Increased placental angiogenesis in late and early onset pre-eclampsia is associated with differential activation of vascular endothelial growth factor receptor 2. *Placenta*. 2014;35(3):207-15.
135. Ssengonzi R, Wang Y, Maeda-Smithies N, Li F. Endothelial Nitric Oxide synthase (eNOS) in Preeclampsia: An Update. *J Pregnancy Child Health*. 2024;6.
136. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 2006;12(6):642-9.
137. Correia Y, Scheel J, Gupta S, Wang K. Placental mitochondrial function as a driver of angiogenesis and placental dysfunction. *Biol Chem*. 2021;402(8):887-909.
138. Bankowski E, Sobolewski K, Romanowicz L, Chyczewski L, Jaworski S. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly and their alterations in EPH-gestosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1996;66(2):109-17.
139. Pawlicka E, Bankowski E, Jaworski S. Elastin of the umbilical cord arteries and its alterations in EPH gestosis (preeclampsia). *Biol Neonate*. 1999;75(2):91-6.
140. Chrusciel M, Ziecik AJ, Andronowska A. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF-A) and its receptors in the umbilical cord in the course of pregnancy in the pig. *Reprod Domest Anim*. 2011;46(3):434-43.
141. Zhou CC, Wan S, Zhao XB, Gu SY, Pei JD, Wu YL, et al. Exosomal miR-195 in hUC-MSCs alleviates hypoxia-induced damage of trophoblast cells through tissue factor pathway inhibitor 2. *Curr Res Transl Med*. 2022;70(4).

142. Wang LL, Yu Y, Guan HB, Qiao C. Effect of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation in a Rat Model of Preeclampsia. *Reproductive Sciences*. 2016;23(8):1058-70.
143. Wu D, Liu Y, Liu XX, Liu WF, Shi HR, Zhang Y, et al. Heme oxygenase-1 gene modified human placental mesenchymal stem cells promote placental angiogenesis and spiral artery remodeling by improving the balance of angiogenic factors. *Placenta*. 2020;99:70-7.
144. Xiong ZH, Wei J, Lu MQ, Jin MY, Geng HL. Protective effect of human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes on preserving the morphology and angiogenesis of placenta in rats with preeclampsia. *Biomed Pharmacother*. 2018;105:1240-7.
145. Yu ZE, Zhang W, Wang YX, Gao MM, Zhang M, Yao D, et al. Extracellular Vesicles Derived from Human Umbilical Cord MSC Improve Vascular Endothelial Function in In Vitro and In Vivo Models of Preeclampsia through Activating Arginine Metabolism. *Mol Pharmaceut*. 2023;20(12):6429-40.
146. Sun JC, Zhang WS. Huc-MSC-derived exosomal miR-144 alleviates inflammation in LPS-induced preeclampsia-like pregnant rats via the FosB/ Flt-1 pathway. *Heliyon*. 2024;10(2).
147. Chang XW, He QZ, Wei MT, Jia LY, Wei YY, Bian YD, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell derived exosomes (HUCMSC-exos) recovery soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1)-induced endothelial dysfunction in preeclampsia. *European Journal of Medical Research*. 2023;28(1).
148. Medina-Leyte DJ, Domínguez-Pérez M, Mercado I, Villarreal-Molina MT, Jacobo-Albavera L. Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review. *Appl Sci-Basel*. 2020;10(3).
149. Jimenez N, Krouwer VJ, Post JA. A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. *Cytotechnology*. 2013;65(1):1-14.
150. DeCicco-Skinner KL, Henry GH, Cataisson C, Tabib T, Gwilliam JC, Watson NJ, et al. Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis. *J Vis Exp*. 2014(91):e51312.
151. Zudaire E, Gambardella L, Kurcz C, Vermeren S. A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PLoS One*. 2011;6(11):e27385.
152. Li Z, Zhang H, Sun Y, Feng Z, Cui B, Han J, et al. Live-cell imaging-based dynamic vascular formation assay for antivasular drug evaluation and screening. *iScience*. 2023;26(5):106721.
153. Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, Rasband W, Cuendet M, Uzan G, et al. Angiogenesis Analyzer for ImageJ — A comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin Bead Assay”. *Scientific Reports*. 2020;10(1).
154. Carpentier G MM, Courty J and Cascone I., editor Angiogenesis Analyzer for ImageJ. 4th ImageJ User and Developer Conference; 2012 2012; Mondorf-les-Bains, Luxembourg.
155. Gregorius J, Wang C, Stambouli O, Hussner T, Qi Y, Tertel T, et al. Small extracellular vesicles obtained from hypoxic mesenchymal stromal cells have unique characteristics that promote cerebral

angiogenesis, brain remodeling and neurological recovery after focal cerebral ischemia in mice. *Basic Res Cardiol.* 2021;116(1):40.

156. Bowman-Gibson S, Chandiramani C, Stone ML, Waker CA, Rackett TM, Maxwell RA, et al. Streamlined Analysis of Maternal Plasma Indicates Small Extracellular Vesicles are Significantly Elevated in Early-Onset Preeclampsia. *Reprod Sci.* 2024;31(9):2771-82.

157. Saito S. Preeclampsia Basic, Genomic, and Clinical: Basic, Genomic, and Clinical 2018.

158. Divband S, Tasharrofi N, Abroun S, Soufi Zomorrod M. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells-Derived Small Extracellular Vesicles Can Be Considered as Cell-Free Therapeutics for Angiogenesis Promotion. *Cell J.* 2022;24(11):689-96.

159. Gu M, Zhang F, Jiang X, Chen P, Wan S, Lv Q, et al. Influence of placental exosomes from early onset preeclampsia women umbilical cord plasma on human umbilical vein endothelial cells. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:1061340.

160. Ying X, Zhu Y, Jin X, Chang X. Umbilical cord plasma-derived exosomes from preeclamptic women induce vascular dysfunction by targeting HMGCS1 in endothelial cells. *Placenta.* 2021;103:86-93.

161. Shi H, Yang Z, Cui J, Tao H, Ma R, Zhao Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: a promising alternative in the therapy of preeclampsia. *Stem Cell Res Ther.* 2024;15(1):30.

162. Nevo O, Lee DK, Caniggia I. Attenuation of VEGFR-2 Expression by sFlt-1 and Low Oxygen in Human Placenta. *Plos One.* 2013;8(11).

163. Atakul T. Serum Levels of Angiogenic Factors Distinguish Between Women with Preeclampsia and Normotensive Pregnant Women But Not Severity of Preeclampsia in an Obstetric Center in Turkey. *Med Sci Monit.* 2019;25:6935-42.

164. Istrate M, Mihu C, Susman S, Melincovici CS, Malutan AM, Buiga R, et al. Highlighting the R1 and R2 VEGF receptors in placentas resulting from normal development pregnancies and from pregnancies complicated by preeclampsia. *Rom J Morphol Embryo.* 2018;59(1):139-46.

165. Munaut C, Lorquet S, Pequeux C, Coulon C, Le Goarant J, Chantraine F, et al. Differential expression of Vegfr-2 and its soluble form in preeclampsia. *PLoS One.* 2012;7(3):e33475.

166. Almasry SM, Elfayomy AK, Hashem HE. Ultrastructure and histomorphometric analysis of human umbilical cord vessels in preeclampsia: a potential role of VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2. *Rom J Morphol Embryol.* 2016;57(2 Suppl):681-9.

167. Cho J, Kim TH, Seok J, Jun JH, Park H, Kweon M, et al. Vascular remodeling by placenta-derived mesenchymal stem cells restores ovarian function in ovariectomized rat model via the VEGF pathway. *Lab Invest.* 2021;101(3):304-17.

168. Chen J, Liu Z, Hong MM, Zhang H, Chen C, Xiao M, et al. Proangiogenic compositions of microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2014;9(12):e115316.
169. Komaki M, Numata Y, Morioka C, Honda I, Tooi M, Yokoyama N, et al. Exosomes of human placenta-derived mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):219.
170. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*. 2007;25(2):319-31.
171. Subramanian A, Fong CY, Biswas A, Bongso A. Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*. 2015;10(6):e0127992.
172. Andraweera PH, Dekker GA, Laurence JA, Roberts CT. Placental expression of VEGF family mRNA in adverse pregnancy outcomes. *Placenta*. 2012;33(6):467-72.
173. Escudero C, Celis C, Saez T, San Martin S, Valenzuela FJ, Aguayo C, et al. Increased placental angiogenesis in late and early onset pre-eclampsia is associated with differential activation of vascular endothelial growth factor receptor 2. *Placenta*. 2014;35(3):207-15.
174. Jopling HM, Howell GJ, Gamper N, Ponnambalam S. The VEGFR2 receptor tyrosine kinase undergoes constitutive endosome-to-plasma membrane recycling. *Biochem Bioph Res Co*. 2011;410(2):170-6.
175. Thomas MR, Bhatia JK, Kumar S, Boruah D. The histology and histomorphometry of umbilical cord cross section in preeclampsia and normal pregnancies: a comparative study. *J Histotechnol*. 2020;43(3):109-17.
176. Chillakuru S, Velichety SD, Rajagopalan V. Human umbilical cord and its vessels: a histomorphometric study in difference severity of hypertensive disorders of pregnancy. *Anat Cell Biol*. 2020;53(1):68-75.
177. Herzog EM, Eggink AJ, Reijnierse A, Kerkhof MAM, de Krijger RR, Roks AJM, et al. Impact of early- and late-onset preeclampsia on features of placental and newborn vascular health. *Placenta*. 2017;49:72-9.
178. Blanco MV, Vega HR, Giuliano R, Grana DR, Azzato F, Lerman J, et al. Histomorphometry of umbilical cord blood vessels in preeclampsia. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2011;13(1):30-4.
179. Sharony R, Eran K, Biron-Shental T, Kidron D. Morphometric characteristics of the umbilical cord and vessels in fetal growth restriction and pre-eclampsia. *Early Hum Dev*. 2016;92:57-62.
180. Inan S, Sancı M, Can D, Vatansever S, Oztekin O, Tinar S. Comparative morphological differences between umbilical cords from chronic hypertensive and preeclamptic pregnancies. *Acta Med Okayama*. 2002;56(4):177-86.

181. Thomas MR, Bhatia JK, Kumar S, Boruah D. The histology and histomorphometry of umbilical cord cross section in preeclampsia and normal pregnancies: a comparative study. *J Histotechnol.* 2020;43(3):109-17.
182. Herzog EM, Eggink AJ, Reijnierse A, Kerkhof MAM, de Krijger RR, Roks AJM, et al. Impact of early- and late-onset preeclampsia on features of placental and newborn vascular health. *Placenta.* 2017;49:72-9.
183. Simon AC, Levenson J, Pithois-Merli I. Large arteries in hypertension: heterogeneous haemodynamic response to beta-adrenoceptor antagonists with and without intrinsic sympathomimetic activity. *Br J Clin Pharmacol.* 1987;24 Suppl 1(Suppl 1):45s-9s.

