

**İLK TRİMESTER SPONTAN ABORTUS  
MATERYALLERİNDE SİTOGENETİK VE  
ELEKTRON MİKROSKOBİK ANALİZLER**

**Sevilhan ARTAN**

Anadolu Üniversitesi  
Sağlık bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği uyarınca  
Tıbbi Genetik Bilim Dalında  
**DOKTORA TEZİ**  
Olarak Hazırlanmıştır.

**Danışman: Prof.Dr. Nurettin BAŞARAN**

Kasım 1992

**İLK TRİMESTER SPONTAN ABORTUS  
MATERYALLERİNDE SİTOGENETİK VE  
ELEKTRON MİKROSKOBİK ANALİZLER**

**Sevilhan ARTAN**

Anadolu Üniversitesi  
Sağlık bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği uyarınca  
Tıbbi Genetik Bilim Dalında  
**DOKTORA TEZİ**  
Olarak Hazırlanmıştır.

**Danışman: Prof.Dr. Nurettin BAŞARAN**

Kasım 1992

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Sevilhan ARTAN'ın DOKTORA tezi olarak hazırladığı "İlk trimester Spontan Abortuslarda Sitogenetik ve Elektron Mikroskopik Analizler" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir. 16.11.1992

ÜYE: Prof.Dr. Nurettin BAŞARAN (imza)

ÜYE: Prof.Dr. Cihangir ÖZKINAY (imza)

ÜYE: Doç.Dr. Mustafa SOLAK (imza) / /

---

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
23.11.1992 gün ve 201/518 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

(imza)

Prof.Dr. Nurettin BAŞARAN  
Enstitü Müdürü

ASLİ GİBİDİR  
23 KASIM 1992

İsmet YILMAZ  
Enstitü Sekreteri

## ÖZET

Bu araştırmada, Ağustos 1991-Eylül 1992 tarihleri arasında Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Eskişehir Doğumevinde gerçekleşen gestasyonel yaşları 6 ile 12inci haftalar arasında olan 40 spontan abortus materyali (SAB) sitogenetik ve elektron mikroskopik analizlerle incelenmiştir.

Araştırmanın sitogenetik analizler bölümünde direkt ve uzun süreli kültür yöntemleri karşılaştırılmış, hücrelerin mitotik aktiviteleri değerlendirilmiş, kromozom anomali insidansı ve anomali tipleri belirlenerek gestasyonel ve maternal yaşlar arasındaki ilişkiler belirlenmiş, kromozom anomalili abortus örneklerinin ultrastrüktürel özellikleri değerlendirilmiştir.

Bu çalışma sonunda, koryonik villusların, trofoblastların bir hücre siklus süresi olan 36 saatlik kültürü ile yeterli ve kaliteli metafaz plağı 40 örneğin 38 tanesinde elde edilmiş ve direkt yöntemin en büyük dezavantajı ortadan kaldırılmıştır.

Koryonik villusların uzun süreli kültüründe Chang, Ham's F-10 ve RPMI-1640 besiyerleri karşılaştırmalı olarak kullanılmıştır. Bulgulara göre, CVS için RPMI-1640'ın daha verimli olduğu, bugüne kadar tüm kültürler için en verimli besiyeri olarak belirtilen Chang'ın ise villus kültürlerinde RPMI-1640'a alternatif olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Trofoblastların mitotik aktiviteleri ile gestasyonel dönem karşılaştırıldığında, hücrelerin; gestasyonun 10uncu haftasına kadar maksimum mitotik aktivite gösterdikleri, daha sona yavaş yavaş azaldığı saptanmıştır.

İncelemeye alınan 40 SAB örneğinin % 32.5 kadarında kromozom anomalisi saptanmıştır. Bu anomalilerde ilk sırayı trizomi (6 örnek) alırken, bunu monozomi X (4 örnek), tetraploidi (2 örnek) ve yapısal kromozom anomalisi (1 örnek) izlemektedir. Bu çalışmada saptanan kromozom anomalisi insidansının diğer çalışmalara göre düşük olmasının araştırma popülasyonundaki genç annelerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bunun yanısıra monozomi X oranı bu çalışmada yüksek bulunmuştur ki bunun nedeni de yine genç annelerin çoğunlukta olmasındandır. Monozomi X gösteren örneklerle ilişkin ortalama maternal yaş, gerek normal gerek anormal karyotipli örneklerin maternal yaşlarından daha küçüktür. Buna karşılık, trizomik olgularda maternal yaşın belirgin bir şekilde arttığı saptanmıştır.

Kromozom anomalisi tipi ile gestasyonel dönem karşılaştırıldığında, trizomik abortusların gestasyonun ileri dönemlerinde abort olduğu, buna karşılık monozomi X'e sahip fetusların çok erken gestasyonel dönemde atıldıkları gözlenmiş ve monozomi X düzensizliğinin trizomiye göre daha letal olduğu sonucuna varılmıştır.

Anomalili karyotipe sahip plasental villusların ince yapısı normal karyotipli spontan ve istemli abortus örneklerine ilişkin villusların ince yapısıyla karşılaştırıldığında ise genel olarak tüm anomalili kromozom kuruluşuna sahip örneklerde yetersiz villus dallanması, mikrovillus oluşum ve gelişiminde belirli bir gerileme ile seyreden plasental immatüritenin ortak özellik olduğu saptanmıştır. Anomaliler ile ultrastrüktürel yapı değerlendirildiğinde, trizomik abortuslarda düzensiz bir mikrovillus gelişimi ile karşılaşılmış; çok sayıda kısa ve çoğunluğu geniş olan bu mikrovilluslarda ileri düzeyde dejenerasyonun olduğu, çok düzensiz bir dağılım gösterdikleri dikkati çekmiştir. Ayrıca bu örneklerde ileri düzeyde sinsisyal harabiyetin olduğu, serbest yüzeyde bol miktarda fokal nekrozların, intervillöz boşlukta ise bol miktarda sinsisyal kalıntının bulunduğu gözlenmektedir. Trizomik örneklerin üç tanesinde de sinsisyotrofoblastlarda yoğun olarak bulunan miyelin figürleri farklı bir yapı olarak değerlendirilmiş, ancak bu yapılar diğer anomalili örneklerde rastlanmamıştır.

Dört monozomi X örneğinin ince yapısında ise düz görünümdeki sinsisyotrofoblast yüzeyi, mikrovillus sayısında belirgin bir azalma ve hidropik görünüm en belirgin özellikler olmuştur. Tetraploidik iki örnekte de hidropik görünümde, düzensiz dağılan mikrovillusların yoğun olduğu, ayrıca ara ara fibrin birikimleri ile fibröz villus stromasının bulunduğu gözlenmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada anomalili karyotipe sahip SAB örneklerinde ultrastrüktürel değişimlere rastlanmakla birlikte her kromozom düzensizliğine özgü olan modifiye ince yapının olmadığı, plasental immatüritenin ortak bir özellik olduğu, anne-fetus arasındaki alışverişin immatürite nedeniyle yeterince gerçekleşemediği, fetal karyotip, villusların yapı ve gelişimi ile hormonal dengenin birlikte etkileşimine bağlı olarak fetal kayıpların olduğu sonucuna varıldı. Ancak araştırmacıların plasental villusların gerek ince gerek üç boyutlu yapılarını inceleyerek plasental gelişim, fetal karyotip ve hormonal denge siklusunun açıklığa kavuşturulmasının gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** CVS, mozaisizm-pseudomozaizizm, maternal cell contamination, CVS techniques, abortion, chromosome abnormalities in SABs, human placenta, ultrastructure, chorionic villi, classification of chorionic villi, TEM, Hofbauer cells, trophoblasts, ultrastructure of chorionic villi in SABs.

## SUMMARY

In this study, forty spontaneous abortion (SAB) materials, aged from 6 to 12 weeks post menstruation that were obtained from Anadolu University Medical Faculty Department of Medical Genetics and Eskişehir Maternity Hospital, were analysed cytogenetically and ultrastructurally.

In the cytogenetic analysis, the cytogenetic techniques of CV that are direct and long term culture methods, were compared; mitotic activities of cells were evaluated; by determining the rate and type of chromosome abnormalities, the relations between the abnormalities and maternal, gestational ages were analysed, and finally the ultrastructure of placentas with abnormal karyotypes were evaluated.

As the result of the study, the main disadvantage of the direct technique in the CVS that was obtaining insufficient and unqualified metaphases could be eliminated by culturing the villi for 36h; and sufficient and qualitative metaphases were obtained in 38 of 40 samples.

Chang, Ham's F-10 and RPMI-1640 media were used comparatively in the long term cultures of villi. According to the results, RPMI-1640 was the most convenient medium for the CV cultures and it was seen that Chang medium that has been reported as a primer medium for all type of cultures, could be used alternatively to the RPMI-1640 medium for CVS cultures.

When the mitotic activities of the cells were compared with the gestational ages, it was determined that the mitotic activities of the cells were at the highest level until the 10th week and then the activity was decreased gradually.

In this study, the chromosome abnormality rate was obtained as 32.5% which was lower than the other reports, since the mean maternal age of this population was lower than the others. This thought was

confirmed by the presence of high frequency of fetuses with monosomy X. When the mean maternal age of the fetuses with monosomy X was compared with the ages of fetuses with both normal and abnormal karyotypes, it was seen that the age in the monosomy X group was lower than the others. The most seen chromosome abnormality was trisomy, while monosomy X, tetraploidy and structural abnormality were the others. In the trisomic abortuses, the mean maternal age was significantly higher than the other groups which was in contrast to monosomy X group.

When the type of chromosome abnormality and gestational age were compared, the fetuses with monosomy X were aborted earlier than the fetuses with other chromosome abnormalities. Therefore we concluded that, the lethality of monosomy X is higher than the trisomy and other aberrations.

When the ultrastructures of villi of SABs with abnormal karyotypes were compared with the villi of normal karyotypes, placental immaturity was the common feature of the placentas with abnormal karyotypes. When the villus of each chromosome abnormality type was analysed; in the trisomic abortuses, irregular microvilli growth, syncytial degeneration, focal necrosis in the free surface and syncytial remnants in the intervillous space were the specific modifications. In the three trisomic samples, we also saw a dense myelin figures in the syncytiotrophoblasts, however these figures were not seen in the other samples.

In the four samples with monosomy X, smooth syncytiotrophoblast surface, decreased microvilli and hydrophic appearance were the most seen modifications. Hydrophic appearance and irregular microvilli distribution were also seen in the tetraploidic samples.

As a conclusion, although ultrastructural modifications were seen in the villi of fetuses with abnormal karyotypes, we concluded that there were no any specific modification for each chromosome abnormality rate.



The common modification for all abnormal karyotypes was the placental immaturity, and because of this immaturity, substance and gas transportation between mother and fetus could not be performed sufficiently, and an abortion was appeared by the reciprocal interactions of the fetal karyotype, placental growth and hormone equilibrium. However, we supposed that the analyses of ultra and third dimensional structures of villi should be performed and then, the interactions of placental growth, fetal karyotype and hormonal equilibrium should be analysed.

**Key words:** CVS, mozaisizm-pseudomozaisizm, maternal cell contamination, CVS techniques, abortion, chromosome abnormalities in SABs, human placenta, ultrastructure, chorionic villi, classification of chorionic villi, TEM, Hofbauer cells, trophoblasts, ultrastructure of chorionic villi in SABs.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde ve benim yetişmemde yol gösterip kıymetli bilgileriyle çalışmalarına katkıda bulunan, yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm değerli hocam Prof.Dr.Nurettin BAŞARAN'a, tüm çalışmalarım süresince yakın ilgilerini esirgemeyip bana moral ve destek veren değerli hocam Prof.Dr.Ayşe BAŞARAN'a, materyal temininde büyük özverilerde bulunan Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üye ve asistanları ile Eskişehir Doğumevi Septik Servis personeline, materyallerin elektron mikroskopik analizlerinin gerçekleşmesinde büyük katkıları olan sayın Prof.Dr.Güngör ŞATIROĞLU ve Doç.Dr.Melek ÖZTÜRK'e, sürekli bir şekilde çalışmalarımı izleyip değerli zamanlarını ayırarak katkılarını esirgemeyen Doç.Dr. Mustafa SOLAK, Öğr.Grv.Dr.Muhsin ÖZDEMİR ve Arş.Grv.Dr.Jülide GENÇ'e, şekillerin çizimini gerçekleştiren Sağ.Tekn. Ayşe ÇİMEN'e, ve tüm mesai arkadaşlarımla maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen eşim Vet.Hek. Refik ARTAN ve kızım Nilhan'a teşekkürü bir borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iii
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiv
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.</b>	<b>6</b>
2.1. Plasentanın Oluşumu.	7
2.1.1. Gametlerde fertilizasyona hazırlık	7
2.1.2. Fertilizasyon	7
2.1.3. Yarıklanma	9
2.1.4. İmplantasyon	9
2.1.5. Trofoblastların gelişimi	11
2.2. Plasental Villuslar	13
2.2.1. Mezenşimal villuslar	14
2.2.2. İmmatür intermediate villuslar	17
2.2.3. Stem villuslar	19
2.2.4. Matür intermediate villuslar	20
2.2.5. Terminal villuslar	20
2.2.6. Hofbauer hücreler	21
2.2.7. Plasental villuslarda kapillerlerin gelişimi	23
2.2.8. İnsan plasental villusundaki morfometrik analizler	26
2.3. Plasental Düzensizlikler	28
2.4. Spontan Abortus (SAB)	30
2.4.1. SAB çeşitleri	31
2.4.2. SAB insidansı	32
2.4.3. SAB'ın etiyojisi	32
2.5. Genetik Düzensizlikler ve Abortus	33
2.5.1. SAB'larda gözlenen kromozom anomali tipleri	34
2.6. SAB'larda Placenta	36
2.7. Koryonik Villusların Sitogenetik Analizlerde Kullanılması	38

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ (DEVAM)

<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	41
3.1. Gereç	41
3.2. Yöntemler	41
3.2.1. Materyal alımı	41
3.2.2. Sitogenetik analizler	42
3.2.2.1. Direkt yöntem	42
3.2.2.2. Uzun süreli kültür yöntemi	43
3.2.2.3. Metafaz plaklarının bantlanması	46
3.2.3. Elektron mikroskop analizine hazırlık	46
<b>4. BULGULAR</b>	50
4.1. Sitogenetik Analizlere İlişkin Bulgular	50
4.1.1. Uygulanan yöntemlerin karşılaştırılması	50
4.1.2. Kromozom anomali frekansı ve anomali tiplerine ilişkin bulgular	52
4.1.3. Kromozom anomali frekansı ve gestasyonel yaş	52
4.1.4. Kromozom düzensizlikleri ve maternal yaş arasındaki bağlantıya ilişkin bulgular	52
4.1.5. Normal karyotipli fetuslarda cinsiyet oranı	53
4.2. Elektron Mikroskop Analizlerine İlişkin Bulgular	54
<b>5. TARTIŞMA</b>	69
5.1. Sitogenetik Analizler	69
5.1.1. Uygulanan sitogenetik yöntemlere ilişkin bulguların tartışılması	69
5.1.2. Kromozom anomali frekansı ve anomali tiplerine ilişkin bulguların tartışılması	72
5.1.3. Normal karyotipli fetuslarda cinsiyet	76
5.2. Elektron Mikroskop Analizlerine İlişkin Bulguların Tartışılması	77
<b>6. SONUÇ</b>	81
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ</b>	84
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	96

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 2.1. Koryonik villusların gelişimi	12
Şekil 2.2. Gestasyonun üçüncü haftasında trofoblast ve somit oluşum öncesi embriyonun görünümü	12
Şekil 2.3. Gestasyonun üçüncü haftasında villusların boyuna kesiti	13
Şekil 2.4. Koryonik villusların gestasyonel dönemlere göre gelişimi ve düzensizlikler	30

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 3.1. Transport solusyonunun hazırlanışı	48
Çizelge 3.2. Direkt yöntemde kullanılan düşük serum konsantrasyonlu besiyerinin hazırlanışı	48
Çizelge 3.3. Uzun süreli kültür yönteminde kullanılan besiyerleri	48
Çizelge 3.4. TEM analizinde kullanılan solusyonlar	49
Çizelge 4.1. Gestasyonel yaş ile koryonik villus hücrelerinin üreme kapasitesi arasındaki ilişki	62
Çizelge 4.2. SAB'lardan elde edilen CV örneklerinin uzun süreli kültüründe kullanılan besiyerlerinin karşılaştırılması	63
Çizelge 4.3. Sitogenetik yönden incelenen SAB örneklerinde saptanan fetal karyotipler	64
Çizelge 4.4. SAB'lardaki kromozom anomalilerinin frekans ve tipinin gestasyonel yaşa göre dağılımı	65
Çizelge 4.5. SAB'larda saptanan kromozom düzensizliklerinin frekans ve tipinin maternal yaşa göre dağılımı	66
Çizelge 4.6. Gestasyonel ve maternal yaş ile fetal karyotip ilişkisi	67
Çizelge 4.7. Normal karyotipli fetuslarda cinsiyet oranı	68
Çizelge 5.1. SAB'larda saptanan kromozom düzensizliklerinin tip ve frekansı	74
Çizelge 5.2. Bu çalışmaya uygun gestasyonel dönemlerde saptanan kromozom düzensizliklerinin insidansı	75

**RESİMLER DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa</u></b>
Resim 4.1. Trizomi 21 gösteren dişi fetusa ilişkin metafaz plağı	56
Resim 4.2. Trizomi 21 gösteren erkek fetusa ilişkin metafaz plağı	56
Resim 4.3. Monozomi X gösteren dişi fetusa ilişkin metafaz plağı	57
Resim 4.4. Tetraploidik bir fetusa ilişkin metafaz plağı	57
Resim 4.5. 13/14 translokasyonu gösteren bir fetusa ilişkin metafaz plağı	58
Resim 4.6. Normal karyotipli fetusa ilişkin villus	58
Resim 4.7. Trizomik abortuslu bir fetusa ilişkin villusların ince yapısı	59
Resim 4.8. Trizomik abortus örneğinde saptanan dejenere mikrovillus ve miyelin figürleri ile spesifik sinsisyotrofoblast	59
Resim 4.9. Monozomi X gösteren bir fetusa ilişkin villus yapısı	60
Resim 4.10. 45,XO karyotip saptanan fetusa ilişkin villus stroması	60
Resim 4.11. Tetraploidik bir fetusa ilişkin villusların ince yapısı	61

## 1. GİRİŞ

İntervillöz boşluktaki maternal kan ile fetal kapillerler arasında madde transferi koryonik villusları çevreleyen sinsisyal trofoblastlar aracılığıyla olmaktadır. Madde transferi basit difüzyon ile gerçekleşmektedir ki pek çok faktör difüzyon oranını etkilemektedir. Bu nedenle, plasenta yapısının iyi bilinmesi, gebelik dönemlerine göre plasenta yapısında gerçekleşen modifikasyonların saptanması, fetus gelişimini etkileyen faktörlerin belirlenip değerlendirilmesi, özellikle madde alışverişinin yapıldığı yüzey alanındaki değişikliklerin saptanması fetus gelişimi için büyük önem kazanmaktadır.

Plasental maturasyon prosesinin karakterize edilmesi plasental morfoloji, fetal büyüme ve gestasyonel dönem arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesi yönünden gereklidir ki bunun için de çeşitli morfostrüktürel ve biyokimyasal parametreler incelenmektedir.

Ovulasyondan sonraki 5inci günde blastosit döneminde olan embriyo uterus kavitesine ulaşır. Trofoblast uterus duvarına tutunur ve fertilizasyondan sonraki 7-9uncu günlerde gelişen embriyo ile maternal sirkülasyon arasındaki vasküler bağlantılar sinsisyotrofoblast tarafından gerçekleştirilir. Bu dönemde trofoblast insan koryonik gonadotropin hormonu (= human koryonik gonadotrophin=hCG) salgılamaya başlar. hCG korpus luteumun progesteron



üretme aktivitesini korumasını ve korpus luteumun dejenere olmasını önler. Korpus luteumun gebeliğin dördüncü ayından önce dejenere olması genellikle abortusla sonuçlanmaktadır.

İnsan plasentası gebelik boyunca önemli düzeyde morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere uğrar. Epidermal büyüme faktörü (=epidermal growth factor=EGF) hem epitelyal hem de mezenşimal orjinli hücrelerin proliferasyonunu stimüle eder (Kawagoe et al. 1990). Ancak EGF'nin gebelik boyunca plasental villusların proliferasyonu yerine villusların farklılaşmasını uyardığı öne sürülmektedir (Morrish et al. 1987, Kawagoe 1990). Trofoblastlardan hCG ile birlikte salınan insan plasental laktojen hormonu (=human placental lactogen=hPL) düzeyi, sinsisyotrofoblastların maternal sirkülasyonun intervillöz boşluğa bakan yüzeyinde yoğunlaşan EGF reseptörleri tarafından düzenlenmektedir. Bunların yanısıra, sitotrofoblastların hücre yüzeyinde de EGF reseptörlerinin bulunduğu immünohistokimyasal çalışmalarda gösterilmiştir (82, 76, 67). Trofoblast proliferasyonunun sadece sitotrofoblast tabakasında olması nedeniyle, sitotrofoblast bölgesinde yoğunlaşan EGF reseptörleri trofoblast proliferasyonu, morfolojik farklılaşma ve maturasyondan sorumlu iken sinsisyotrofoblastlarda bulunan reseptörler farklılaşmaya bağlı olarak hCG ve hPL sekresyonlarının stimülasyonunda görev almaktadırlar.

Anne ve fetus arasındaki her türlü alışverişi regüle ederek fetusun gelişmesini sağlayan plasenta aynı zamanda endokrin bir organ gibi görev yapmaktadır. hCG ve hPL'in yanısıra östrojen ve progesteron sekresyonunu da gerçekleştirmektedir.

Maternal ve fetal sirkülasyonlardan elde edilen substratların trofoblast tarafından östrojen ve progesterona dönüştürülmesi gebelik boyunca bu steroid hormonların uterus ve sirkülasyondaki konsantrasyonlarının yüksek olmasına neden olmaktadır. Plasental steroidogenezis mekanizması henüz tam olarak belirlenmemekle birlikte bu prosesin pek çok farklı düzeylerde etki gösteren faktörler tarafından düzenleneceği öne sürülmektedir (Maslar et al. 1990). Bunlardan birincisi trofoblast, kolesterolden pregnenolon ve progesteron üretmek ve androjenleri östrojenlere çevirmek için gerekli enzimleri sentezlemelidir. Bu enzimlerin sentezlenmesi ve birikmesi sinsisyotrofoblast

farklılaşması ile gerçekleşebilir ve enzimleri kodlayan genlerde devamlı artan miktarlarda transkripsiyon ve translasyonunun olması gerekir. Bu nedenle transkripsiyon, translasyon ya da enzim degradasyonunu etkileyen herhangi bir faktör plasental steroidogenezis için uygun enzim miktarını belirler. Plasental steroidogenezisi etkileyebileceği düşünülen peptid hormonları (Nestler and Williams 1987), nörotransmitterler (Caritis, Hirsch and Zeleznik 1983) gibi faktörler enzim aktivitesini kofaktör, protein kinaz (Ritvos et al. 1988, Kasugai et al. 1987) ya da intraselüler kalsiyum (Kasugai et al. 1987) miktarını değiştirerek düzenleyebilirler. Bunlara ek olarak progesteron sentezi için maternal LDL-kolesterol, östrojen sentezi için de sirkülasyondaki androjen miktarı gibi eksojen substratlar da plasental steroidogenezisi büyük oranda etkilemektedirler. Bu substratların bulunması veya trofoblastın bunları kullanabilmesi plasental steroid üretimini direkt olarak etkilemektedir (Maslar et al. 1990).

Plasenta bir solunum organıdır. Maternal sirkülasyondaki oksijen fetus sirkülasyonuna geçerken fetustaki CO<sub>2</sub> in maternal kana geçmesi plasental villuslar aracılığıyla gerçekleşir. Karbonik anhidraz (=Carbonic anhydrase= CA), CO<sub>2</sub> in bikarbonat iyonlarına dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O H<sup>+</sup>+HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Bu enzimin düşük ve yüksek aktiviteli isoenzimlerinin sinsizyal trofoblastlarda bulunduğu ve bikarbonatın hızla üretilip tüketilmesini sağlayarak plasental membrandaki CO<sub>2</sub> difüzyonunu kolaylaştırdığı saptanmıştır (Aliakbar, Brown and Nicolaides 1990).

Fertilize olmuş ovumların %15 kadarı segmentasyon dönemine girememekte, % 15 kadarı fertilizasyon ile implantasyon dönemleri arasında, %25i implantasyon döneminde, %30 kadarı ise implantasyondan sonra canlılığını yitirmektedir (Durfee and Pernoll 1991, Kline, Stein and Susser 1986).

Abortus, gestasyonun 20inci tam haftasından (139uncu gün) önce doğum prosesinin sona ermesidir. Bu da 500 gr. dan daha hafif olan fetusun plasentanın tümü ya da bir bölümü ile birlikte dışarı atılmasıdır. Gestasyonun ilk 12 haftası içerisinde gerçekleşen abortuslar erken dönem, 12 ile 20inci haftalar arasında gerçekleşen abortuslar ise ileri dönem abortuslar olarak tanımlanır (William's Obstetrics, 1989).

Spontan abortusların etiyolojisi değerlendirildiğinde ilk sırayı kromozom anomalileri alırken endokrin ve immünolojik faktörler ile enfeksiyon, anatomik defektler daha az oranlarda etkili olmaktadır. Özellikle erken dönem gebelik kayıplarının büyük bölümü kromozom kuruluşlarındaki düzensizliklerden kaynaklanmaktadır. İlk trimester SABLarın %50-60 kadarı kromozom anomalisi ile bağlantılı iken ikinci trimesterde bu oran %25 lere düşmektedir. Abortuslarda görülen kromozom düzensizlik tipleri değerlendirildiğinde sayısal düzensizlikler en yüksek oranı oluşturmaktadır. Gestasyonal döneme göre sayısal düzensizlik insidansları değişkenlik göstermektedir. Gestasyonun 2-7inci haftaları arasında kromozom anöploidi insidansı % 65 dolaylarında iken 8-12inci haftalar arasında bu oran %25 dir. Sayısal düzensizlikler arasında ilk sırayı otozomal trizomiler alırken bunu yakın oranlarda monozomi X ve poliploidiler izlemektedir. Daha düşük oranlarda gözlenen yapısal kromozom anomalileri dengesiz translokasyon taşıyıcısı olan eşlerden birinden kaynaklanabildiği gibi de novo olarak fetusta da ortaya çıkabilmektedir. Sayısal anomalilerin nedeni mayotik nondisjunction (trizomi ve bazı triploidiler), mitotik nondisjunction (tetraploidi) ve dispermi (triploidilerin büyük bölümü) olarak kabul edilmektedir (15,33, 34, 43,93).

Yukarıdaki paragraflarda açıklandığı gibi, plasenta ayrıca bir endokrin organdır. Gebeliğin devamı, fetusun gelişimi için salgıladığı hormonlar plasental villuslardaki trofoblastların farklılaşmasını, dolayısıyla da plasental olgunlaşmayı sağlamaktadır. Gestasyonel dönem ve fetal gelişmeye bağlı olarak plasenta morfoyapısal olarak şeklini değiştirerek ve devamlı ileri doğru bir gelişme gösterir. Ancak ileri doğru gelişme tamamıyla sitotrofoblastların proliferasyonuna ve farklılaşmasına bağlıdır. Endojen ve eksojen faktörler plasental gelişimi direkt olarak engellemektedir. Bu faktörlerden biri embriyo için engel olabilen kromozom anomalileridir. Plasentanın regüler gelişimi embriyo-fetusun canlı olmasına, maternal ve fetal kan sirkülasyonunun tam olmasına dayanmaktadır. Kromozomal anomalili embriyonun erken ölümü sıklıkla gözlenmektedir. Embriyo ölümünden sonra plasenta uterus içinde canlılığını korumakla birlikte herhangi bir gelişme göstermemektedir. Gelişimin durması plasental villuslarda dallanma düzensizliklerine neden olur (69, 78, 88).

İlk trimester spontan abortusların koryonik villuslarında gerçekleştirilen sitogenetik ve histolojik analizlerde, kromozom aberasyonuna bağılı olarak plasental gelişimde düzensizliklerin olduğu saptanmıştır. Gebeliğin erken döneminde letaliteye neden olan trizomik örneklerde ileri düzeyde gelişme geriliği gözlenirken geç dönem abortuslarda plasental farklılaşmanın daha düzenli olduğu gözlenmiştir. Koryonik villusların üç boyutlu değerlendirmelerinde belirgin bir plasental immaturite dikkati çekmiş olup abortusun olduğu döneme göre villusların stem, matür ve terminal villuslara farklılaşmasında, fetus ile alışverişin gerçekleştiği yüzeyin genişlemesini sağlayan mikrovillus oluşumunda belirgin bir gerilemenin olduğu bildirilmektedir (Novak 1991). Ancak ilk trimester abortuslarda spesifik kromozom düzensizlikleri ile plasentanın ultrastrüktürel yapısı arasındaki ilişki kesin olarak aydınlatılamamıştır (78, 89, 103).

Bu nedenle bu çalışmada, gebeliğin ilk trimesterinde gerçekleşen spontan abortuslarda kromozom düzensizliklerinin belirlenmesi, kromozomal düzensizlikler ile gestasyonel dönem arasındaki ilişkiler değerlendirilerek letal anomalilerin saptanması, kromozomal düzensizlikleri ile maternal yaş arasındaki bağlantıların değerlendirilmesi, kromozom düzensizliği saptanan örneklerin ultrastrüktürel yapılarının kontrol olarak rastgele seçilen ve normal karyotipte oldukları belirlenen istemli abortus örnekleriyle karşılaştırılması, kromozom anomalilerine spesifik ultrastrüktürel modifikasyonların olup olmadığının saptanması, bunların yanısıra koryonik villusların direkt ve uzun süreli kültür sonuçlarını karşılaştırarak yöntemler arasında farklılık olup olmadığının saptanması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Plasenta, yalnız memeli hayvanların gelişim sürecinde bulunan ve anne ile fetus arasındaki bağlantıyı sağlayan geçici bir organdır. Anne kanı ile fetus kanı daima birbirinden ayrı kaldığı halde, anne kanından fetusa beslenmesi için gerekli maddeler plasenta aracılığı ile geçer. Fetusta oluşan artık maddeler de yine bu yoldan dışarı atılırlar. Anne ile fetus kanının karışmamasını koryon (Chorion) villusları sağlar ki bu koryon villusları trofoblastlardan oluşmaktadır.

En ilkel haliyle bir maddenin anneden fetusa transportu için maddenin;

- anne kan damar endotelini,
- anne endometrium bağ dokusunu,
- uterus endometrium epitel tabakasını,
- koryon villuslarının trofoblast tabakasını,
- koryon villuslarının bağ doku tabakasını,
- fetus damar endotelini geçmesi gerekir.

Yukarıda belirtilen tabakalardan koryon villusları ile ilgili olanlar bütün plasenta tiplerinde bulunmaktadır. Ancak anneye ait tabakalar plasentanın gelişmesine paralel olarak ortadan kalkmaktadır. Buna bağlı olarak, koryon villusları uterus endometriumunun hangi tabakası ile temas halinde ise ona göre isim alır. En gelişmiş plasenta tipi olan **Plasenta haemo-chorialis** kemirici hayvanlar ile yarasa ve insanda bulunmaktadır. Bu plasenta tipinde anneye ait kan damar endoteli ortadan kalkmış, koryon villusları direkt olarak anne kanı ile temasa geçmişlerdir (Kayalı 1982).

## 2.1. Plasentanın Oluşumu

### 2.1.1. Gametlerdefertilizasyona hazırlık

Bütün yüksek organizmalı canlılarda olduğu gibi insan yavrusu da birbirinden şekil ve fonksiyon bakımından farklı iki germ hücresinin birleşmesiyle gelişmektedir. Erkek gameti olan spermatozoonun dişi gamet olan oosit içine girmesiyle gerçekleşen fertilizasyon öncesinde, erkek ve dişi germ hücreleri hem sitoplazma hem de kromozom sayısı bakımından bir dizi değişime uğrarlar.

Erkek germ hücresi (spermium) başlangıçta büyük ve yuvarlak iken, hazırlık döneminde hemen bütün sitoplazmasını yitirerek baş, orta parça ve kuyruk olmak üzere üç kısımdan oluşan, canlı iken çok hareketli bir cisimcik haline gelir. Aktif ve arayıcıdır.

Dişi germ hücresi olan oosit ise spermiumun aksine, sitoplazma miktarının artmasına paralel olarak insan vücudunun en büyük hücresi haline gelir. Ovum, aynı zamanda gelişecek yavru için bir besin deposu görevi de yapmaktadır. Bu nedenle büyük ve hareketsizdir.

Her iki gamette de gerçekleşen diğer bir değişiklik ise diploid kromozom sayısının ( $2n=46$ ) mayoz bölünme ile haploid kromozom sayısına ( $n=23$ ) inmesidir.

### 2.1.2. Fertilizasyon

Erkek ve dişi gametlerin birleşmesi ve yavrunun oluşumunu sağlayan fertilizasyon, uterus kanalının ampüller bölgesinde gerçekleşir. Burası kanalın en geniş kısmıdır ve ovaryuma yakındır.

Spermiumlar uterus ve kanal kasılmaları aracılığıyla vaginadan uterusu doğru yol alıp uterus kanallarına ulaşırlar. Ancak spermiumlar dişi genital kanala ulaştığında oositi fertilize edebilme yeteneğinden henüz yoksundurlar. Bir dizi proses sonrasında fertilize edebilecek kapasiteye ulaşırlar.

İlk aşamada, spermiumun plazma membranındaki glikoprotein kılıf ile seminal plazma proteinleri ayrılır, spermiumun akrozomal bölgesi ortaya çıkar ve

bundan sonra ikinci aşama olan akrozomal reaksiyon gerçekleşir. Akrozomal reaksiyon, oositin korona radiata hücreleri ile oositin yayılan maddelerin etkisi altında oositin hemen yakınında gerçekleşir. Akrozomal içerik salınarak spermium oositin korona radiata ve zona pellucida tabakalarını geçer. Akrozom reaksiyonu boyunca; korona radiata bariyerinin penetrasyonu için gerekli olan Hyalürinidaz, zona pellucida sindiriminde etkili olan trypsin benzeri maddeler ile akrozomal membranın iç yüzeyinde bulunan ve yine spermatozoonun zona pellucidayı geçebilmesinde işlev gösteren Akrosin salınımı sözkonusudur.

Spermatozoon oosite girer girmez, lizozomal enzimleri içeren kortikal oosit granülleri salınarak oosit membranının diğer spermatozoonlara karşı geçirgenliği ortadan kalkar. Spermatozoonlara ilişkin spesifik reseptör bölgelerinin ortadan kalkmasıyla zona pellucidanın yapı ve kompozisyonu değişir, şiddetli bir büzülme gerçekleşir. Büzülme ile ortaya çıkan boşluğa dolan sıvı diğer spermiumların oosite girmesine engel olur.

Memelilerde birinci olgunlaşma bölünmesini tamamlayarak ovuma giren spermium, ikinci olgunlaşma bölünmesi tamamlanıncaya kadar ovum sitoplazmasında hiç bir değişikliğe uğramadan durur. Oositin ikinci mayotik bölünmeyi tamamlamasından sonra oluşan yavru hücrelerden biri sitoplazma bakımından fakir olan ikinci kutup hücresi iken, diğer hücre yuvarlak, küçük ve kromatini ağ biçiminde olan bir nüvedir ve **dişi pronukleus** adını alır. Bu anda baş kısmı önde ve kuyruk arkada olmak üzere ovuma girmiş olan spermiumun kuyruk bölgesi dejenere olur; baş, içinde bulunduğu sitoplazmadan su emerek şişer ve gevşek kromatinli bir nüve haline gelir ki bu nüveye de **erkek pronukleusu** adı verilir. Her iki pronükleus birbirine doğru giderek yaklaşırlar, nükleer membranlar erir ve iki pronükleus kaynaşarak fertilize hücre ortaya çıkar.

Her ikisi de haploid olan erkek ve dişi pronükleusların büyümesi sırasında, her pronükleus kendi DNA'sını replike etmek zorundadır. Replikasyon gerçekleşmediği takdirde, iki hücreli dönemdeki zigotun her hücresi normal DNA miktarının yarısına sahip olacaktır. DNA sentezinden hemen sonra, kromozomlar normal mitotik bölünme düzenini alırlar. 23 maternal ve 23 paternal kromozomun kardeş kromatidleri zıt kutuplara giderek zigotun her hücresinin normal diploid kromozomlu olmasını sağlarlar. Kardeş kromatidlerin farklı kutuplara gidişleri sırasında hücre yüzeyinde derin bir yarık oluşarak sitoplazma ikiye bölünür. Böylece birbirini takip eden mitotik bölünmeler başlamıştır. Fertilize ovumun bu mitotik bölünmeler evresine Yarıklanma (Segmentasyon) adı verilir.

### 2.1.3. Yarıklanma

Fertilizasyondan itibaren, iki hücreli zigotta aralıksız mitotik bölünmeler başlar ki bu olay embriyolojik gelişimin başlangıcıdır. Her bölünmeden sonra ortaya çıkan blastomerler bir öncekine göre daha küçüktür. Segmentasyon devam ederken zigot da tuba uterina içinde uterusu doğru yol almaktadır. Üç-dört bölünme sonunda, yani fertilizasyondan sonraki 3üncü günde zigot 12-16 hücreli düzeye ulaşmıştır ki bu dönemde **Morula** adını alır. Morulada iki tip hücre vardır: Periferde ve orta kısımda yerleşen hücreler. Bu dönemde morulayı oluşturan hücreler arasında herhangi bir morfolojik fark görülmemesine karşın, orta kısımda toplanan hücreler embriyonun kendisine ilişkin dokuların oluşumundan, periferdeki hücreler ise trofoblastları meydana getirerek plasentanın oluşumundan sorumludurlar.

Morulanın uterus kavitesine girdiği dönemde uterus boşluğundan gelen sıvılar zigotu oluşturan hücrelerin arasına girmeye başlar. Başlangıçta bir çok küçük aralıkta toplanan sıvı miktarı gittikçe artar ve bu aralıkların bir araya gelmesi sonucu da tek bir boşluk ortaya çıkar ki bu boşluğa **blastosel**, bu dönemde serbest halde bulunan zigota ise **blastosit** adı verilir. İç hücre kütlelerinde bulunan ve artık embriyoblast olarak belirtilen hücreler bir kutupta bulunurken perifer hücre kütlelerini oluşturan trofoblastlar yassılaşılarak blastositin epitelyal duvarını oluştururlar. Artık zona pellucida kaybolmuştur ki bu da implantasyonun başlamasına olanak sağlar.

### 2.1.4. İmplantasyon

İnsanda embriyoblast kutbunun üst kısmında bulunan trofoblastik hücreler yaklaşık 6ıncı günde uterus mukozasının epitelyal hücreleri arasına girmeye başlarlar. Bu penetrasyon büyük olasılıkla trofoblastların oluşturduğu proteolitik enzimler tarafından sağlanmaktadır. Bununla beraber, uterus mukozası blastositin proteolitik işlevini uyarmaktadır. Böylece, trofoblastların ve endometriumun karşılıklı işlevi aracılığıyla implantasyon gerçekleşmektedir. Gelişimin birinci haftası sonunda zigot morula ve blastosit basamaklarını tamamlamış ve uterus mukozasına implante olmaya başlamıştır.



Gelişimin 8inci gününde blastosit kısmen endometrial stromaya gömülmüştür. Blastositin endometriuma yaklaşması daima embriyoblastların bulunduğu kısımdan olur. Blastositin bu bölümüne embriyonal kutup da denir. Blastositin çevresindeki trofoblastlarda, endometrium epiteline değer değmez bu değme noktasından başlamak üzere bir farklılaşma görülür. Başlangıçta tek katlı yassı epitel durumunda olan trofoblastların dış kısmında sinsisyal bir durum ortaya çıkmaya başlar. Bu nedenle trofoblastlarda gittikçe artan miktarlarda iki tip hücre farkedilir:

- iç kısımda tek nukleuslu trofoblastlar
- dış kısımda ise belirgin hücre sınırı olmayan, multipl nukleuslu sinsisyotrofoblastlar

Bu farklılaşma blastositin implantasyonu yönünden çok önemlidir. Çünkü dış kısımda bulunan sinsisyal durumdaki hücrelerin çoğalma yetenekleri yoktur, ancak bu bölge devamlı olarak kalınlaşmaktadır. Bu, trofoblast hücrelerinin sitotrofoblastlarda bölündüğünü ve daha sonra sitotrofoblastların şekil değiştirerek sinsisyal hücreye dönüştüklerini öne sürmektedir. Sitotrofoblastlar çoğalmak ve proteolitik fermentleri salgılamak gibi iki önemli görevi üstlenmişlerdir. Proteolitik fermentler, blastositin endometrium epiteline temas ettiği yerdeki epitel hücrelerini eritip onun endometrium içerisine girmesini sağlarlar.

Blastosit endometrium içine girmeye devam ederken, embriyoblast hücreleri de iki tabaka halinde farklılaşırlar:

- Blastosit kavitesine komşu olan küçük, kübik hücrelerden oluşan **Endoderm (= Hypoblast)** tabakası
- Yüksek prizmatik hücrelerden oluşan **Ektoderm(=Epiblast)** tabakası

Başlangıçta ektoderm sitotrofoblastlar ile geçici bir süre etkileşim halindedir. Ancak gelişim ilerledikçe iki hücre tabakası arasında küçük hücreler arası yarıklar belirmeye başlar ki bunlar birleşerek amniyotik kaviteyi oluştururlar. Bu yeni boşluğun trofoblast tarafı yassı hücrelerle döşenmiştir ki bunlara amniyoblast adı verilir ve diğer epiblastlarla beraber amniyotik kaviteyi çevrelerler.

Gelişimin dokuzuncu gününde, blastosit endometriuma tamamen gömülür ve epiteli delip içeri girdiği yer fibrinden oluşan bir pıhtı ile kapanır. Bu

dönemde trofoblastlar blastositi tamamen çevirmişlerdir. Bunların gelişiminde, özellikle embriyonal kutupta belirgin değişiklikler gözlenir. Sinsisyotrofoblastların özellikle en dış kısımlarında vakuoller ortaya çıkar. Bu vakuollerin zamanla birleşmesi ile lakunalar oluşur ki trofoblastların bu gelişim dönemine Lakuner dönem adı da verilmektedir. Gelişimin 11-12inci günlerinde, blastosit endometrial stromaya tamamıyla gömülmüştür ve yüzey epitelyumu uterus duvarındaki defekti tamamıyla kapatmıştır. Blastosit artık uterusun lumeninde hafif bir çıkıntı oluşturmaktadır.

Dokuzuncu güne oranla, şimdi trofoblastların düzeni çok daha ilerlemiş bir durumdadır. Sinsisyotrofoblastlardaki laküner boşluklar bir iletişim ağı oluşturmaktadırlar. Bu durum özellikle embriyonel kutupta daha belirgindir, anti-embriyonel kutupta ise trofoblastlar halen sitotrofoblastlardan oluştuğu için bu kısımda laküner boşluklar henüz görülmemektedir.

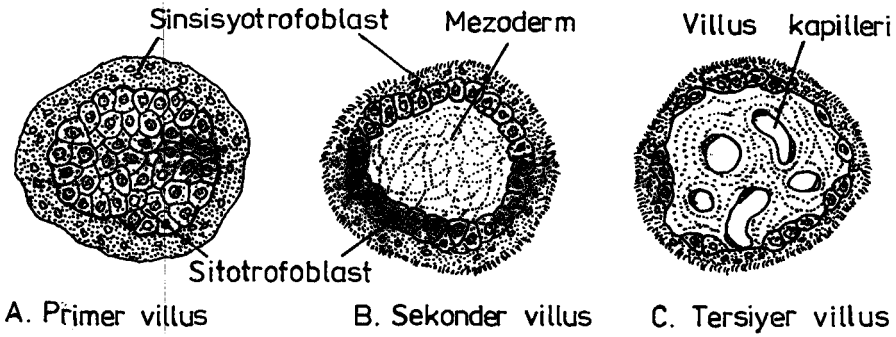
Bu dönemde, sinsisyal hücrelerin endometrial stromanın derinliklerine girerek ve maternal kapillerlerin endotelyal yüzeyini aşındırdıkları görülür. İmplantasyon bölgesinde çok yoğun olarak bulunan maternal kapillerler kanla doludur ve genişleyerek sinusoidleri oluştururlar. Sinsisyal lakunalar daha sonra sinusoidlerle birlikte devam ederler ve bunun sonucu maternal kan laküner sisteme girer. Trofoblastların devamlı daha çok sinusoidi aşındırmaya devam etmelerinden dolayı maternal kan trofoblastik sistem içerisinde akmaya başlar ki böylece uteroplental sirkülasyon başlar.

### 2.1.5. Trofoblastların Gelişimi

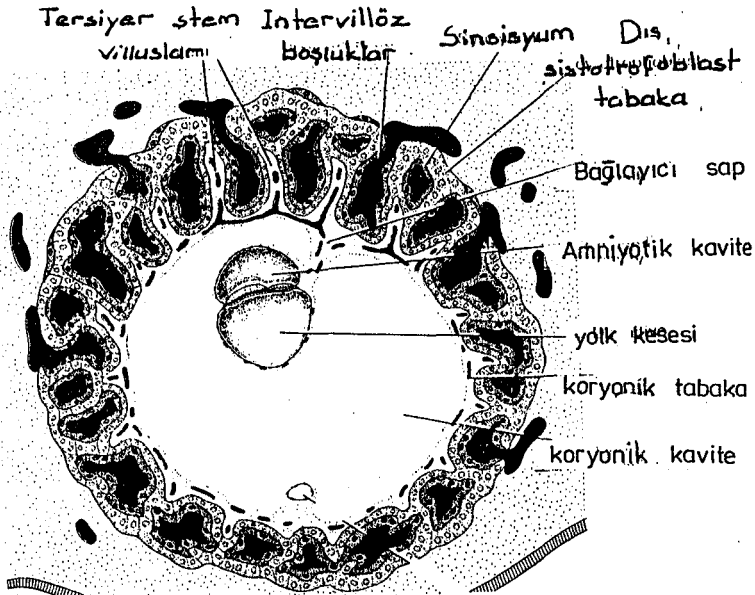
Gebelik ilerledikçe, özellikle embriyonel kutupta trofoblast gelişimi hız kazanmaktadır. İlk dönemlerde laküner boşluklar ile sinsisyal hücre uzantılarının dizilimi çok düzensiz olmakla birlikte, kısa bir süre içerisinde gerek laküner boşluklar gerekse sinsisyal hücre uzantıları sitotrofoblastlardan başlayarak ışınal görünümde dizilmeye başlarlar. Sitotrofoblastlar lokal olarak çoğalırlar ve radyer şekilde dizili olan sinsisyotrofoblastların orta kısımlarına girerek, sinsisyumla çevrili selüler kolonları oluştururlar. İşte 3üncü haftanın başlamasıyla trofoblastlar sinsisyal çerçeveli sitotrofoblastlarla karakterizedir ki bunlar **primitif villuslardır**. Üçüncü haftanın ilerlemesiyle, mezodermal hücreler primer villusların orta kısımlarına girerek desidua yönünde gelişmeye başlarlar. Bu yeni oluşan yapı ise **sekonder villusdur**. Sekonder villusların orta kısmında düzensiz olarak dağılmış, yapısal olarak oldukça homojen olan mezenşim hücre popülasyonu, bunların çevresinde hemen tamamıyla gelişmiş bir sitotrofoblast tabakası ve en dışta ise çok iyi gelişmiş bir sinsisyotrofoblast tabakası bulunmaktadır.

Üçüncü haftanın sonunda, mezodermal hücreler kan hücrelerine ve küçük kan damarlarına farklılaşmaya başlarlar. Böylece villus kapiller sistemi oluşur. Bu villus tersiyer villus ya da **definitif plasentar villus**dur (Şekil 2.1). Tersiyer villuslardaki kapillerler ile ilişkiye geçerek plasenta ve embriyo bağlantısı sağlanır. Böylece gelişimin dördüncü haftasında kalp atmaya başlayınca, villöz sistem gerekli besin ve oksijeni alabilmek için hazırdır (Şekil 2.2).

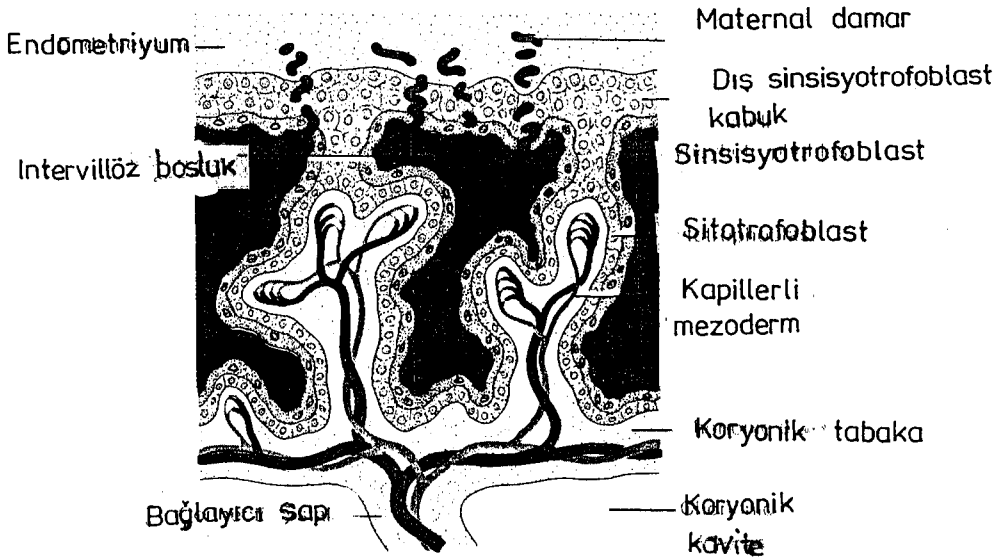
Bu arada, villuslardaki sitotrofoblastik hücreler, maternal endometriyuma ulaşınca kadar sinsisyum içine girerler. Komşu villusların benzer uzantılarıyla birleşerek ince bir dış sitotrofoblast kabuk oluşur. Bu kabuk trofoblastı tümüyle sarar ve koryonik keseyi maternal endometrial dokuya sıkıca bağlar (68, 104,126) (Şekil 2.3).



Şekil 2.1. Koryonik villusların gelişimi



Şekil 2.2. Gestasyonun 3üncü haftasında trofoblast ve somit oluşum öncesi embriyonun görünümü



Şekil 2.3. Gestasyonun üçüncü haftasında villusların boyuna kesiti

## 2.2. Plasental Villuslar

Plasental villusların ilk belirgin tanımlanması Weber'in 1832 deki verileri doğrultusunda Boyd ve Hamilton tarafından yapılmış olup villusları stem ve terminal villus olarak iki grup altında toplamışlardır (Boyd and Hamilton 1970, Kaufmann, Sen and Schweikhart 1979). Koryonik tabakadan desidua basalise kadar uzanan villuslar stem villus, bunlardan dallanan ve besin, gaz değişiminden sorumlu olan villuslar da terminal villuslar olarak tanımlanmıştır (Sadler 1990, Kaufmann 1979).

Ancak kapsamlı ışık mikroskopu analizleri ile son dönemlerde yoğun olarak gerçekleştirilen elektron mikroskopik analizler bu villus klasifikasyonu villusların gerek ultrastrüktürel, gerekse üç boyutlu yapılarına uygun olmamaktadır ki histomorfometrik analizler de bu düşüncüyü doğrulamıştır (Kaufmann, Sen and Schweikhart 1979, Castellucci and Kaufmann 1982a).

Yapılan seri incelemelerde gebelik boyunca koryonik villusların stromal arkitektinde morfolojik değişimlerin olduğu saptanmış olup bu tür stromal modifikasyonlara dayanılarak beş farklı plasental villus tipi karakterize edilmiştir (18, 19, 21, 23, 62, 63, ). Stromal yapıya göre belirlenen villus tipleri şunlardır:

- Mezenşimal villuslar
- İmmatür intermediate villuslar
- Matür intermediate villuslar
- Stem villuslar
- Terminal villuslar

### 2.2.1. Mezenşimal villuslar

Gestasyonun en erken dönemlerinde yani 7-8inci haftalarına kadar hakim olan ve diğer villus tiplerinin primitifi olan villus tipidir. Bu villuslar gestasyonun 8inci haftasından itibaren immatür intermediate villuslara dönüştükten sonra tamamıyla kaybolmazlar, doğuma kadar devamlı olarak yeni trofoblastik ve villöz tomurcuklar oluştururlar. Bu nedenle bazı mezenşimal villuslara ve tomurcuklara gestasyonun son dönemlerinde de rastlanmaktadır (Martinoli et al. 1984). Jauniaux ve ark. (1991) tarafından gerçekleştirilen ve insan plasentasının gelişiminin değerlendirildiği çalışmada, gelişmekte olan villus sayısının gestasyonun 6 ile 15inci haftalar arasında arttığı, tomurcuklanmanın ise fetal periyoda göre gestasyonun 10uncu haftasına kadar olan embriyonel dönemde sayısal olarak çok fazla ve daha uzun oldukları gözlenmiştir. Tomurcuklanma kapasitesinin gestasyonun 12inci haftasından itibaren anlamlı şekilde azaldığı belirtilmekle beraber, miyadındaki plasentalarda da tomurcuklara rastlanabileceği ve bu tomurcuklanmanın plasental büyüme kapasitesinin belirleyicisi olduğu bildirilmiştir (Burton 1987).

Yeni mezenşimal villus oluşumu ya daha yaşlı mezenşimal villuslardan ya da immatür intermediate villuslardan daha sonra sitotrofoblast ve bağ doku ile istila edilecek lateral pozisyonlu trofoblastik tomurcukların gelişmesiyle oluşur. Birim trofoblastik yüzey başına düşen sitotrofoblast sayısı diğer villuslardaki değerler ile karşılaştırıldığında mezenşimal villuslarda maksimaldir. Ayrıca, mezenşimal villusların villöz sitotrofoblastlarının mitotik indeksi diğer bütün villuslardakinden çok daha yüksektir (Castellucci et al. 1990, Tedde and Tedde Piras 1978).

Gestasyonun 6ncı haftasında incelenen plasentalarda bütün villusların lateral yüzeylerinde olduğu kadar mezenşimal villusların uçlarında da çok sayıda uzun, düz trofoblastik tomurcuklar saptanmaktadır. Pek çok yerde bunlar demetler halinde rastgele yerleşmişlerdir. Tomurcukların çoğunluğu sinsisyotrofoblastiktir, bazılarında sitotrofoblastik kor bulunmaktadır (Castellucci et al. 1990).

Normal insan plasentadaki bütün villus tiplerinde üç tabaka bulunmaktadır (Wynn, 1975). Bunlar;

- Trofoblast tabakası
- Bağ doku tabakası
- Kapiller endotelyum (Vaskulogenezis başlığı altında incelenecektir).

**Trofoblast tabakası :** Trofoblast tabakasında sinsisyotrofoblast ve sitotrofoblast katmanları bulunmaktadır. Anne kanı ile ilişkide olan sinsisyal trofoblast erken plasental gelişimde oldukça kalındır.

Sitotrofoblast ya da Langhans hücreleri ise sinsisyum ve trofoblastik taban membranı arasında yer almaktadır. Langhans hücreleri poligonal yapılu büyük hücrelerdir. Nukleusları yuvarlak ya da oval, nukleolusları ise geniştir.

Gestasyonun erken dönemlerinde Langhans hücrelerinin sayısı oldukça yüksektir ve sinsisyotrofoblast tabakasının altında devamlı bir katman halinde bulunmaktadır. Gebeliğin 2inci ve 3inci trimesterinde Langhans hücrelerinin sayısının azaldığı ve sinsisyumdan çıkan sitoplazmik uzantıların bunlar arasından membrana ulaştığı saptanmıştır. Bu hücrelerin mitotik aktivitesi gestasyonun 6 ile 10uncu haftaları arasında yüksek olmakla birlikte maksimal düzey 9uncu haftada gözlenmektedir. Bölünen hücre miktarı 12inci haftadan itibaren azalmakta ve miyada kadar azalan oranlarda devam etmektedir. Gestasyonun 28-30uncu haftalarında düşük oranda mitotik hücreye rastlanırken 30. haftadan itibaren mitozla hiç rastlanılmamaktadır (Tedde and Tedde Piras 1978).

Sitotrofoblastik veya Langhans hücrelerinin iki ana fonksiyonu bulunmaktadır:

- i. İnsan koryonik gonadotropin (=hCG) üretiminde
- ii. Sinsisyal tabakanın kalınlaşmasında

Morfolojik ve histokimyasal çalışmalar Langhans hücrelerinin hCG üretim yeri olduğunu göstermiştir. Hormonun üretim ve salınım düzeyi gebelik dönemlerine göre farklılıklar göstermektedir. En yüksek değerler 8 ile 12inci haftalarda saptanırken ileri dönemlerde aniden düşmekte ve belirli bir düzeye ulaşarak miyada kadar sabit düzeyde üretilmektedir. hCG düzeyinin en yüksek olduğu dönemler ile Langhans hücrelerinin mitotik aktivitesinin yüksek olduğu dönemler birbirlerine paralellik göstermektedir. Mitotik hücre miktarı sitotrofoblastın endokrin aktivitesi ile ilişkili görünmekte ve biri azaldığında diğerinde de düşme gözlenmektedir. Ancak dikkat edilmesi gereken bir nokta vardır ki bu da; hCG düzeyi 12inci haftadan sonra düşüp belirli bir düzeye ulaştıktan sonra sabit olarak miyada kadar üretilirken, Langhans hücre sayısında devamlı azalma olmakta ve son dönemlerde hiç mitoz gerçekleşmemektedir. Bu durumda hCG üretiminin sitotrofoblastın proliferatif aktivitesinden bağımsız olarak gerçekleştiği, regülasyonda bazı humoral kontrol mekanizmalarının olabileceği öne sürülmektedir. Langhans hücrelerinden hormon salımının kontrolünde önemli rol oynayabilecek henüz çok iyi bilinmeyen bazı faktörler olabilir ki bunlardan biri anti hCG faktörüdür. In vitro koşullarda bu faktörün insan hCG'ne bağlandığı gösterilmiştir (67,118, 126).

Langhans hücrelerinin diğer bir fonksiyonu da sinsisyal tabakanın kalınlaşmasında rol oynamasıdır. Morfolojik ve otoradyografik çalışmalar Langhans hücre tabakasının sinsisyum için germinal tabaka olduğunu göstermiştir (104, 118, 126).

Ultrastrüktürel olarak sinsisyum sitotrofoblasta göre biraz daha komplekstir. Bol miktarda endoplazmik retikulum, Golgi ve mitokondrinin yanı sıra çok sayıda sekretör granüller, lipid damlacıkları ile elektron bakımından yoğun bir nukleus bulunmaktadır. Sinsisyum olgunlaştıkça mikroveziküler durumdaki endoplazmik retikulum aktif protein sentezine bağlı olarak düzleşir ve bunun devamında da protein depolaması ve transportuna bağlı olarak dilate sisternalar belirgin hale gelir. Langhans hücrelerinde ise özelleşmiş organel miktarı oldukça azdır, bol miktarda serbest ribozom bulunmaktadır (118, 126).

Plasental villusların sinsisyotrofoblast tabakasının apikal yüzeyinde iyi gelişmiş mikrovillusların bulunduğu ve bu mikrovillus membranının plasentanın pek çok önemli fonksiyonunda önemli rolleri olduğu belirtilmektedir (Teasdale and Jean-Jacques 1985). Bu fonksiyonlara örnek olarak anne ve fetus arasındaki metabolit transferinin ayarlanması (Novak 1991, Smith 1981), maternal-fetal immunolojik ilişkilerin düzenlenmesi (Faulk and McIntyre 1981) verilebilir. Mikrovillusların olgunlaşma döneminde spesifik değişiklikler

gerçekleşmektedir. Gestasyonun erken dönemlerinde bu mikrovilluslar uzun, kalın ve birbirine yakın olarak yerleşmiş yapılar iken gebelik ilerledikçe gerek boy gerekse kalınlıklarında azalma olmakta ve dağınık olarak yerleşmektedirler. İlk trimesterde  $600 \text{ milyon/cm}^3$  konsantrasyona sahip olan bu yapıların miyada yakın dönemlerdeki konsantrasyonu  $1200 \text{ milyon/cm}^3$ 'e yükselmektedir. Mikrovillusların yüzey genişletmesine ilişkin morfometrik çalışmalarda gestasyonun özellikle son dört haftası içinde mikrovillus yüzeyinde belirgin bir azalmanın olduğu ve bunun da bu dönemlerde fonksiyonel dokuda ve anne ile fetus arasındaki iletişimin gerçekleştiği alanda belirgin bir düşmeyi yansıttığı belirtilmektedir. Gerçekten de gestasyonun 36'ncı haftasından itibaren parankimal dokularda ve değişimin gerçekleştiği alan yüzeyinde bir artış olmaksızın sadece fetal büyümenin olduğu saptanmıştır (Teasdale and Jean-Jacques 1985, Novak 1991).

Yukarıda belirtilenlere bağlı olarak embriyonal dönemin başlarından itibaren normal plasentanın sinsisyotrofoblast tabakası çevresinde yoğun bir mikrovillus katman oluşumu gerçekleşmekte olup gebeliğin son dönemlerinde bu mikrovillus katmanında gerek sayı gerek genişlettikleri yüzey bakımından belirgin bir azalma olmaktadır.

**Bağ doku tabakası:** Bütün koryonik villi tiplerinin bağ doku koru iki ana tip hücreden oluşmaktadır. Bunlar fikse stromal hücreler ve Hofbauer hücreleridir. Fikse stromal hücreler de Kaufmann ve ark. (1977) tarafından mezenşimal hücreler, küçük ve büyük retikulum hücreleri ile fibroblastlar olarak gruplandırılmıştır.

Mezenşimal villusların bağ doku korunda küçük hücre kitlesi ve sitoplazmik uzantıları olan spindle benzeri hücreler baskındır ki bunlar Kaufmann ve ark. (1977) tarafından tanımlanan mezenşimal hücrelere karşılık gelmektedirler. Bunlar çoğunlukla kollajen lifler arasında bulunmakla beraber bazen sitoplazmik uzantıları ile kollajenin bulunmadığı küçük stromal kaviteleri de sararlar. Gestasyonun en erken dönemlerinde (6'ncı hafta dolaylarında) mezenşimal hücrelerin uzantıları genellikle ince, pürüzsüz ve hücre gövdesinin eksenine doğrultusunda olup komşu hücreler ile düzensiz bir ağ oluşturmaktadırlar (Martinoli et al. 1984). Mezenşimal hücrelerin egzantrik pozisyonlu oldukça dibe yerleşmiş bir nukleus, belirgin bir nukleolus ve düzensiz dağılmış kromatin ile karakterizedir. Tipik sitolojik özellikleri; elektron bakımından yoğun olan sitoplazmada çok sayıda mitokondri, granüllü ER ve büyük oranlarda poliribozomlar yer almaktadır. Mezenşim hücrelerinin yanısıra makrofaj benzeri Hofbauer hücreleri de mezenşimal villus korunda bulunurlar. Hofbauer



hücrelerinin, anne ve fetus arasındaki alışverişte oynadığı önemli roller gereği ayrı bir başlık altında değerlendirilmesi uygun görülmüştür.

### 2.2..2. Immatür intermediate villuslar

Immatür intermediate villus, gestasyonun yaklaşık 8inci haftasından itibaren mezenseşimal hücrelerin morfolojik değişiklikler göstermesiyle oluşan bir villus tipidir. Geniş bir villusdur ve gebeliğin orta dönemine kadar baskın durumdadır, daha sonra sayıca azalır ve villus ağacının büyüme zonunu temsil eder.

**Trofoblast tabakası:** Kalın, tek düze bir trofoblast tabakası bulunmaktadır. Langhans hücreleri kolaylıkla belirlenebilmektedir. Mitotik indeksin en yüksek olduğu dönemlerde olduğu için sitotrofoblast tabakası kalındır. Sitotrofoblast tabakası ile bağ doku hücreleri arasında selüler bir ilişki henüz sözkonusu değildir. Her iki hücre tipi daima kalın trofoblastik basal lamina ile ayrılmaktadır.

**Bağ doku tabakası:** Yaklaşık olarak gestasyonun 8inci haftasından itibaren mezenseşimal hücreler morfolojik değişimler göstermeye başlarlar ki mezenseşimal villusun immatür intermediate villusa transfonmasyonunun nedeni bu hücre modifikasyonudur. Devamlı artan sayıda hücre Kaufmann ve ark. (1977)'nin tanımladığı küçük retikulum hücrelerinin morfolojik özelliklerini göstermeye başlarlar ve immatür intermediate villuslarda baskın hücre tipi haline gelirler.

Küçük retikulum hücreleri oldukça geniş bir hücre kitlesi ve yelken benzeri uzantılara sahiptir. Bu küçük retikulum hücrelerinin birbirleri üzerine yerleşmeleriyle villusların dikey eksenine paralel olarak uzanan stromal kanallar sistemi oluşur ki immatür intermediate villusların spesifik özelliğidir. Kanallar farklı büyüklükte dirler ve villöz korun özellikle merkezinde çok iyi gelişmişlerdir. Bunların hemen hepsi kollajen liflerden yoksundurlar. Komşu kanallar arasındaki iletişim kolaylıkla belirlenmektedir. Bu iletişim küçük retikulum hücrelerinin yelken benzeri uzantılarındaki yuvarlak fenestrasyonlar ya da komşu yelken benzeri uzantıların kenarları tarafından belirlenen açıklıklar aracılığıyla olmaktadır. Bu açıklık bölgeler bazen ince kollajen lif demetleri ile kısmen sınırlanmışlardır. Hofbauer hücrelerinin büyük bölümü kanallar içindedir (Martinoli et al. 1984, Castellucci et al. 1984).

Immatür intermediate villusların gelişme ve farklılaşması plasental büyümenin regülasyonunda önemli bir rol üstlenmişlerdir. Kaufmann, Sen ve

Schweikhart (1979)'a göre, immatür intermediate villuslar boyca büyürler, dallanırlar ve çoğunlukla ek immatür dallar oluştururlar, çok az miktarda terminal villus oluşumu sözkonusudur. Bazı yeni oluşan dallar daha sonra açıklanacak olan matür intermediate villus tipini oluştururlar. Plasental büyüme ve maturasyon tamamıyla immatür intermediate villusların ne zaman ve ne kadarının matür intermediate villuslara dönüştüğü ile belirlenir. İmmatür tipten matür tipe farklılaşmada yetersizliğin olması devamlı büyüme ve dallanmaya neden olur, ancak terminal villus oluşumunda başarısızlık sözkonusudur. Bunun sonucunda geniş ancak farklılaşmamış plasenta oluşur. Tersine, eğer immatür tipten prematür tipe erken farklılaşma gerçekleşirse, plasental büyüme çok erken dönemde durur. Plasenta küçük kalır, fakat çok sayıda uzun, oldukça dallanmış terminal villuslar oluşur.

Gebelik ilerledikçe immatür intermediate villus tipi sayıca azalır, ancak tamamıyla ortadan kalkmaz. Bu nedenle miyadında plasentalarda az miktarda immatür tipe rastlanır. Gestasyonun 14üncü haftası dolaylarında geniş kollajen lif ağları immatür intermediate villusların proksimalindeki stromal kanalları kaplarlar. Bunun sonucunda oldukça kompakt fibröz stroma ortaya çıkar ki bu stem villusların karakteristik özelliğidir.

### 2.2.3. Stem villuslar

Stem villus bir media içeren kan damarlarına göre tanımlanan villus tipidir ve gestasyonun 14üncü haftasından sonra stromanın fibröz bir yapı kazanmasıyla oluşur.

**Trofoblast tabakası:** Trofoblast tabakası immatür intermediate villuslara göre daha ince olmakla birlikte genel yapısal özellikleri ve mikrovillusların bulunması bakımından intermediate villuslarla benzerlik gösterirler. Langhans hücrelerinin mitotik aktivitesi azalmaya devam eder. Gebeliğin 12inci haftasından itibaren bazı fetal kapillerler basal trofoblastik yüzey ile bağlantılar kurmaya başlarlar ki 14üncü haftalarda bağlantı ileri düzeylere ulaşır. Bazı bölgelerde trofoblastın derinliklerine kadar uzandıklarından trofoblast tabakasının incelmesine neden olurlar.

**Bağ doku tabakası:** Proksimal immatür intermediate villuslar yavaş yavaş stem villuslara dönüştükçe küçük retikulum hücrelerinin sayısı azalır, buna karşılık pek çok fibroblast dikkati çeker. Küçük retikulum hücreleri ile fibroblastlar arasındaki geçiş formlarının bulunması retikulum hücrelerinden

fibroblastlara geçişin bir kanıtıdır. Fibroblastlar spindle benzeri, kısa ve kalın sitoplazmik uzantıları olan hücrelerdir. Ayrıca bu hücreler çoğunlukla çok sayıda kollajen liflerle tümüyle çevrilmişlerdir.

Damar çaplarının ve kollajen lif miktarının artmasına ek olarak stromal kanalların ortadan kalkması da stem villuslarının karakteristik özellikleridir.

Stem villusların yukarıda belirtilen yapısı villus ağacına mekanik bir stabilite sağlamaktadır (18, 62, 74). İmmatür villuslarda çok miktarda gözlenen tomurcuk şeklindeki kalınlaşma stem villuslarda nadiren gözlenir.

#### 2.2.4. Matür intermediate villuslar

Gebeliğin ikinci trimesterinin son dönemlerinde dördüncü villus tipi olan ilk matür intermediate villuslar gözlenmeye başlar. Periferdeki immatür intermediate villusların dallanmasıyla oluşan matür intermediate villuslar stem ve terminal villuslar arasında uzanan bir ya da iki sıra daldan oluşurlar. Bu villuslar uzundur ve düzenli aralıklarla kıvrımlar oluştururlar. Her kıvrımda bir ya da iki terminal villus uzantısı bulunmaktadır.

Mezenşimal villus ile matür intermediate villuslar yapısal olarak birbirlerine çok benzerler. Matür intermediate villusların immatür tiplerinden direkt olarak oluştuğuna yönelik herhangi bir ipucu yoktur. Her iki intermediate villus tipi mezenşimal villuslardan köken alırlar, ancak ortaya çıkış dönemleri farklıdır. Gerçekten, yeni oluşan mezenşimal villusların immatür intermediate villuslara transformasyonu, son trimesterde matür intermediate villus oluşumunu uyarmaktadır. Mezenşimal villusun matür intermediate villusa transformasyonu minör değişikliklerle oluşur. Villus çapı ile villusların düz biçimi genel olarak aynı kalır, kapiller sayısında bir artış sözkonusudur ki bazılarında sinusoidal dilatasyon gerçekleşebilir ya da küçük perferal arteriol ve venul yapıları ortaya çıkar (Kaufmann et al. 1985). Sinsisyotrofoblastlar incilir ve sitotrofoblastik hücrelerin sayısı belirgin bir şekilde azalır ki bunlar da büyüme kapasitesinin azaldığının belirteçlerdir. İmmatür tiplerinden farkı, matür intermediate villusların stem villuslara transformasyonuna ilişkin en ufak bir belirti yoktur. Bu villuslar terminal villusların gelişiminden sorumludurlar.

Matür intermediate villusların bağ dokusu küçük ve büyük retikulum hücreleri ile karakterizedir. Geniş retikulum hücreleri oldukça hacimli bir hücre

kütlesi ve kısa yelken benzeri sitoplazmik uzantılarıyla düzensiz şekillerin oluşturulduğu hücre tipidir. Uzantıların kısa olmasından dolayı, nadiren birbirleri üzerine binerler. Bu nedenle, geniş retikulum hücreleri immatür intermediate villuslarda olduğu gibi retiküler bir yapı oluşturmazlar. Gevşek ve fibriller bir stroma vardır. Kapillerler arasındaki boşluklar doldurulur. Bu villus tipinde Hofbauer hücreleri çok nadir gözlenir (18, 23, 65, 74 ).

### 2.2.5. Terminal villuslar

Terminal villuslar, villus ağacının son dallarıdır. Enine kesitlerinde genellikle yuvarlak ile oval arası bir görünümde dirler ve ince bir trofoblast tabakası ile çevrilidirler. Trofoblast tabakası genellikle sadece sinsisyotrofoblastlardan oluşur. Sinsisyotrofoblast ve basal lamina arasında nadiren Langhans hücrelerine rastlanır.

Terminal villuslar matür intermediate villuslardan oluşurlar ve matür bir plasentadaki villusların % 95 ini oluştururlar. Lateral immatür intermediate villuslardan köken alan ve matür plasenta villuslarının %5 ini oluşturanların villöz tomurcuklar ya da erken oluşan mezenşimal villuslar olduğu belirtilmiştir (Castellucci et al. 1990).

İlk terminal villuslar, son trimesterin başlarında ilk matür intermediate villusların oluşumundan hemen sonra ortaya çıkarlar. Matür intermediate villuslardaki kapillerlerin uzunlamasına büyümesiyle kapillerler villuslardan daha uzun hale gelirler ve kıvrılıp looplar oluştururlar. Villusların düz yapılarından dolayı, looplar trofoblastik yüzeyde çıkıntılar oluştururlar ki bunlar terminal villuslardır. Terminal villuslarda trofoblast proliferasyonunun indüklenmesine bağlı olarak oluşan bir büyüme sözkonusu değildir, onun yerine kapillerlerin kıvrılmasıyla pasif oluşum gerçekleşir.

Çoğunluğu matür intermediate villuslardan olmak üzere, kısmen de stem villuslardan oluşan terminal villuslar küçük retikulum hücreleri ve nadiren fibroblastlara sahiptirler. Ancak immatür intermediate villuslarda olduğu gibi retikulum hücreleri stromal kanalları oluşturmazlar. Bu hücrelerin sitoplazmik uzantıları az gelişmiştir. Kollajen fibrillerle çevrilidirler ve fetal damarlar ile trofoblast arasındaki boşluk fetal sinuzoidlerin genişlemesiyle oldukça komprese olmuş durumdadırlar (18, 23, 89).

### 2.2.6. Hofbauer hücreleri

Hofbauer hücreleri, koryonik villus stromasının en fonksiyonel ve ilginç hücreleri olmasından dolayı ayrı başlık altında incelenmesi uygun görülmüştür.

Hofbauer hücreleri pek çok araştırmacı tarafından incelenen bir hücre tipidir ve bu hücrelerin makrofajik özelliklere sahip oldukları morfolojik (11,17,28, 74), sitokimyasal, histokimyasal (Zaccheo et al. 1982) ve immünolojik (20, 127, 129) çalışmalarla belirlenmiştir.

Hofbauer hücrelerinin orjinine ilişkin iki hipotez öne sürülmektedir:

1. Koryon villusunun farklılaşmamış mezenşimal hücrelerinden köken alırlar.
2. Hofbauer hücreleri dejeneratif elementlerdir.

Ancak hücre organellerinin özellikleri ve onların canlılıklarını korumaları bu hücrelerin aktif olduğunu göstermekte ve buna bağlı olarak ilk hipotezin geçerli olacağı öne sürülmektedir (17, 22, 28, 61).

Araştırmalar sonucu yapısal ve histokimyasal olarak Hofbauer hücreleri ile normal matür doku makrofajları arasında büyük benzerlik olduğu, fagosit gibi fonksiyon gösterdikleri ve koryonik villus korunda su ile elektrolit transportunda aktif rol oynadıkları belirlenmiştir (17, 19, 28, 35).

Hofbauer hücreleri hücre yüzeyinden uzanan sitoplazmik uzantılar ve çok sayıda sitoplazmik vakuoller ile karakterizedir. Bu sitoplazmik uzantılar ile geniş vakuoller makropinositotik aktivitenin birer belirticidirler. Bunların yanısıra Hofbauer hücrelerinin yüzeyi boyunca iç kısma tutunmuş membranlı mikropinositotik veziküller bulunmaktadır ki çok sayıdaki bu mikropinositotik veziküller hücrelerde sıvı transportunun olduğunu göstermektedir. Bu mikropinositotik veziküller ile fagolizozomlar böylece hücredeki sıvı miktarını arttırmaktadır. Belirli bir düzeye ulaştıktan sonra ekstra ve intraselüler sıvı miktarında yeni bir denge oluşur. Bunun sonucunda vakuollerde toplanan sıvı sitoplazma aracılığıyla dışarı aktarılır ve stromanın sıvı düzeyi dengelenir, vakuoller kolapse olur.

Hofbauer hücresi ekzantrik olarak yerleşmiş ve genellikle fibroblast nükleusundan daha küçük ve yuvarlak olan bir nükleusa sahiptir. Kromatin eşit olarak dağılmıştır, heterokromatin periferde yer almaktadır. Hem SER hem RER içermekte olup sisternalar dilate değildir. Ribozomlar sisterna membranları

boyunca rastgele dağılmışlardır. Ayrıca sitoplazmada serbest ribozomlar da bulunmaktadır. Golgi az gelişmiş olup nukleusa oldukça yakın bir bölgede bulunur. Hofbauer hücrelerindeki mitokondriler elektron bakımından yoğundurlar.

Gestasyonun 8-10 uncu haftaları arasındaki plasentalarda Hofbauer hücrelerinde bazı yapısal farklılaşmaların olduğu saptanmıştır. Bunlardan en önemlisi sitoplazmadan nukleusa uzanan uzun tubuller bir yapıdır. Membranla sınırlı olan bu tubuller yapı perinukleer alanı geçerek nukleusa girer.

İkinci yapısal farklılaşma ise nukleusa yakın yerde bulunan ve üç membranla sınırlanan bir yapıdır. Bu yapı elektron bakımından oldukça yoğun bir madde içermektedir.

Yukarıda belirtilen iki yapısal olarak farklılaşmış yapı Demir ve Erbenği (1984) tarafından ilk olarak saptanmış olup bu özelleşmiş yapılar ile Hofbauer hücrelerinin, koryonik villus korunun gelişme ve farklılaşmasında, villus stromasındaki düzenleyici proseslerin kontrolünde rol oynadıkları düşünülmektedir. Hofbauer hücrelerindeki ikinci tubuler yapının bulunması bu düşünceyi destekler yöndedir.

Enders ve King (1970) erken dönem plasentada, Hofbauer hücrelerinin bulunmasının, stromadaki yerleşimlerinin ve pinositotik aktivitelerinin interstisyel sıvıdan protein ve iyonların alınmasında büyük rol oynadığını belirtmişlerdir. Hofbauer hücrelerinde bulunan çubuk şeklindeki mitokondriler su ve iyon transportunu gerçekleştiren hücelere özgüdür. Bunlara bağlı olarak Hofbauer hücrelerinin fagositik aktivitelerinin yanısıra koryonik villus stromasındaki su ve elektrolit transportunda aktif bir rol üstlendikleri öne sürülebilir.

Plasentada lenfatik sistem yoktur. Fetal proteinler, plasental bariyeri geçmeden fetal sirkülasyona geri dönerler. Hofbauer hücreleri bu transportta da aktif rol oynarlar (Enders and King 1970, Demir and Erbenği 1984).

Hofbauer hücreleri tarafından alınan serbest su ve eriyebilen maddelerin molekülleri önemli birer potansiyeldirler. Bu hüceler plasentadaki su düzeyini ayarlamak veya villus stromasındaki fetal serum protein miktarını azaltmak gibi pek çok önemli prosesden sorumlu olabilirler. Anne ve fetus arasındaki regülasyondan dolayı Hofbauer hücrelerinin bu görevi çok önemlidir.

Castellucci et al. (1987), erken dönem plasentada Hofbauer hücrelerinin mitoz özelliklerini incelemiştir. Bulgulara göre; bu hücreler mitotik aktiviteye sahip hücrelerdir ve bu hücrelerin koryon villuslardaki dağılımında, makrofajların çoğalma ya da farklılaşmasını etkileyen hormon ve koloni uyarıcı faktörler gibi bazı maddelerin lokal konsantrasyonlarının etken olduğu saptanmıştır. Lokal çevrede hücre gereksinimi olması halinde hücre sayısında hızlı bir artış olmaktadır.

Sonuç olarak, villus korunun ilginç hücresi olan Hofbauer hücresi, plasental villus korunun gelişme ve farklılaşmasında, villusların vaskularizasyonunda, su dengesinin ayarlanması ve çeşitli maddelerin transportunda rol oynamaktadır. Bu hücreler intrastromal regülasyon merkezleri olarak değerlendirilmektedir.

### 2.2.7. Plasental villuslarda kapillerlerin gelişimi

Embriyonik kan damarlarının gelişimine ilişkin incelemeler geçen yüzyıla kadar uzanmaktadır (Dempsey 1972). İnsan plasentasında fetal vaskularizasyonun oluşumuna yönelik temel araştırmalar ise Boe (1953) ve Arts (1963) tarafından gerçekleştirilmiş olup (Leiser et al. 1985) matür plasental villuslardaki fetal damarların arkitekt ve ultrastrüktürel yapısı pek çok araştırmacı tarafından değerlendirilmiştir (31, 38,49, 66).

Vaskular sistem, embriyogenezisin erken dönemlerinde splanchnopleuric mezodermden farklılaşan kan adacıklarından köken almaktadır. Kan adacıklarına aynı zamanda hemangioblastlar adı da verilir, çünkü bu adacıkların merkezinde bulunan öncü kan hücreleri ile periferde farklılaşan öncü endotelyal hücreler arasında yakın bir ilişki vardır. Yolk kesesindeki pek çok adacığın gelişip birleşmesi kapiller ağını oluşturur ve sirkülasyonun başlamasından sonra regüler arteriovenöz vasküler sisteme farklılaşma sözkonusudur. In situ kan damarlarının gelişimi de embriyoda gerçekleşir. Bu damarlar vitellin (amphalomesentric) arter ve venler aracılığıyla yolk kesesine bağlanırlar (Risau et al. 1988).

Endotelyal hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını düzenleyen moleküler mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir. In situ olarak farklılaşan endotelyal hücrelerden kan damarlarının gelişimi vaskulogenezis, önceden oluşan damarlardan kapillerlerin dallanması ise angiogenezis olarak tanımlanır ve bu olaylar embriyogenezisin erken dönemlerinde oluşmakta, ayrı ayrı düzenlenmektedirler (Risau et al. 1988).

Gestasyonun 3 üncü haftası dolaylarında vaskulogenezisin ilk belirtileri gözlenmeye başlar. Bu dönemdeki villuslar pek çok yönden sekonder villuslardan ayrılırlar. En belirgin farklılıklar stromadaki hücrelerde gözlenir. Bu dönemdeki tersiyer villuslarda mezenşimal ve Hofbauer hücrelerine ek olarak üçüncü grup hücre olan hemangiogenetik hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler birbirleri arkasına dizilerek küçük yuvarlakımsı ya da kord benzeri demetler oluştururlar. Mezenşimal hücrelere göre daha az sitoplazması olan bu hücrelerde az miktarda RER, mitokondri ve oval ya da uzamış nukleus bulunmaktadır. Bu hücrelerin en çarpıcı özellikleri interselüler ilişkilerdir. Komşu hücrelerin membranları arasında ya kısa spot benzeri ya da uzun bant benzeri bağlantılar ile interselüler yarıklarda köprüler oluşturulur. Hemangioblastik hücre gruplarının ortasında, interselüler yarıklarda dilatasyonun oluşması ve bunların düzensiz olarak dağılmasıyla primitif lumen gelişir. Bu interselüler yarıklardaki fokal genişlemeler birleşerek geniş lumen haline gelirler. Bu dönemde trofoblastik tabaka altında belirgin bir basal lamina bulunurken, hemangiogenetik hücreler ile direkt ilişkide olan endotelyal basal laminaya rastlanmaz. Ancak mezenşimal hücreler ile hemangiogenetik hücreler arasındaki ekstraselüler matriksde oldukça yoğun bir madde birikimi vardır ki bu basal lamina materyaline benzer ekstraselüler maddedir.

Gestasyonun 4üncü haftasından itibaren vaskulogenetik fenomenin gerçekleşmediği primer ve sekonder villus çok nadiren gözlenir. Villusların hemen hepsinde kapiller oluşumun ilk belirtileri başlamıştır. Bu dönemde mezenşimal ve Hofbauer hücreleri yapısal olarak büyük farklılıklar göstermezken hemangioblastik hücre gruplarında oldukça belirgin değişiklikler saptanır. Kolaylıkla gözlenebilen geniş bir poligonal lumen oluşumu sözkonusudur. Çevredeki endotelyal hücrelerin çoğunluğu düzleşmiştir. Basal lamina gelişimi henüz yoktur. Direkt olarak lumenle ilişkili olan öncü endotelyal hücrelerde organel oranı oldukça düşüktür. Ayrıca öncü damarların enine kesitlerinde yeni bir hücre grubuna daha rastlanılır. Bu poligonal bağ doku hücrelerinde çok iyi gelişmiş dilate olmuş RER'un bulunması karakteristik bir özelliktir. Bu hücrelerin düz uzantıları ya komşu mezenşimal hücrelerle ya da damar duvarı ile ilişkidirler. Bu hücreler öncü perisitlerdir. Perisitler, sitoplazmik uzantıları ile endotelyal hücrelere desmozomlar ile bağlanırlar ve kapiller lumenini döşerler. Bu dönemde, ilk defa olarak gelişmekte olan kan hücre demetlerine rastlanılır. Bunların çoğu öncü damar lumeni içindedirler.

Gestasyonun 6ıncı haftası dolaylarında, ilk defa kapiller basal lamina oluşumuna ilişkin belirtiler ortaya çıkar. Endotelyal hücreler ile perisitlerin dış yüzeyleri ve interselüler yarıklarda lokal olarak konsantre olan ekstraselüler



matriks belirginleşir. Bu materyal öncü basal lamina olarak değerlendirilmektedir. Hücrelerin basal lamina ile tamamıyla sarılması ancak gestasyonun 10uncu haftası dolaylarında gözlenir. 12inci haftadan itibaren bazı fetal kapillerler basal trofoblastik yüzeye ilişki kurarlar. Bazı bölgelerde trofoblastın dip bölgelerine kadar uzanarak trofoblastı lokal olarak ince lamellar bir yapı haline getirirler ki bu yapıya epitelyal tabakalar ya da sinsisyo-kapiller membran adı verilir.

Gebeliğin son 10 haftası içinde kapillerleri çeviren tam bir basal lamina gelişir. Bu basal lamina sadece endotelyal kanalı değil perisitleri de tümüyle çevreler. Gestasyonun erken dönemlerinde hemangioblastik hücrelerle gerçekleşen kapiller oluşumu gestasyonun son periyodunda yerini angioblastlara bırakır. Kapiller tomurcuklar çok küçük lumen ile karakterizedir. Bu tomurcuklarda angioblastik hücreler görülür ki bu hücreler elektron bakımından yoğun bir sitoplazma ile çok sayıda ribozom, bir miktar mitokondri ve çok az da granüllü endoplazmik sisterna ile karakterizedir.

İmmatür villusların stromasında az miktarda düzenli olarak dağılmış dar, sinuzoidal olmayan kapillerlere rastlanırken stem villuslar arter, arteriol, ven ve venüllerle karakterize olmaktadır. Ayrıca dar kapillerler tarafından oluşturulan paravasküler ağ da geniş çaplı stem villuslarda gözlenmektedir. İmmatür intermediate villusların farklılaşması ile oluşan matür intermediate villuslar bir iki terminal arterioller, bir-iki postkapiller venüller ile bir kaç tane kıvrımlar oluşturan ve çoğunluğu dar olan kapillerler ile karakterizedir ki bu kapillerlerin bir bölümü paravasküler ağı oluştururlar. Bazı bölgelerde bu kapillerler sinuzoidal dilatasyonlar gösterirler. Diğer kapillerler terminal villusların kapiller kıvrımlarını oluşturarak devam ederler. Matür intermediate ve terminal villusların en çarpıcı özellikleri sinuzoidlerdir, yani dilate kapillerlerdir. Villus uçlarında bulunan sinuzoidler kan akımını yavaşlatarak maternal-fetal değişimin yeterli düzeyde olmasını sağlamaktadır ( 29, 64, 72).

Gestasyonun 4-5inci aylarında desiduada intervillöz boşluklara doğru uzanan ancak hiç bir zaman koryonik plağa ulaşmayan yarıklar vardır. Bu yarıklar maternal dokudan oluşmakla birlikte yüzeyi sinsisyal hücrelerle çevrili olup intervillöz boşluklardaki maternal kanın fetal dokudan ayrılması sağlanır. Bu yarıklar oluşumu sonucunda, plasenta pek çok kompartmana ayrılmıştır ki bunlara kotiledonlar adı verilir.

Kotiledonlar intervillöz boşluklara giren arterlerden kanı alır. Arterlerin lumeni dardır ve böylece intervillöz boşluğa kanın büyük bir basınçla girmesi sağlanır. Bu basınç kanın intervillöz boşlukların diplerine kadar gitmesini ve pek

çok villusun oksijenli kan ile karşılaşması sağlanır. Basınç azaldıkça kan koryonik plakadan desiduaya doğru geçerek endometrial venlere girer. Böylece intervillöz boşluklardan gelen kan endometrial venler aracılığıyla maternal sirkülasyona geri döner (68, 72, 104).

### 2.2.8. İnsan plasental villusundaki morfometrik analizler

Embriyonik dönem plasentası ile fetal dönem plasentasının gelişimine yönelik morfometrik analizlerde, gelişen villus sayısının gestasyonun 6 ile 15inci haftaları arasında maksimum düzeyde olduğu, buna karşılık tomurcukların fetal periyoda göre embriyonal dönemde çok daha fazla sayıda ve daha uzun oldukları saptanmıştır. Gestasyonun 3üncü ayından sonra tomurcuklanma kapasitesinde belirgin bir azalma görülmektedir (Januiaux et al. 1991).

Gelişmekte olan villus, kalın sinsisyotrofoblastik tabaka, onun altında süreklilik gösteren sitotrofoblast katmanı ve en iç kısımda ise mezensimal hücre ve kapiller bakımından zengin gevşek bir stroma ile karakterizedir. Oksijen ya da CO<sub>2</sub> gibi gaz transportunun olduğu erken dönem plasentanın fonksiyonel terminal villusları ile gelişmekte olan villuslar karşılaştırıldığı zaman villöz bariyer kalınlığı ile trofoblastik tabaka kalınlığının gebelik ilerledikçe eksponensiyel bir azalma gösterdiği, embriyonik ve fetal dönemler arasında anlamlı farklılıkların olduğu saptanmıştır. Sitotrofoblast hücreleri sinsisyotrofoblast tabakasının altında devamlı bir tabaka halinde bulunurlar. Ancak gebelik ilerledikçe bu hücreler daha az belirgin hale gelirler. Bu olayın erken dönem plasentanın trofoblastik kalınlığının azalmasında etkisi çok büyüktür. Bariyer kalınlığını etkileyen önemli değişikliklerden biri de villus vaskularizasyonunda gerçekleşir. Villus başına düşen kapillerlerin sayısı ile fetal kapillerler tarafından kaplanan villus hacminde artış gözlenir (12, 53, 117).

Kapillerlerin trofoblast yüzeye oranı terminal villuslarda maksimumdur. Stem villusda bu oran azalırken immatür ve matür intermediate villus tiplerinin her ikisinde de vaskularizasyon çok azdır. Kapillerlerin trofoblast yüzeyine oranı ile ortalama difüzyon uzaklığı terminal villusların gaz alışverişindeki aktif rolünü yansıtmaktadır. Terminal villusdaki epitelyal tabaka uzunluğu, ortalama trofoblastik kalınlık ile ortalama difüzyon uzaklığı gaz değişimi için optimal değerleri göstermektedir (Sen, Kaufmann and Schweikhart 1979).

Langhans hücrelerinin genel trofoblast hacmi ile villöz yüzeye oranı tüm villus ağacı boyunca hemen hemen sabit kalmaktadır. Bu gebeliğin son

dönemlerine kadar villus ağacının bütün bölümlerinde belirgin bir trofoblast regenerasyonunun olduğunu göstermektedir.

Villusların enine kesitlerinin çap ve uzunluk arasındaki oranı villus tipleri arasında belirgin farklılıklar göstermekte, villus hacminin villus sayısına oranı ise çeşitli villus tiplerinde fonksiyonel farklılıkların olduğunu belirtmektedir. Ortalama çap, kapiller yüzey ve hacim, trofoblastik kalınlık ve hacim ile ortalama damar lumen alanı villus tiplerinin belirlenmesinde morfometrik olarak en belirleyici parametrelerdir. Ancak bu parametrelerden sadece birine dayanarak villusların kategorize edilmemesi, bütün parametrelerin birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (53, 107, 117).

Bütün villus tipleri arasında değerlendirilen parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmektedir. Terminal villuslarla matür intermediate villuslar arasında özellikle ortalama çap, kapiller yüzey ve Hofbauer hücre sayısında anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Çapları bakımından birbirleriyle hemen hemen aynı olan immatür intermediate villuslarla stem villuslar arasında kapiller yüzey, kapiller hacim ve Hofbauer hücre sayısında farklılıklar bulunmaktadır (Sen, Kaufmann and Schweikhart 1979, Burton 1987).

### 2.3. Plasental Düzensizlikler

İnsan plasentası öyle iyi gelişmiş bir yapıya ve öyle iyi düzenlenen bir organizasyona sahiptir ki anne ile fetus arasında mükemmel bir bağlantı sağlanır. Anne kanı ile fetus kanı daima birbirinden ayrı kaldığı halde anne kanından fetusa beslenmesi için gerekli maddeler plasenta aracılığıyla geçer. Fetusta oluşan yıkıntı maddeleri de yine bu yoldan dışarı atılırlar. Fetusun gelişimi için gerekli olan böyle bir organizasyonda normal koryon villus gelişimi ve maturasyonunun çok önemli olduğu tartışma götürmeyen bir gerçektir.

Araştırmacılar normal gebeliklerin yanısıra patolojik gebeliklerde de plasental yapıyı gerek ışık mikroskobu gerekse elektron mikroskobu ile değerlendirerek patolojik gebeliklerdeki plasental düzensizlikleri belirlemişlerdir (5, 30, 37, 65, 76, 88, 90, 93, 98, 103, 106).

Plasental büyüme ve maturasyonu belirleyen faktörler matür intermediate villusların ne zaman ve hangi düzeyde immatür tiplerinden geliştiğidir. Diğer bölümlerde belirtildiği gibi, immatür intermediate villuslar villus ağacının uzunlamasına büyüme ve dallanma segmentleri olup matür plasentada sadece küçük gruplar halinde ve villus ağacının merkezinde bulunurlarken immatür

plasentanın öncü villusları olarak görev yaparlar. Matür intermediate villuslar ise stem villus dallarıdır. Terminal villuslara dönüşme şansları yoktur. Ancak yüzeyleri boyunca sadece terminal villus üretirler.

Miyadındaki bir gebelikte immatür villuslardan matür villus gelişiminde bir gerilik sözkonusu ise bu patolojik durum plasental immaturite olarak yorumlanmaktadır. İmmatür villuslar büyümeye ve dallanmaya devam ederler. Villus ağacı ve bunlarla birlikte tüm plasenta oldukça büyük olmakla birlikte terminal villus oluşturmada yetersiz kalacaktır.

Diğer patolojik durum, özellikle prematür doğumlarda yüksek sıklıkta rastlanan erken dönemde matür olan plasentadır. Gestasyonun 35inci hafta dolaylarında matür plasentada bol miktarda terminal, az miktarda matür intermediate ve bir kaç tane de immatür villus bulunur. Ancak gestasyonun daha erken dönemlerinde plasenta bu özellikleri kazanıp doğuma hazır duruma gelir ve bunun sonucunda prematür doğum gerçekleşir.

Hipermatürite gestasyonun her döneminde gerçekleşen plasental villus ağacının anormal gelişimidir. İmmatür intermediate villuslar gestasyonun çok erken dönemlerinde matür tiplerine dönüşür. Matür villuslar ise çok sayıda terminal dallar oluştururlar. Bunun sonucu, plasental büyüme zonu olan immatür intermediate villuslar kaybolur, villus ağacı ve tüm plasenta küçük kalır. Prematür olarak oluşan matür intermediate villusların terminal villusları üretmesi için uzun bir süre gerekecektir. Buna bağlı olarak bol miktarda, uzun, aşırı düzeyde dallanmış ve hatta düzensiz bir şekil almış terminal villuslar oluşacaktır (Şekil 2.4).

Diğer bir patolojik plasenta ise terminal villus eksikliğidir. İmmatür villusdan matür intermediate villusa transformasyon normal iken matür villuslardan terminal villus üretiminde bir düzensizlik olmakta, bunun sonucu matür intermediate villus dominant villus popülasyonu olarak gelişir (Şekil 2.4) (63, 65, 106, 114, 121).

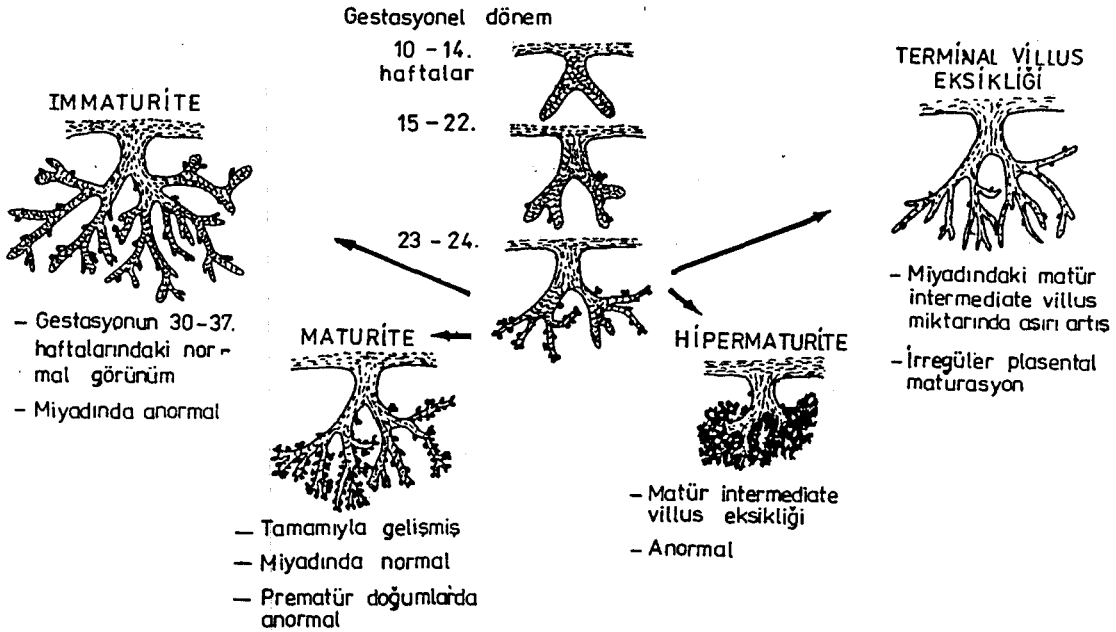
Biagini ve ark. (1989) plasental maturasyonda gerçekleşen morfogenetik olayların başında ortaya çıkan villus ağacının yüzeyinde hem stem hem de intermediate villuslardan orjin alan küçük villöz çıkıntıları inceleyerek plasentanın morfogenetik potansiyelini ve yayılma yeteneğini değerlendirmişlerdir. Bulgularına göre, normal miyadındaki plasentaya göre erken dönem plasentada yüzeyde bulunan yarık miktarı çok daha azdır. Hipertensiv plasentalarda yaptıkları incelemelerde bu yarık miktarının arttığını,

Kaufmann ve ark. (1987) ise hipertensiv olguların plasentalarında hipermatüritenin gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Patolojik durumlarda plasentada yapılan incelemelerde araştırmacılar erken gebelikteki hormonal dengenin villus maturasyonunu ve dolayısıyla gestasyon süresini etkileyebileceğini öne sürmektedirler ki bu varsayım hayvan deneylerinde de doğrulanmıştır (Schweikhart, Kaufmann and Beck, 1986)

Gebelikte sigara içiminin perinatal ve neonatal mortalite oranını arttırdığı ve bu komplikasyonların da plasental harabiyetle ilişkili olduğu belirtilmektedir. Sigara içimi ve plasentanın ultrastrüktürel yapısı arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çalışmada fokal sinsisyotrofoblastik nekroz, pinositotik aktivitenin azalması, mikrovillus harabiyeti, sitoplazmik membran harabiyeti, trofoblast membranının kalınlaşması, endotelyal büzülme ve basal lamina kalınlaşması ile sigara içiminin ilişkili olduğu belirtilmiştir (Demir and Üner 1990).

Plasental morfolojinin ve ultrastrüktürel yapının değerlendirildiği diğer bir patolojik durum ise erken ve geç dönem fetal ölümlerdir. Bu konudaki çalışmalar 1960 lı yıllara kadar uzanmakla birlikte fetal karyotipe bağlı olarak gerçekleştirilen elektron mikroskopik analizler son yıllarda üzerinde durulan bir konu haline gelmiştir.



Şekil 2.4. Koryonik villusların gestasyonel dönemlere göre gelişimi ve düzensizlikleri

## 2.4. Spontan Abortus (SAB)

SAB gestasyonun 20inci tam haftasından (139uncu gün) önce doğum prosesinin sona ermesidir. Bu da 500 gr. dan daha hafif olan infantın canlılığını yitirmesi, fetus ile plasentanın hepsinin ya da bir bölümünün dışarı atılmasıdır. Erken abortus gestasyonun 12inci haftasından önce, geç dönem abortus ise 12 ile 20inci haftalar arasında gerçekleşen abortuslardır.

### 2.4.1. SAB çeşitleri

1. Complete abortus: Gestasyonun 20inci haftasından önce bütün konsepsiyon ürünlerinin kaybıdır.

2. Incomplete abortus: Gestasyonun 20inci haftasından önce konsepsiyon ürünlerinin bir bölümünün kaybı olarak tanımlanır.

3. Threatened abortus: Gestasyonun 20inci haftası öncesinde uterus kasılmaları olmadan ya da uterus kasılmalarıyla birlikte konsepsiyon ürünleri dışarı atılmadan ve serviks dilatasyonu olmaksızın intrauterin orjinli kanamalardır.

4. Inevitable abortus: Gebeliğin 20inci haftasından önce konsepsiyon ürünleri atılmadan serviksin devamlı ve kademeli dilatasyonu ile gerçekleşen intrauterin orjinli kanamalardır.

5. Missed abortus: Gebeliğin, fetusun in utero ölümünden sonra iki ay ya da daha uzun süre devam etmesidir. Herhangi bir abortus nedeni sorumlu olabilir ancak missed abortus gebelik ikinci trimestere ulaşıncaya kadar ortaya çıkmaz. Annenin fetusu niçin atmadığı bilinmemektedir, ancak gebelik kaybını önlemek için eksojen olarak verilen progesteronların sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

6. Enfekte abortus: Genital organların enfekte olması ile bağlantılı abortus türüdür.

7. Septik abortus: Maternal sirkülasyon aracılığıyla enfeksiyonun yayılmasına bağlı olarak oluşan abortustur.

Tanısı konamayan (subclinical) abortuslarda gebeliğin henüz farkına varılmadan sonlanması sözkonusudur. Spontan abortus genellikle embriyo ya da fetusun ölümünden 1-3 hafta sonra ortaya çıkar.

Reprodüktif kayıp spektrumu değerlendirildiğinde spontan abortus en büyük bölümü oluşturmaktadır (% 15-40). Diğer nedenler infertilite (% 15), prematürite (% 10), fetal ölüm (% 1), ektopik gebelik (% 1) ve neonatal ölüm (% 1)dür.

#### 2.4.2. SAB insidansı

SAB insidansı tam olarak bilinmemekle beraber tüm gebeliklerin en az % 15-40 kadarı SAB ile sonlanmaktadır. SAB ile sonlanan gebeliklerin %75 kadarı gestasyonun 16'ncı haftasından önce, bunların da % 62 kadarı 12'inci hafta öncesinde gerçekleşir. Tanısı konamayan SAB oranı % 8 olarak belirtilmekle beraber bu oranın daha yüksek olduğu kabul edilmektedir.

SAB insidansını etkileyen en önemli faktör anne yaşıdır. Carr (1971) 44 yaşın üstündeki annelerde SAB insidansının %36 olduğunu bildirmiştir. Gestasyonun çok erken dönemlerindeki abortuslar da dikkate alındığında SAB oranı artmaktadır. İmplantasyon öncesi ve implantasyon sonrası erken dönemler değerlendirildiğinde, % 30 kadar gebeliğin henüz farkedilmeden sonlandığı saptanmıştır ki bu orana % 15 dolaylarındaki klinik abortuslar da dahil edilirse SAB insidansı %45 düzeyine ulaşmaktadır (9, 15, 16).

#### 2.4.3. SAB'ın etiolojisi

SAB nedenleri içerisinde en büyük grubu kromozom anomalileri oluşturmaktadır ki bu faktör ayrı başlık altında değerlendirilecektir. SAB'ın diğer nedenleri daha düşük oranlardaki kayıplardan sorumludurlar. Genetik anomalilerden sonra etken olan en büyük grup "bilinmeyenler" grubudur. SAB'a neden olduğu bilinen düşük insidansda seyreden faktörler şöyle sıralanabilir:

##### a. Ovular faktörler

Ovular faktörler genellikle ilk trimester abortuslara neden olurlar. Bunlar

i. Anormal plasenta formasyonu (Örnek: Hipoplastik trofoblast)

ii. Embriyo lokalizasyon anomalisi

iii. Embriyo ya da koryonik kavitenin konjenital eksikliği.

Gebeliğin ikinci trimesterinde etkili olan ovular faktörler ise sifilis, embriyonun yüzeye implante olması ve eritroblastosistir.

#### b. Maternal Faktörler

SAB'a neden olan maternal faktörler daha çok ilk trimesterin son dönemleri ile ikinci trimesterde etkili olmaktadır. Bunlar 5 grup içerisinde değerlendirilebilirler.

i. Sistemik hastalıklar: Herpes simplex virus 2 tipi, rubella virüsü, T soyu mycoplasma, toxoplasma gondii, sitomegalovirus gibi maternal enfeksiyonlar

Diabetes mellitus, hiper ve hipotiroidizm

Kardiyovasküler-renal hipertansif hastalıklar

Sistemik lupus eritromatozis gibi bağ doku hastalıkları

ii. Protein ve vitamin yetersizliği

iii. İmmünolojik düzensizlikler:

- Kan grubu uyumsuzluğu

- Benzer maternal ve paternal HLA fetusun maternal immünolojiyi yetersiz düzeyde tanınmasına neden olmakta ve abortus olasılığını arttırmaktadır.

iv. Toksik faktörler: Talidomid, folik asit antagonistleri, antikoagulanlar, maternal hipoksi

v. Uterus defektleri

Uterus kavite büyüklüğünü azaltan konjenital anomaliler

Çeşitli uterus tümörleri (özellikle submüköz ya da intramural miyomlar)

Uterus malpozisyonu

Sezeryanı takiben uterus duvarındaki çatlamlar

Önceki gebelik sonucu uterus serviksini anatomik ya da fonksiyonel yetersizliği ikinci trimester abortusdan sorumludur.

## 2.5. Genetik Düzensizlikler ve Abortus

Kromozom düzensizlikleri ile belirli klinik sendromlar arasında yakın bir ilişki olduğunun belirlenmesi ve bunu takiben iki yeni kromozom anomalisinin



letal etkiye sahip olduğunun saptanması (trizomi 17 veya 18 ile trizomi D olarak belirtilmiştir) ileri düzeydeki kromozom düzensizliklerinin letal etkili olduğu hipotezini ortaya atmıştır. Bu arada iki abortus materyalinde gerçekleştirilen kromozom analizinde triploidinin gözlenmesi bu hipotezi doğrulamış ve 1963 den itibaren abortus materyalleri sitogenetik yönden değerlendirilmeye başlanmış olup (4,5) günümüze kadar devam etmiştir ( 33, 34, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 71, 90, 91)

SABlarda gerçekleştirilen sitogenetik analizler, çeşitli etnik ve yaş gruplarında kromozom anomali oranlarının saptanması, bunların etiyojilerinin ve tekrarlama risklerinin belirlenmesi, belirli mutajenlerin etkilerinin değerlendirilmesi yönünden büyük olanaklar sağlamaktadır (3, 33, 34, 39, 42, 43, 57, 71, 73, 84, 85, 91, 96)

İnsanda klinik olarak tanısı konan gebeliklerin en az % 15-20 kadarı 20inci haftadan önce spontan abortusla sonlanmaktadır (2,5,7,21,30). Günümüze kadar gerçekleştirilen geniş çaplı araştırmalar değerlendirildiğinde abortus materyalindeki kromozom anomali insidansı % 19 (Andrews 1984) ile % 69.4 (Ohno, Maeda and Matsunobu 1991) arasında değişik oranlarda saptanmıştır. Kromozom anomali insidansındaki bu geniş aralık için değişik faktörlerin etken olabileceği belirtilmektedir Bunlardan biri coğrafik dağılımdır. Çeşitli sendromların görülme sıklıklarının popülasyondan popülasyona farklılık göstermesine bağlı olarak coğrafik varyasyonun abortuslardaki anomali oranında da etkili olabileceği öne sürülmektedir (9, 15, 34, 73, 95).

Kromozom anomali insidansı gestasyonun erken dönemlerinde en yüksek iken, gebelik ilerledikçe anomali oranında bir azalma olmaktadır, yani ileri düzeydeki kromozom düzensizlikleri embriyonun canlılığını korumasını önlemekte ve dolayısıyla embriyo gestasyonun erken döneminde atılmaktadır. Araştırmacılar gestasyonun dördüncü ayna kadar olan abortusların % 50-60 kadarında kromozom anomalisinin gözlendiğini, dördüncü-beşinci aylarda bu oranın %25 lere düştüğünü bildirmişlerdir (9, 15, 16, 33, 34, 39, 42, 73, 83, 91, 95). Bu nedenle incelemeye alınan örneklerin gestasyonel yaşları anomali insidansını büyük oranda etkilemektedir.

Trizomik olguların büyük bölümünde en çarpıcı özelliğin ileri maternal yaş olduğu pek çok araştırmacı tarafından doğrulanmıştır. Bu gerçek doğrultusunda, abortuslardaki anomali insidansını etkileyen en önemli faktörlerden biri de maternal yaştır. Özellikle 13-22inci kromozomlara ilişkin trizomiler ileri yaştaki annelerin materyallerinde gözlenmektedir (34, 41, 43, 45, 91).

### 2.5.1.SAB'larda gözlenen kromozom anomali tipleri

SAB'larda gerçekleştirilen sitogenetik analizlerde, % 90 oranında sayısal anomali gözlenmektedir ki bunların % 45 kadarı trizomi, % 25i Monozomi X ve % 20 kadarı da poliploididir. Yapısal kromozom anomalileri de tüm anomalilerin ancak %10 kadarını oluşturmaktadır (15, 91, 132).

Trizomi abortuslarda en çok gözlenen sayısal kromozom anomalisidir. Trizomi 13,14,15,21 ve 22 gibi anne yaşına bağlı olarak oluşan trizomilerin yanı sıra trizomi 4,9 ve 16 gibi yaşla ilişkisi olmayan trizomiler de abortuslarda gözlenmektedir.

Genel olarak büyük kromozomlara göre küçük kromozomların trizomi oranı çok daha yüksektir. Trizomik fetuslarda gestasyonel yaş değerlendirildiğinde ortalama yaş  $10.5 \pm 0.5$  olarak saptanırken bu sürenin büyük kromozomlarda daha kısa, E ve G grubu kromozomlarda ise daha uzun olmaktadır (15, 16, 42, 45)

Trizomik abortusların % 70 kadarı maternal orjinli olup bunların büyük bölümünün birinci mayotik bölünmedeki hatalardan kaynaklanmaktadır (Niikawa 1977, Hassold ve Matsuyoma 1979).

SAB'ların sitogenetik yönden değerlendirilmesinde en çok saptanan ikinci sayısal düzensizlik % 25 oranında gözlenen Monozomi X dir (Boue and Boue 1985). Canlı doğumlar arasında görülme sıklığı 0.06-0.2/1000 ( Canki, Warburton and Byrne 1988) ve sitogenetik yönden tanısı konabilen bütün monozomi Xli gebeliklerin ancak %0.5 kadarı miyada kadar devam edebildiğinden monozomi X letaldir.

Trizomilerin aksine monozomi X karyotipi ile maternal yaş ters orantılıdır. Monozomi X mekanizması henüz bilinmemektedir. Ancak anne yaşının ileri olmamasından dolayı, monozomi X düzensizliğinin maternal mayotik kromozom ayrılamamasından ileri gelmediği kesindir (Kajii and Ohoma 1979, Warburton et al. 1980). Erken dönem mitotik bölünme sırasında seks kromozomunun kaybı daha olası gözükmektedir (Cankı, Warburton and Byrne 1988).

SAB'larda gözlenen sayısal anomalilerde üçüncü sırayı poliploidi almaktadır. Abortuslarda triploidinin görülme sıklığı tetraploidinin yaklaşık 4 katı kadardır, ancak tetraploidi triploidiye göre daha letaldir. Triploidik abortuslara gestasyonun son dönemlerinde de rastlanırken tetraploidik fetuslar 75inci gün dolaylarında abort olmaktadır (15, 34, 91, 131).

SAB'ların rutin olarak karyotiplenmesinin avantajlarından biri çiftlerin daha sonraki gebelikleri için bilgilendirilmeleridir. Alberman (1981) abortusda bulunan trizomi ile önceki ya da sonraki trizomik canlı doğumlar arasında bir ilişki olduğunu ortaya atmıştır (Kline 1986'dan). Durfee and Pernoll (1991) ilk gebelik normal karyotipli abortusla sonuclandığında, ikinci gebeliğin %50 olguda anomalili olacağını, anomalili karyotipin saptandığı abortusu takiben ise ikinci gebeliğin %80 olasılıkla yine anomalili olacağını bildirmiştir. Buna karşılık normal parental karyotiplerin bulunduğu ve ileri maternal yaş faktörünün olmadığı durumlarda önceki abortusların normal veya anomalili olması daha sonraki gebelikler için herhangi bir ipucu sağlayamayacağı pek çok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir (43, 71, 84, 115, 124).

## 2.6. SABlarda Plasenta

Kaufmann et al. (1987) gestasyonun 8-20inci haftaları arasında gerçekleşen abortuslarda kalın, immatür intermediate villusların bulunduğunu, çok sayıda sinsisyal tomurcukların gözlendiği buna karşılık terminal villuslara hiç rastlanılmadığını belirtmişlerdir.

Biagini et al. (1989) 8 ile 12inci haftalar arasında abort olan plasentalarda gerçekleştirdikleri ultrastrüktürel analizlerde dallanma düzeyi çok düşük olan stem villusların belirgin olduğunu, ancak plasentanın intermediate ve terminal villuslara dallanmasının belirteci olan yarıkların henüz bulunmadığını gözlemişlerdir. Bunlara ek olarak sinsisyotrofoblastların yüzeyinde bulunan mikrovillusların sayısında azalma vardır ki bu gaz ve besin alışveriş yüzeyinin yetersiz olduğunun belirtisidir. Plasentanın yetersiz olması fetusun gelişimini etkileyerek gelişme geriliğine ve daha ileri düzeyde fetus ölümüne neden olabilmektedir (8, 58,69).

Fujikara, Ezaki and Nishimura (1971) spontan abortusları koryonik villuslar ve sinsisyal tomurcuklar bakımından normal grup olarak değerlendirdikleri induced abortuslarla karşılaştırmışlardır. Koryonik villus sayısı bakımından her iki grup arasında farklılığın olmadığını, dolayısıyla anormal villus gelişiminin SAB'a neden olan primer faktör olarak değerlendirilemeyeceği sonucuna varmışlardır. Buna karşılık Honore ve ark. (1976) normal ve anormal karyotipli abortuslardaki plasental morfolojiyi değerlendirmiş, anormal karyotipli örnekleri trizomi, triploidi, tetraploidi ve Monozomi X olarak 4 ana gruba ayırarak plasental özellikleri incelemişlerdir. Değerlendirmeleri sonucunda heteroploidinin fenotipik ifadesindeki bozulmalarda plasental düzensizliklerin etkisinin belirgin olduğu sonucuna varmışlardır.

Kromozom aberasyonlu spontan abortuslarda avasküler villuslu küçük plasenta, özellikle triploidilerde villus stromasındaki sitotrofoblastik birikimler ve plasental villuslardaki hidatid dejenerasyon erken ve geç dönem fetal ölümlerle bağlantılı olabileceği öne sürülerek kromozom anomalili abortus örneklerinde plasentanın gerek histolojik gerekse ultrastrüktürel yapısı detaylı olarak değerlendirilmiştir (78, 88, 93, 98, 103).

Ornoy et al. (1981) hidatid dejenerasyonun 12 haftadan daha küçük abortuslarda yoğunlaştığını, trizomi ve triploidinin saptandığı erken gestasyonel abortusların koryonik villuslarında atipik stromal hücrelerin bulunduğunu, gebelik süresi ilerledikçe (13-18inci haftalar) hidatid dejenerasyonunun azaldığını, buna karşılık inflamatör plasental lezyonların gestasyonel yaş ilerledikçe arttığını bildirmiş ve orta dönem spontan abortus etiyojisinde plasentanın inflamatör lezyonlarının önemli rolü olduğu sonucuna varmışlardır.

Novak et al. (1988) ilk trimester abortuslarda karyotipe bağlı olarak yaptıkları histolojik analizlerde normal ve anomalili karyotipler arasında hidropik villus değişimi, fibröz villus oluşumu, atipik stromal hücre insidansı ve lenfosit birikiminin bulunmasına ilişkin değerlendirmelerinde herhangi bir farklılık saptamamışlardır. Ancak villus koruna doğru trofoblastik invajinasyonun anormal karyotiplerde, özellikle de triploidik plasentalarda arttığını bildirmişlerdir.

Kromozom anomalili abortuslarda plasentanın histolojik yönden değerlendirilmesinin bir nedeni de sitogenetik analizi gerçekleştirmeden sadece histolojik değerlendirme ile anomalili abortusun saptanıp saptanamayacağını belirlenmesidir (Novak 1988, Minguillon et al. 1989). Honore et al. (1976) sadece plasental histoloji değerlendirilerek %80 doğru karyotipik tanıya ulaştıklarını belirtirken Muntefering et al. (1987)'in başarı oranı %67 olarak belirtilmiştir (Minguillon et al. 1989'dan). Minguillon ve ark. (1989)'nın erken dönem SAB örneklerinde sitogenetik analizlere paralel olarak 187 farklı kriterin değerlendirildiği histolojik analizlerde, doğru karyotipik tanıya ulaşma başarıları %55 olarak bildirilmiştir..

Rehder ve ark. (1989) ise kromozom analizi yapılmadan kromozom düzensizliğinin belirlenmesini sağlayacak spesifik morfolojik kriterlerin bulunmadığını, plasental morfolojinin kromozom düzensizliğinin tipinden çok şiddeti ve ortaya çıkışına bağlı olduğu, anormal villus yapısının anomalili karyotipte gözleneceği gibi normal karyotipte de bulunabileceğini bildirmişlerdir.

Erken gestasyonel dönemde plasentanın normal gelişimi Burton (1987) tarafından elektron mikroskopik olarak incelenmiş, Röckelein et al. (1990) ise erken dönem abortuslarda plasental villusların yüzeyini ve dallanmasını karyotip verileri ile birlikte değerlendirmiş olup anomali karyotipli villusların değerlendirilmesinde üç boyutlu incelemenin daha güvenli olacağı, belirli kromozom düzensizliklerine özgü spesifik morfolojik değişikliklerin saptanabileceğini bildirmişlerdir.

## 2.7. Koryonik Villusların Sitogenetik Analizlerde Kullanılması

Gestasyonun erken dönemlerinde gerçekleşen abortusların sitogenetik yönden değerlendirilmesi embriyonun kendisinin değerlendirilememesi nedeniyle ileri dönem abortuslara göre daha geç başlamıştır. Her ne kadar trofoblast dokusunun prenatal tanıda kullanma fikri 1964 lere kadar uzasa da trofoblast dokusunun kültüründe karşılaşılan zorluklar nedeniyle bu dokudaki sitogenetik analizler yavaşlamıştır. Embriyonun kendisi, amniyon ve yolk kesesi fertilize ovumun iç hücre kütesinden, koryonik villuslar ise periferik tabakadan farklılaştığı için koryonik villusların embriyoda farklı olduğu kabul ediliyordu. Ancak gerek villus gerek embriyoda yapılan analizlerde embriyo karyotiplerinin birbirlerini destekler nitelikte olması bu varsayımı ortadan kaldırmıştır. Ayrıca maternal hücre kontaminasyon riskinin yüksek olması villus hücrelerinin kültüre edilmesini kısıtlamıştır. Bu arada Langhans hücrelerinin mitotik olarak aktivite gösterdikleri otoradyografik (Moe 1971) ve histolojik incelemelerle (Watanabe et al. 1978) belirlenmiş ve bu özelliklerden yararlanarak direkt olarak sitogenetik değerlendirmelerin yapılabileceği belirtilmiştir. Daha sonra koryonik villus hücrelerinin tripsinize edilerek başarıyla uygulanabilir bir yöntem geliştirilmiştir. Bu arada Hunt ve Jacobs (1985) normal karyotipli SABLardan elde edilen plasental kültürler ile kromozomal olarak normal olan fetal ve plasental kültürleri karşılaştırmışlar, fetal kültürlerin kısa zamanda kaliteli üreme gösterdiklerini, kültür süresince kromozom yapısını bozmadıklarını, buna karşılık plasental kültürlerin kısa sürede canlılıklarını yitirdikleri, kromozomal olarak anormal olan koloniler oluşturdukları bildirilmişlerdir. Buna karşılık, Procter, Watt ve Gray (1986) ise koryonun diğer fetal dokulara göre daha uzun süre canlılığını koruduğunu ve bu nedenle sitogenetik analizler için tercih edilebilecek tek doku olduğunu belirtmişlerdir.

Koryonik villusların kültürü ile ilgili çalışmalara paralel olarak Simoni ve ark. (1983) Langhans hücrelerinin mitotik aktivitelerinden yararlanarak direkt kromozom analiz yöntemini geliştirmişlerdir. Bu önemli gelişme prenatal tanı

analizlerinde yeni bir çağ açmıştır. Koryon villuslarının direkt ve kültür yöntemleriyle incelenebilmesi hem özellikle ilk trimester abortusların sitogenetik değerlendirmelerinde hem de prenatal tanıda çok geniş bir uygulama alanı sağlamıştır (80, 109, 110, 119).

Koryonik villusların sitogenetik analizlerin direkt ve uzun süreli kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Direkt yöntemde materyalin alımından 4-5 saat sonra karyotip saptanmaktadır. Bu yöntemde koryonik villusların sitotrofoblast hücrelerinin mitotik aktivitelerinden yararlanılmaktadır. Bu arada koryonik villuslar 18-56 saat kültüre edilerek karyotipi belirleme olanağı da bulunmaktadır ki bu yöntem kısa süreli kültür yöntemidir. Direkt yöntemin avantajlarının başında karyotip tayininin çok kısa süre içinde yapılması gelmektedir. Bunun yanısıra, maternal hücre kontaminasyonu koryon villus incelemelerinde en büyük problemdir ki direkt yöntemde bu risk minimuma indirilmiştir. Maternal hücreler, sitotrofoblastlar kadar aktif çoğalamadıkları için kültürü kontamine edemezler. Dolayısıyla elde edilen karyotip direkt olarak fetusu yansıtmaktadır. Direkt yöntemin bu avantajlarının yanısıra pek çok da dezavantajı bulunmaktadır. Bunlar; mitotik indeksin çok düşük olması, iyi dağılmış ve kaliteli bant almış metafazların yetersiz olmasıdır. Kısa süreli kültür yöntemi ile bu problemler kısmen çözümlenebilmektedir, kaliteli, iyi bant almış metafaz sayısı artmaktadır ancak uzun süreli kültürde elde edilenler kadar kaliteli değildir. Ancak araştırmacılar direkt yöntemle kısa süreli kültür yöntemini karşılaştırdıkları zaman, avantajları nedeniyle kısa süreli kültür yönteminin daha güvenilir olduğunu belirtmektedirler (7, 48, 50, 54, 94).

Direkt kromozom preperasyonunda villus morfolojisi ve kültür seçimi mitotik indeksde etkili olmaktadır. Langhans hücrelerinin spontan bölünme aktiviteleri yüksek olduğundan tomurcuklu, dallanmış villuslar seçilmekte ve serum konsantrasyonu düşük besiyerinde kültüre edilmektedir ( Romagnano et al. 1989).

Villusların üçüncü tabakası olan stroma hücreleri, fetal damar ve bağ dokusu (mezenşim, fibroblast, retikulum hücreleri) hücrelerdir Mekanik ya da enzimatik yöntemlerle açığa çıkarılan bu hücreler kısa sürede aktif olarak proliferasyon olurlar. Uzun süreli kültür yöntemiyle kaliteli, bant alma kapasitesi yüksek yeterli sayıda metafaz elde edilir. Değişik bantlama tekniklerini uygulama olanağı olduğundan her türlü kromozomal düzensizliğin tanısı konabilmektedir. Ancak uzun süreli kültür yönteminde maternal hücre kontaminasyonu ile bakteriyel kontaminasyon riski çok yüksektir. Saptanan karyotipin fetusa ait olduğunun emin olunması gereklidir. Bu riski minimuma indirmek için villusların maternal desiduadan çok iyi arındırılması ilk şarttır. Maternal hücrelerin

üremesini engelleyen düşük serum konsantrasyonlu özel besiyerleri kullanılabilir. Herşeye rağmen XX ya da XX/XY mozaisizmi saptandığı zaman fetal ve maternal kromozomların floresans polimorfizmi açısından değerlendirilmesi şarttır(25, 26, 75, 79, 92, 105).

Koryon villus kültüründe gözlenen diğer problem mozaisizm, pseudomozaisizm, yanlış negatiflik ve yanlış pozitifliktir. Direkt ve uzun süreli kültür yöntemlerinin her ikisinin birden uygulanması bu problemleri kısmen çözmektedir. Ancak mozaik yapı ile karşılaşıldığında bunun pseudomozaisizm ya da gerçek mozaisizm olduğunun belirlenmesi için diğer prenatal tanı yöntemleri olan amniyosentez ya da fetal kan örnekleme gereklidir (25, 59, 99, 110, 111).

Koryonik villus kültürlerinde, morfolojik olarak farklılık gösteren hücelere rastlanmaktadır. Bunlar mezenşimal stromadan köken alan fibroblastlar, trofoblast tabakasından köken aldığı düşünülen çok nükleuslu hücreler ve granüllü hücrelerdir (Chang and Jones 1988, Heaton et al. 1984).

Spontan olarak bölünen sitotrofoblastik hücreler kültürde elde edilen hücrelerden çok farklıdır. Hücre siklus değerlendirmelerinde spontan olarak bölünen hücrelerin uzun bir S fazına ve total hücre siklusuna sahip olduğu saptanmıştır (Zahed, Murer-Orlando and Bobrow 1988). Embriyonik gelişimin ilk haftalarında koryonik villusların farklı hücre tiplerinin proliferasyon potansiyelleri karşılaştırıldığında sitotrofoblastların proliferasyon potansiyelinin 9uncu haftada arttığı saptanmıştır ki bu dönem Kaufmann (1982) tarafından belirtilen tomurcuklu sinsisyotrofoblast oluşumuna karşılık gelmektedir. Bu artış Langhans hücrelerinin mitotik aktivitesine ve bunu takiben sitotrofoblastların sinsisyal tabaka ile tomurcuklara farklılaşmasından kaynaklanmaktadır (Raabe and Miller 1990).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Gereç

İlk trimester SABlarda sitogenetik ve elektron mikroskopik analizleri içeren bu çalışma, Ağustos 1991-Eylül 1992 tarihleri arasında Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ile Eskişehir Doğumevi'nde gerçekleşen 40 abortusda yapılmıştır. Materyal seçiminde abortusların ilk trimester olmaları ve sigara içiminin plasentanın ultrastrüktürel yapısında modifikasyonlara neden olup sonuçların yanlış değerlendirilmesine yol açmaması nedeniyle gebelerin sigara içmemesi kriter olarak alınmıştır. Ayrıca ultrason ile gebelik haftası belirlenen, herhangi bir sağlık problemi olmayan ancak sosyal nedenlerle gebeliği istemeyen sigara içmeyen 14 gebeye ilişkin istemli abortus materyalleri de araştırmanın kontrol grubunu oluşturmuştur.

#### 3.2. Yöntemler

İlk trimesterSABlar sitogenetik ve ultrastrüktürel yapı yönünden incelenmiştir.

##### 3.2.1. Materyal alımı

Kanama ve/veya kasılmalar nedeniyle ilgili kliniklere başvuran gebelerde yapılan fizik muayene ile abortus tanısı konulmuş ve kürete edilen gebelik ürünleri transport solusyonu (Çizelge 3.1) içine alınarak hemen doku kültürü



laboratuvarına ulaştırılmıştır. Doku kültürü laboratuvarına ulaştırılan materyaller arasından koryonik villuslar ayrılarak yıkama solusyonunda yıkanmışlar ve solusyonun bulunduğu temiz petri kabına aktarılmışlardır.

Temiz petri kabında bulunan villuslar stereo mikroskop altında dikkatli bir inceleme ile maternal desiduadan, kan damarlarından arındırılmış ve fetal villuslar üçe ayrılarak sitogenetik ve elektron mikroskopik analizler için hazır duruma getirilmişlerdir.

### 3.2.2. Sitogenetik analizler

Koryonik villuslardaki sitogenetik analizlerde direkt ve uzun süreli kültür yöntemleri birlikte uygulanmıştır.

#### 3.2.2.1. Direkt yöntem

Stereomikroskop altında temizlenerek  bölüme ayrılan fetal villusların ilk bölümüne direkt yöntem uygulanmıştır.

- Bol dallı ve tomurcuklu olan villuslar bir kere daha yıkama solusyonunda yıkanarak düşük serum konsantrasyonlu (izelge 3.2) besiyerine aktarılıp, parçalanmış ve 36 saat 37°Cde kültüre edilmişlerdir.
- İnkübasyonun 34nc saatinde hücre bölünmesini metafazda durdurmak amacıyla colcemid (0.4µg/ml) (Gibco 120-5212AD) eklenerek 2 saat daha kültüre devam edilmiştir.
- Süre sonunda petri kabındaki vasat çekilerek, önceden 37°Cye getirilmiş 5ml hipotonik solusyon (%1 sodyum sitrat) eklenmiş ve 20 dakika 37°Cde bekletilmiştir.
- Süre sonunda hipotonik solusyon üzerine 1ml taze hazırlanmış Carnoy fiksatif solusyonu (3:1 Methanol:Asetik asit) eklenerek 2 dakika

bekletilmiş, daha sonra tüm solusyon çekilerek 5ml taze fiksatif solusyonu eklenmiştir. 10 dakika +4°Cde bekletilen villuslardaki fiksatif çekilerek yenisi eklenmiştir.

- Fiksatifle yıkama işlemi iki kez tekrarlanmıştır.
- Son fiksasyon işleminden sonra, fiksatif çekilmiş ve villusların kurumamasına dikkat ederek villuslardaki fazla fiksatifin ortamdan uzaklaştırılması için 5 dakika petri kabının ağzı açık bırakılmıştır.
- Bu işlemde sonra villus miktarına göre (5 mg. villus için 20 damla) %60lık asetik asit eklenerek 5-10 dakika kadar oda ısısında bekletilmişler ve bu arada mikroskopta hücrelerin serbest duruma geçmesi incelenmiştir.
- Yeterli hücrenin serbest duruma geçmesini takiben, önceden hazırlanmış ve odanın ısı ile nemine göre soğuk ya da sıcak olarak bekletilen lamlara hücre süspansiyonu damlatılmış, kıvrık uçlu pipet yardımıyla yayılmış ve preparatlar kurumaya bırakılmıştır.
- Bir gece 60°C de ya da 3 gün oda ısısında yaşlandırılan preparatlara bantlama teknikleri uygulanmıştır.

### 3.2.2.2. Uzun süreli kültür yöntemi

Stereomikroskop altında üç gruba ayrılan fetal villuslardan ikinci gruba uzun süreli kültür yöntemi uygulanmıştır.

- Yıkama solusyonunda bir kere daha yıkanan villuslar üç besiyerini karşılaştırmak amacıyla üçe ayrılmışlar ve içlerinde 3er ml tripsin-EDTA solusyonunun (Gibco 043-05300) bulunduğu petrilere aktarılıp parçalanarak bir saat 37°Cde kültüre edilmişlerdir.
- Süre sonunda tripsin-EDTA solusyonu çekilerek, 3ml kollegenaz

(500units/ml) (Sigma C-9263) ile yarım saat muamele edilen villuslar bu işlem sırasında çok küçük parçalara ayrılmışlar ve mikroskop altında hücrelerin serbest duruma geçip geçmedikleri değerlendirilmiştir.

- Yeterli miktarda hücrenin serbest duruma geçişi ile hücre süspansiyonları silikonlu santrifüj tüplerine aktarılarak 10 dakika 1000 rpm de santrifüj edilmişlerdir.
- Supernatant atılmış, her tüpteki pellet üzerine Chang veya RPMI-1640 ya da Ham's F-10 besiyeri (Çizelge 3.3) konmuş ve pipetaj sonrası flasklara ekimler yapılmıştır.
- Kültüre hazır duruma getirilen flasklar %5 CO<sub>2</sub>, nem ve 37°Clik ortamda beş gün süre ile kültüre edilmişlerdir.
- Beşinci gün flasklar inverted mikroskopta üreme açısından değerlendirilmiş, üreme kalitesine göre uygun besiyerleri ile tüm ya da yarım olarak değiştirilmişlerdir.
- Bundan sonra kültürler yeterli mitoz gözleninceye kadar haftada iki defa mikroskopta değerlendirilerek besiyerleri değiştirilmiştir.
- Inverted mikroskopta yapılan incelemelerde flaskın yaklaşık yarısının kaplandığı ve 4-5 mitozun gözlendiği kültürler çalışmaya alınmışlardır.
- Çalışmaya alınan kültürlerin bir gece önce besiyerleri değiştirilmiştir.
- Ertesi gün colcemid (0.06µg/ml) eklenerek 4 saat kültüre devam edilmiştir.
- Süre sonunda besi ortamı temiz bir santrifüj tüpüne aktarılmış ve flaska 2ml tripsin-EDTA solusyonu eklenerek hafif hareketlerle yıkama işlemi gerçekleştirilerek santrifüj tüpüne alınmıştır.
- Hücrelerin üzerine 1ml taze tripsin (Difco 0153-59) eklenerek 5 dakika

37°C de bekletilmiş ve bu arada hücrelerin birbirlerinden ayrılıp ayrılmadıkları mikroskopta takip edilmiştir.

- Yeterli hücre ayırımı gözlendiği zaman tripsini inaktive etmek için serumsuz besiyeri ilave edilmiş, flask karıştırılmış ve pipet yardımıyla hücreler santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- 10 dakika 1000 rpm de santrifüj edilmiş, supernatant alınmıştır.
- Pellet üzerine 37°Cye getirilmiş hipotonik solusyon eklenerek 20 dakika 37°Cde etüvde bekletilmiştir.
- Süre sonunda etüvden çıkarılan tüplere 1ml taze hazırlanmış fiksatif eklenerek 10 dakika 1000 rpm de santrifüj edilmişlerdir.
- Santrifüj sonunda supernatant alınmış ve pellet üzerine damla damla ve hafif hareketlerle karıştırılarak taze fiksatif solusyonu eklenmiş ve yarım saat +4°C de bekletilmişlerdir.
- Buzdolabından alınan tüpler 1000 rpmde 10 dakika santrifüj edilmiş, supernatant alınarak fiksatif solusyonu eklenmiştir. Bu fiksatif solusyonu ile yıkama işlemi iki kez tekrarlanmıştır.
- Son santrifüjden sonra yaklaşık 1 ml fiksatif bırakacak şekilde supernatant alınmış ve pellet pastör pipeti ile karıştırılarak önceden temizlenmiş lamalar üzerine damlatılarak kurumaya bırakılmışlardır.
- Preperatlar 60°Cde bir gece ya da oda ısısında 3 gün bekletilerek yaşlandırılmış ve uygun bantlama teknikleri uygulanmıştır.

### 3.2.2.3. Metafaz plaklarının bantlanması

Direkt ve uzun süreli kültür yöntemlerinin uygulanması ile elde edilen preparatlara yaşlandırıldıktan sonra direkt boyama (solid staining), GTG bantlama ve C bantlama teknikleri uygulanmıştır.

#### **Solid boyama**

Elde edilen preparatlardaki mitotik indeksin, metafaz plak kalitesinin ve sayısal anomalinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla her olguya ilişkin bir preparat direkt boyamaya sokulmuştur.

96 ml fosfat buffer solusyonu (pH 6.8) içine 4 ml Giemsa boya ilave edilerek hazırlanmış boya solusyonunda 5 dakika bekletilen preparatlar distile suda yıkanmış ve kurutulmuştur. Kuruyan preparatlar ksilolden geçirilmiş, entellan kullanılarak lamel yapıştırılmış ve mikroskopta incelenmiştir.

#### **GTG ve Sentromer (C) bantlama**

Her iki yöntemle elde edilen preparatlar Başaran (1987) tarafından modifiye edilen prosedürlere göre bantlanmışlardır.

### 3.2.3. Elektron mikroskop analizine hazırlık

Stereomikroskop altında ayrılan villusların üçüncü grubu elektron mikroskopik analizlerde kullanılmıştır.

- Elektron mikroskobu için ayrılan villuslar fiksatif olarak Milloning fosfat tamponu ile hazırlanmış %4 Glutaraldehit (Çizelge 3.4) içinde tek bıçak darbeleriyle 1mm<sup>3</sup>lük parçalara ayrılmışlardır.

- Parçalar içinde yine fiksatif solusyonunun bulunduğu şişelere aktarılarak +4°Cde 2 saat fikse edilmişlerdir.
- Süre sonunda parçalar Milloning tamponu içerisinde bir gece boyunca +4°Cde bekletilerek yıkanmışlardır.
- Ertesi gün parçalar %1 lik OsO<sub>4</sub> ile birbuçuk saat muamele edilerek ikinci kere fikse edilmişlerdir.
- Bunu takiben parçaların yükselen etanol serilerinden geçirilmesi ile suyu alınmıştır.
- İki kez propilen oksitten geçirilip eşit oranlarda hazırlanan araldit+propilen oksit (1:1) karışımında bir saat tutulmuşlardır. Daha sonra 3 kısım araldit ve 1 kısım propilen oksit karışımında 1 saat kadar rotatorda bırakılan parçalar saf araldit içinde bir gece boyunca bekletilmişlerdir. Ertesi gün parçalar temiz, saf araldit içine gömülerek iki gün süre ile 60°Cde polimerizasyon işlemi için inkübe edilmişler ve kesime hazır duruma getirilmişlerdir.
- Parçaların kesim işlemi yaklaşık 1 hafta sonra gerçekleştirilmiştir. Bloklar Reichert ultramikrotomunda (UM2 ve UM3) önce 1-1.5µ kalınlığında kesilerek lam üzerine alınmış ve toluidin mavisi ile boyanıp ışık mikroskop altında incelenmişlerdir.
- Dokuya uyum sağlandıktan sonra 400-600 A° kalınlığındaki kesitler bakır gridler üzerine alınmış, %50lik uranil asetatta, daha sonra da Reynold's kurşun sitrat eriyiğinde boyanarak kontrastın artırılması sağlanmıştır.
- Preperatlar Carl Zeiss EM9J2 elektron mikroskobunda incelenmişler ve değişimin gözleendiği alanların fotoğrafı çekilmiş ve Ilford 9.0x11.5 cm.lik kartlara basılmıştır.

**Çizelge 3.1.** Transport solusyonunun hazırlanışı

HBSS	100 ml.
Heparin	1 ml.
Penicillin/Streptomycin	1 ml.

**Çizelge 3.2.** Direkt yöntemde kullanılan düşük serum konsantrasyonlu besiyerinin hazırlanışı

RPMI-1640	100 ml.
Fetal Calf Serum	5 ml.
Penicillin/Streptomycin	1 ml.

**Çizelge 3.3.** Uzun süreli kültür yönteminde kullanılan besiyerleri

RPMI-1640 veya Ham's F-10	80 ml.
Fetal Calf Serum	20 ml.
L-Glutamine	1 ml.
Penicillin/Streptomycin	1 ml.

Chang Medium A ve B	100 ml.
L-Glutamine	1 ml.
Penicillin/Streptomycin	1 ml.

**Çizelge 3.4. TEM analizlerinde kullanılan solusyonlar**

**MİLLONİNG'S BUFFER**

**Solusyon A**

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.26 gr. + 100 ml. distile su

**Solusyon B**

NaOH 2.52 gr.+100 ml. distile su

**Solusyon C**

Glukoz 5.40 gr.+100 ml. distile su

**Solusyon D**

Solusyon A 41.5 ml.

Solusyon B 8.5 ml.

**Buffer**

Solusyon C 5 ml.

Solusyon D 45 ml.

pH 7.3-7.4 arasında olmalıdır.

**% 4 LÜK GLUTARALDEHİT FİKSATİF SOLÜSYONU**

0.8 ml. Glutaraldehit + 4.2 ml. buffer



## 4. BULGULAR

İlk trimesterde gerçekleşen spontan abortuslarda sitogenetik ve elektron mikroskopik analizleri içeren bu çalışma, son menstruasyon tarihine göre gestasyonun 6 ile 12inci haftalarında gerçekleşen 40 spontan abortus materyalinde gerçekleştirilmiş olup daha önce her hangi bir abortusu, ölüdoğumu ya da anomalili çocuğu olmayan, sağlıklı çocuklara sahip olan ancak sosyoekonomik nedenlerle gebeliği istemeyen, yapılan sitogenetik incelemelerde normal karyotipe sahip oldukları belirlenen 14 istemli abortus materyali de araştırmanın elektron mikroskopik analizleri için kontrol grubunu oluşturmuştur. Araştırmamızın bulguları, sitogenetik ve elektron mikroskopik analizler olmak üzere iki yönden değerlendirildiğinden dolayı, iki ana başlık altında, Gereç ve Yöntemler bölümünde belirtilen sıraya göre verilmiştir.

### 4.1. Sitogenetik Analizlere ilişkin Bulgular

#### 4.1.1. Uygulanan yöntemlerin karşılaştırılması

Gereç ve Yöntemler bölümünde belirtildiği gibi, bu çalışmanın araştırma grubunu oluşturan SAB materyallerinde hem direkt hem de uzun süreli kültür yöntemleri birlikte uygulanmıştır. Direkt yöntemde villuslar 36 saat 37<sup>0</sup>C de kültüre edilerek mitotik indeksin ve metafazların kalitesinin artması sağlanmıştır.

Direkt yöntem, incelemeye alınan 40 örneğe de uygulanmış ve 38inde (% 95.0) başarılı sonuç alınmıştır (Çizelge 4.1). Sonuç alınamayan iki örnekten birinde yeterli düzeyde mitoz rastlanmazken, diğer örnekte incelenebilecek ve sonuca varılabilecek düzeyde kaliteli metafaz elde edilememiştir.

Direkt yöntemle paralel olarak uygulanan uzun süreli kültür yöntemi de uygulanmış ve tüm örneklerde (% 100) başarı elde edilmiştir. Uzun süreli kültür yönteminde Chang, Ham's F-10 ve RPMI-1640 besiyerleri karşılaştırmalı olarak kullanılmıştır. Çizelge 4.2 de görüldüğü gibi RPMI-1640 a ekilen 40 örnekten 31 tanesinde (%77.5), Chang besiyerine ekilen örneklerin 24ünde (% 60.0) ve Ham's F-10'e ekilen örneklerin de 13ünde (% 32.5) ilk hafta içinde üreme başlamıştır. Besiyerleri üremenin yeterli olup sitogenetik değerlendirmenin yapıldığı süre bakımından karşılaştırıldığında da RPMI-1640 besiyeri kullanılan kültürlerin % 75 inde ekimin 12inci gününde sitogenetik inceleme yapılabilirken, aynı süre içinde Chang ve Ham's F-10 besiyerlerinin kullanıldığı kültürlerin ancak % 47.5 ve % 7.5 kadarı incelemeye alınabilmiştir.

MI ile kullanılan besiyerleri karşılaştırıldığında Çizelge 4.2 de görüldüğü gibi en yüksek MI, RPMI-1640 da elde edilirken bunu sırasıyla Chang ve Ham's F-10 vasatları takip etmektedir.

Uzun süreli kültür yönteminin uygulandığı örneklerin üreme kapasitesi ile bu örneklerin gestasyonel yaşları arasında bir ilişki olup olmadığı kültüre edilen örneklerin çalışmaya alınma dönemleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Tüm SAB örnekleri her üç besiyerine de ekildiğinden örneklerin üreme kapasitesi ile gestasyonel yaşları arasındaki ilişkiye besiyerinin herhangi bir etkisi olmamış ve en iyi sonucun alındığı RPMI-1640 a ilişkin kültürler değerlendirilerek Çizelge 4.1 de özetlenmiştir. Bulgulara göre, gestasyonun 9uncu haftasına kadar olan 21 abortusun 20 tanesi ekimin 12inci gününde incelemeye alınabilirken, 9 ile 12inci haftalar arasında gerçekleşen abortusların daha ileri dönemlere kadar üreme bakımından yeterli düzeye ulaşmadıkları gözlenmiştir. Erken gestasyonel dönemlerde olan abortusların üreme kapasitelerinin çok daha fazla olduğu saptanmıştır.

Abortus materyallerine uygulanan direkt ve kültür yönteminde elde edilen fetal karyotipler Çizelge 4.3 de özetlenmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi her iki yöntem de birbirlerini desteklemektedir. Direkt yöntemde iki örnekte sonuç alınamamış, kültür yöntemi ile bu örneklerin 47,XY,+16 ve 46,XY karyotipli oldukları belirlenmiştir. Bu örneklerin XY karyotipine sahip olmaları maternal kontaminasyon olasılığını ortadan kaldırmıştır.

#### 4.1.2. Kromozom anomali frekansı ve anomali tiplerine ilişkin bulgular

Gebeliğin 6-12inci haftaları arasında gerçekleşen 40 SAB örneğinin karyotiplenmesi sonucu 13 örnekte (%32.5) sayısal ve yapısal kromozom anomalisi saptanmıştır. Bu anomaliler Çizelge 4.3de belirtildiği gibi bir olguda 47,XY,+16; 3 olguda 47,XX,+21 (Resim 4.1); bir olguda 47,XY,+21 (Resim 4.2); bir olguda 47,XXY; dört olguda 45,XO (Resim 4.3); iki olguda tetraploidi (Resim 4.4) ve bir olguda da yapısal kromozom anomalisi (45,XY,t(13/14)) (Resim 4.5) gözlenmiştir.

#### 4.1.3. Kromozom anomali frekansı ve gestasyonel yaş

Saptanan kromozom anomali tipleri ile gestasyonel yaş arasındaki ilişki değerlendirildiğinde (Çizelge 4.4) fetusların % 52.5 kadarının ilk 8 hafta içinde abort olduğu ve bunların da % 42.8 kadarının anomalili olduğu saptanmıştır. Gestasyonun 9 ile 12inci haftaları arasında abort olan fetuslar arasında % 21 oranında kromozomal anomalisi saptanmıştır. İlk 8 hafta içinde abort olan fetuslar arasında gözlenen kromozomal düzensizliklerde ilk sırayı trizomi ve monozomi X düzensizliği almaktadır (Çizelge 4.4). Yapısal kromozom düzensizliği ise 11 haftalık bir fetusta gözlenmiştir.

#### 4.1.4. Kromozom düzensizlikleri ve maternal yaş arasındaki bağlantıya ilişkin bulgular

SABlarda gözlenen kromozom düzensizlikleri ile maternal yaş arasındaki ilişki ise Çizelge 4.5 de özetlenmiştir. 30 yaşından daha küçük anneler, abortusu olan annelerin % 65 kadarını oluştururken bunların % 53.8 kadarının anomalili fetusa sahip olduğu, 30 yaşından büyük annelere (% 35) ait fetusların ise % 42.9 kadarında kromozom anomalisi bulunduğu gözlenmiştir.

Trizomik abortusların özellikle 30 yaşından daha büyük annelerde yoğunlaştığı buna karşılık X kromozom monozomisinin genç annelerde

gözlendiği dikkat çekicidir. Özellikle 19 yaş ve daha küçük annelerin bulunduğu grupta % 25 oranında monozomi X düzensizliği saptanmıştır.

Çizelge 4.6 da gestasyonel ve maternal yaş ile fetal karyotiplerin ilişkisi değerlendirilmiştir. Normal karyotipli 27 fetusun ortalama  $11.5 \pm 2.7$  haftalarda abort olduğu buna karşılık anomalili fetusların daha erken dönemde atıldıkları saptanmıştır. Bu çalışmanın bulgularına göre monozomi X düzensizliği en letal kromozom anomalisidir. Ortalama olarak gestasyonel dönemin ilk 8 haftası içinde atılmaktadır. Bunu tetraploidi takip etmektedir. Trizomik abortuslar ise ortalama 10uncu hafta dolaylarında abort olmuşlardır.

Anomalili karyotipler ile maternal yaş karşılaştırıldığında, normal karyotipli fetuslarda ortalama maternal yaş  $28.4 \pm 1.6$  olarak saptanırken anomalili karyotiplerde artmıştır ( $31.8 \pm 3.2$ ). Anomalili karyotipler kendi içlerinde karşılaştırıldığında trizomik abortusların annelerinde anlamlı bir artış ( $33.5 \pm 3.2$ ) gözlenirken X kromozom monozomisine bağlı olarak abort olan fetusların annelerinin daha genç olduğu ( $24.2 \pm 1.9$ ) saptanmıştır ki tetraploidik iki fetusun annelerinde de aynı durumla karşılaşılmıştır. Tetraploidik fetuslardaki maternal yaş ( $27.9 \pm 2.6$ ) hem normal karyotipli ( $28.4 \pm 1.6$ ) hem de anormal karyotipli ( $31.8 \pm 3.2$ ) fetuslardaki ortalama maternal yaş değerlerinden çok düşüktür.

#### 4.1.5. Normal karyotipli fetuslarda cinsiyet oranı

Direkt ve uzun süreli kültür yöntemleriyle incelenen ve sonuçları birbirini destekleyen ilk trimester abortus materyallerinde normal karyotip saptanan 27 örnekte 11 erkek ve 16 kız saptanmıştır ve cinsiyet oranı (erkek:kız) 0.69 olarak hesaplanmıştır. Normal karyotipli kızların daha fazla olduğunu gösteren bu oran yenidoğan popülasyonundaki 1.06-1.07 lik orandan, CVS ile incelenen normal birinci trimester gebeliklerin 1.17lik oranından ve koryonik villusların direkt yöntemle incelendiği induced abortuslarda gözlenen 1.16lık orandan büyük farklılıklar göstermektedir (Bartels et al. 1990, Zhou et al. 1989).

Ortalama maternal yaş, erkek abortuslarda  $28.1 \pm 2.8$ , kız fetuslarda ise  $29.2 \pm 1.6$  olarak belirlenmiştir. Genel olarak erkek abortuslar  $11.2 \pm 2.3$  haftalık gestasyonel dönemde, kız cinsiyetli abortuslar ise  $11.6 \pm 1.1$  haftalık dönemde abort olmuşlardır. Maternal yaş, gestasyonel yaş ve cinsiyetler arasında herhangi bir ilişki belirlenmemiştir.

#### 4.2 Elektron Mikroskop Analizlerine İlişkin Bulgular

Spontan abortusun, kromozomal düzensizlik ile plasental villusların ultrastrüktürel yapısındaki modifikasyonların karşılıklı etkileşimlerine bağlı olarak oluştuğuna yönelik görüşleri değerlendirmek amacıyla ilk trimester SAB örnekleri TEM ile incelenmiştir.

Kromozomal düzensizliğin saptandığı SAB örnekleri ile normal karyotipli spontan ve istemli abortus örnekleri mikrovillusların gelişimi, düzeni, sinsisyo ve sitotrofoblastların yapısı, organel içeriği bakımından değerlendirilerek gruplar karşılaştırılmıştır.

Sitogenetik analizler bölümünde belirtildiği gibi 13 abortus örneğinde kromozom düzensizliği saptanmıştır. Bunların 6 tanesi trizomi, 4 tanesi monozomi X, 2 tanesi tetraploidi ve bir tanesi de yapısal kromozom düzensizliğidir.

Trizomik abortuslarda yapılan ultrastrüktürel incelemelerde, düzensiz bir mikrovillus gelişimi ile karşılaşmıştır. Çok sayıda kısa ve çoğunluğu geniş olan bu mikrovilluslarda ileri düzeyde dejenerasyonun olduğu, çok düzensiz bir dağılım gösterdikleri dikkat çekmiştir. Intervillöz boşluğa doğru uzanan uzantılar, bu bölgelerde yoğun olan dilate olmuş ER ile bazı mikrovilluslarda hidropik görüntünün bulunması mikrovillus dejenerasyonunun en belirgin özellikleridir (Resim 4.7).

Trizomik abortuslarda gözlenen diğer bir özellik de sinsisyal harabiyetin belirgin boyutlara ulaşmasıdır. Serbest yüzeyde fokal nekrozlara sıkça rastlanmış, intervillöz boşlukta bol miktarda sinsisyal kalıntı gözlenmiştir (Resim 4.7-4.8).


Üç trizomik abortus örneğinde birbirine çok benzeyen spesifik sinsisyotrofoblastlar saptanmıştır. Bu örneklerde sinsisyotrofoblastlarda bol miktarda myelin figürler dikkati çekmektedir (Resim 4.7-4.8). Bu yapılara normal (Resim 4.6) ve diğer anomalili karyotipe sahip örneklerde rastlanılmamıştır.

Monozomi X 4 örnekte saptanmıştır. Bunların villuslarında yapılan incelemede sinsisyotrofoblast yüzeyinin hemen hemen düz bir görünüme sahip olduğu, mikrovillus sayısının belirgin bir şekilde azaldığı, mikrovillusların kısa, geniş ve hidropik bir görünümde oldukları gözlenmiştir (Resim 4.9). Bu arada atipik stromal hücrelere de rastlanılmış ve bir sınıflamaya gidilememiştir (Resim 4.10).

Abortus örneklerinin iki tanesinde tetraploidi saptanmış olup, bunların plasental villuslarında mikrovillusların hidropik görünümde ve çok düzensiz bir dağılım gösterdikleri belirlenmiştir. Bunların yanısıra ara ara fibrin birikimleri ile fibröz villus stroması bu kromozom düzensizliğinin spesifik özellikleri olarak belirlenmiştir (Resim 4.11).

Yapısal kromozom düzensizliğinin saptandığı örnekte normal plasental görünümünden farklı bir yapıyla karşılaşılmamıştır.

Bu çalışmada trizomik olgulardaki miyelin figürler dışında kromozom düzensizliğine özgü olan spesifik bir düzensizlik saptanamamıştır. Ancak, bütün plasentalarda gözlenen bir ortak düzensizlik villuslardaki sinsisyal dallanmanın çok minimum düzeyde olması ve sinsisyotrofoblastların selüler yüzeyindeki özelleşmenin yani mikrovillus oluşumunun yetersiz olması ile kendini belli eden plasental immatüredir. Özellikle monozomi X gösteren örneklerde plasental immatürite çok belirgindir. Plasental immatüriteye bağlı olarak, incelediğimiz tüm villusların avasküler olduğu dikkat çekicidir.



**47,XX,+21**

Resim 4.1. Trizomi 21 gösteren dişi metafaz plağı



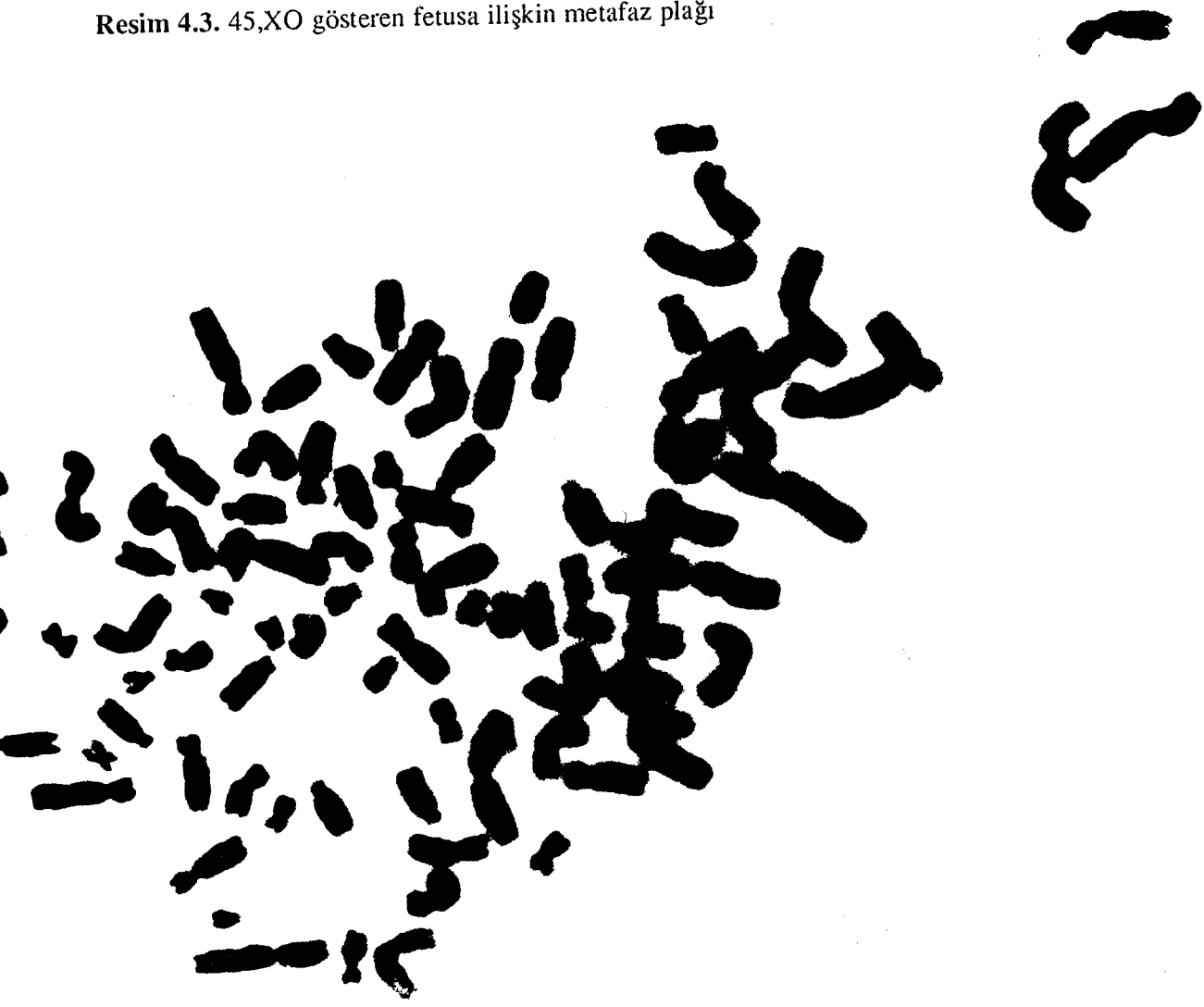
**47,XY,+21**

Resim 4.2. Trizomi 21 gösteren erkek metafaz plağı



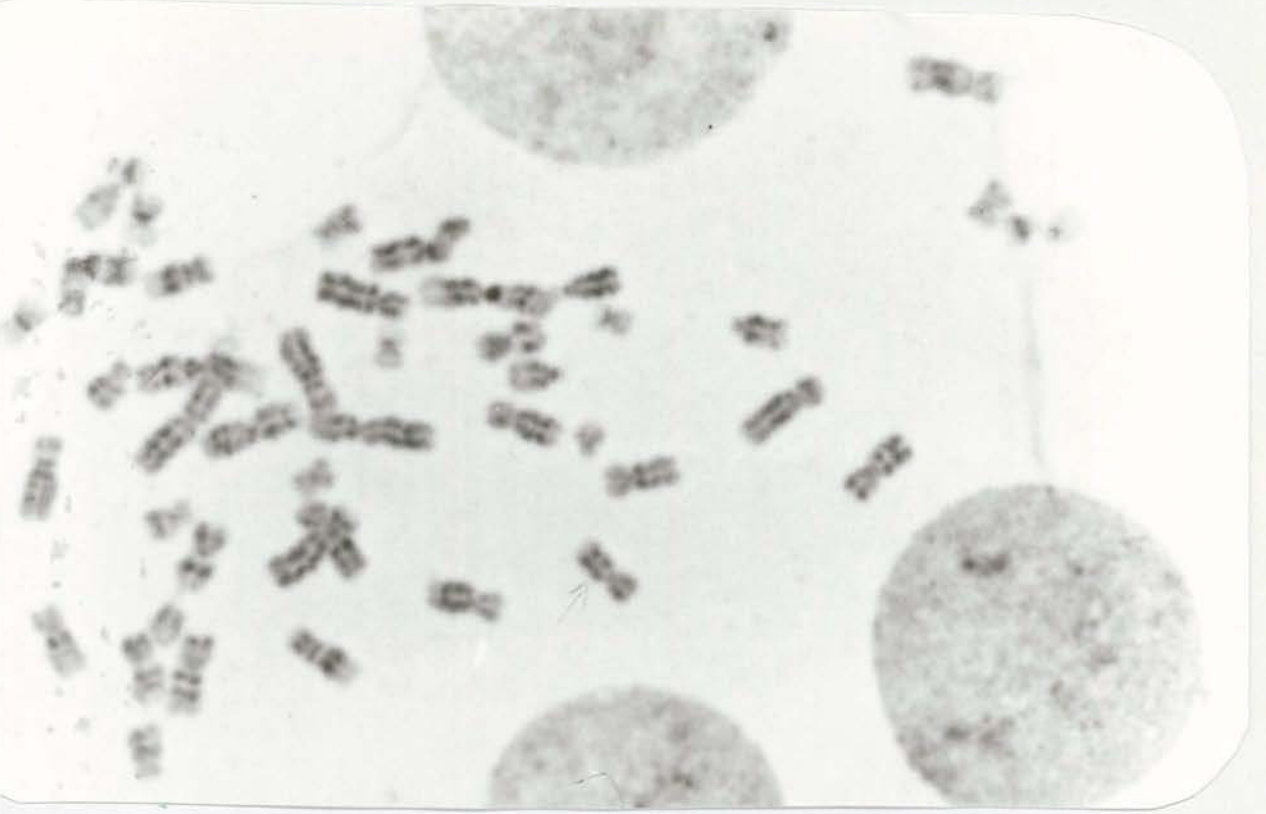
45,XO

Resim 4.3. 45,XO gösteren fetusa ilişkin metafaz plağı



Resim 4.4. Tetraploidik bir fetusa ilişkin metafaz plağı

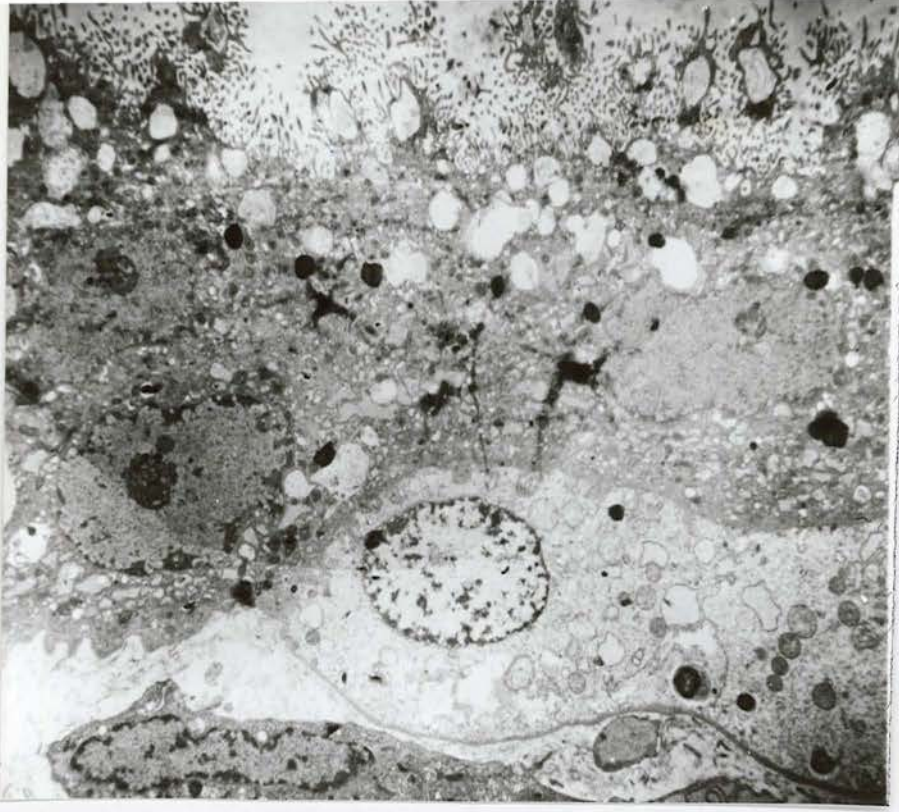




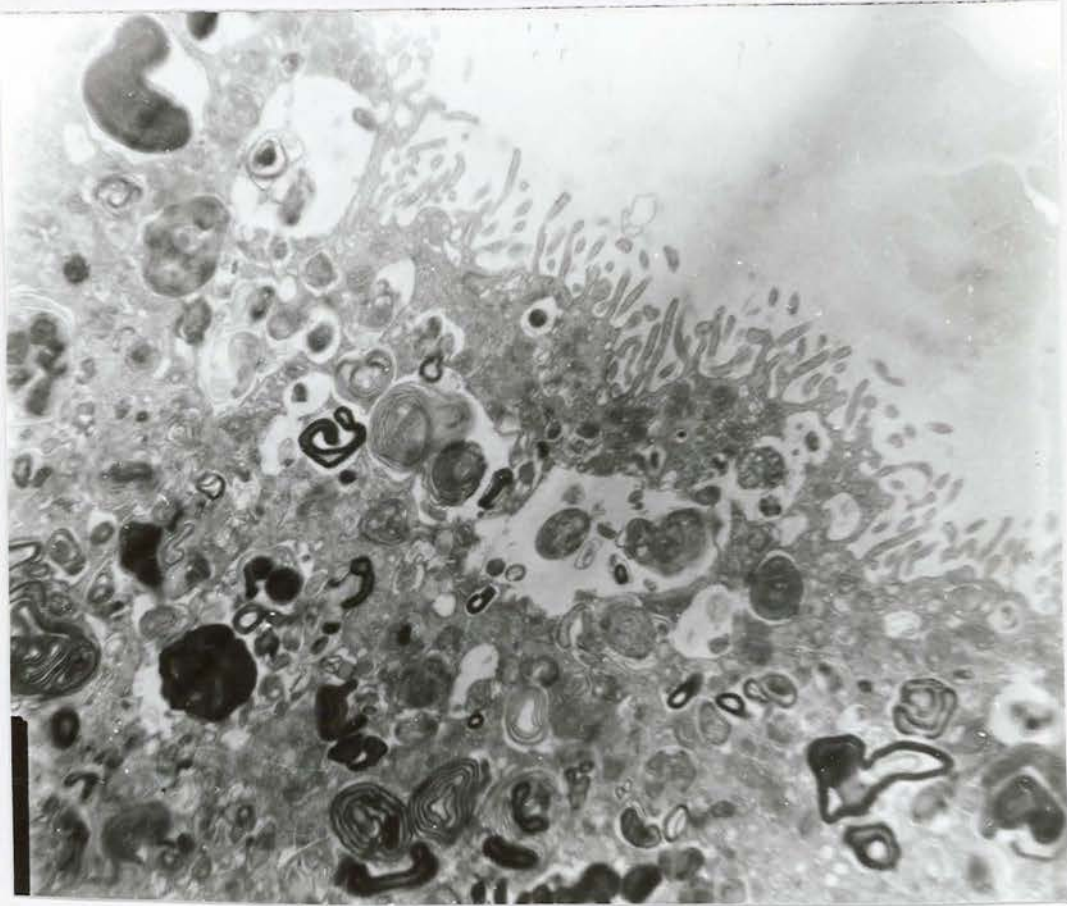
Resim 4.5. 13/14 translokasyonu gösteren fetusa ilişkin metafaz plağı



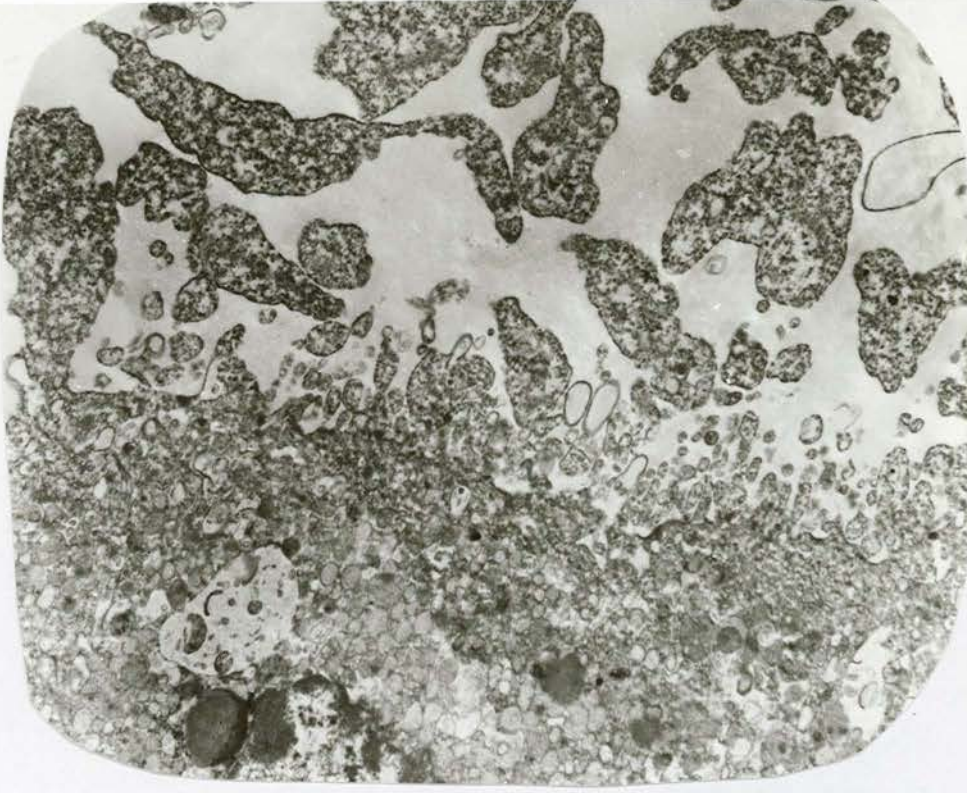
Resim 4.6. Normal karyotipli bir fetusa ilişkin villus (x4500)



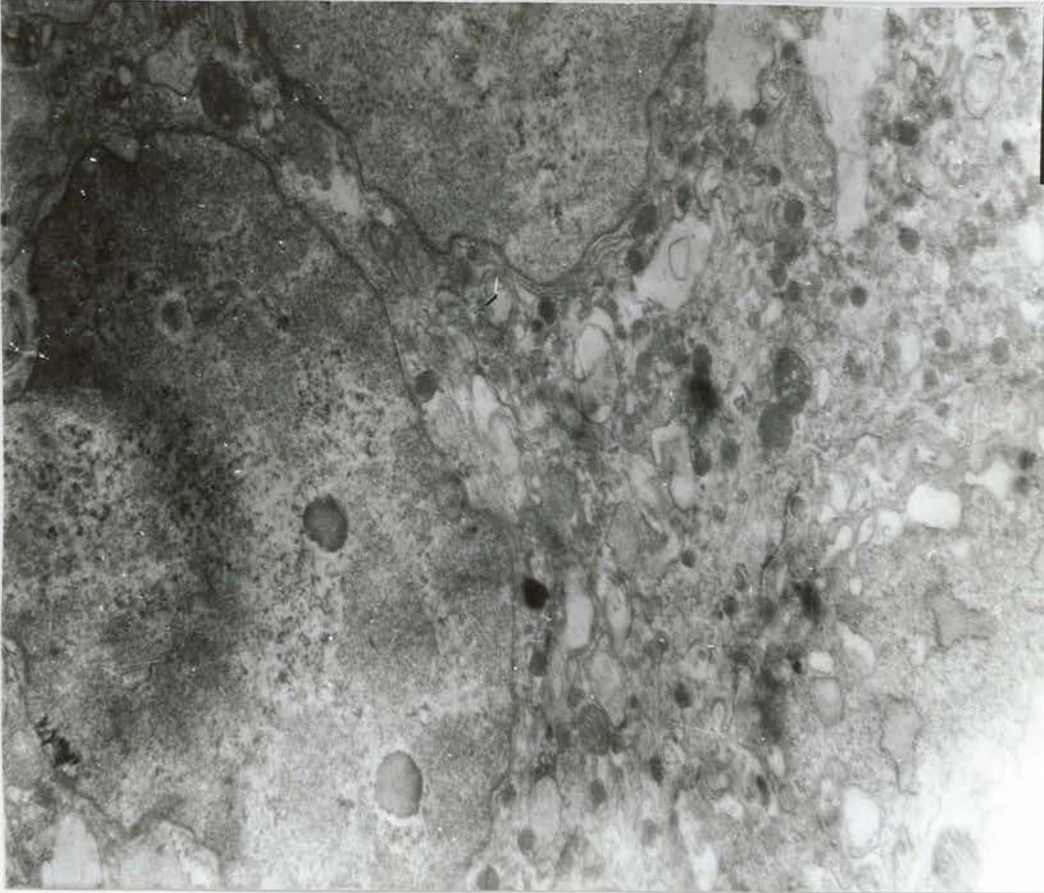
Resim 4.7. Trizomik abortuslara ilişkin villusların ince yapısı (x4500).



Resim 4.8. Trizomik abortus örneğinde saptanan dejenere mikrovillus ve miyelin figürleri ile spesifik sinsisyotrofoblast (x4500)



**Resim 4.9.** Monozomi X gösteren bir fetusa ilişkin villus yapısı. Sitotrofoblast yüzeyi düz görünümde, mikrovilluslar çok az sayıda ve düzensiz, stromada atipik hücreler yoğun.



**Resim 4.10.** 45,XO karyotipe sahip fetusa ilişkin stroma



**Resim 4.11.** Tetraploidik bir fetusa ilişkin villusların ince yapısı. Fibrin birikimi ile spesifik bir görünüm.

Çizelge 4.1: Gestasyonel yaş ile koryonik villüs hücrelerinin üreme kapasitesi arasındaki ilişki

Gestasyonel Yaş (Hafta)	Abortus Sayısı	Direkt Yöntem			Uzun Süreli Kültür Yöntemi						
		Başarılı		MI	Başarılı		Karyotip Saptama Süresi (gün)				Toplam
		Sayı	%		Sayı	%	9 - 10	11 - 12	13 - 14	15 - 16	
5 - 6	9	9	100.0	4	9	100.0	4	5	-	-	9
7 - 8	12	12	100.0	11	12	100.0	4	7	1	-	12
9 - 10	11	10	90.9	8	11	100.0	2	6	2	1	11
11 - 12	8	7	87.5	4	8	100.0	-	2	3	3	8
Toplam	40	38	95.0		40	100.0	10	20	6	4	40

Çizelge 4.2: Sportan abortus materyallerinden elde edilen koryonik villüs örneklerinin uzun süreli kültüründe kullanılan besiyerlerinin karşılaştırılması

Kullanılan Besiyeri	Üreme Başlangıcı (Gün)					Çalışmaya Alınma (Gün)								
	4 - 5	6 - 7	8 - 9	10 - 11	Toplam	9 - 10	11 - 12	13 - 14	15 - 16	17 - 18	19 - 20	21 - t	Toplam	MI
RPMI - 1640	13	18	6	3	40	10	20	6	4	-	-	-	40	11
Chang	8	16	9	7	40	6	13	10	7	4	-	-	40	7
Ham's F-10	4	9	12	15	40	-	3	6	8	10	6	7	40	4
Toplam	25	43	27	15		16	36	22	19	14	6	7		

Çizelge 4.3: Sitogenetik yönden incelenen SAB örneklerinde saptanan fetal karyotipler

Direkt Yöntem				Uzun Süreli Kültür Yöntemi			
Başarılı		Karyotip		Başarılı		Karyotip	
Sayı	%	Sayı	Tip	Sayı	%	Sayı	Tip
38	95.0	16	46,XX	40	100.0	16	46,XX
		10	46,XY			11	46,XY
		3	47,XX,+21			1	47,XY,+16
		1	47,XY,+21			3	47,XX,+21
		1	47,XXY			1	47,XY,+21
		4	45,XO			4	45,XO
		2	92,XXYY			2	92,XXYY
		1	45,XY,t(13/14)			1	45,XY,t(13/14)

Çizelge 4.4: SAB'lardaki kromozom anomalilerinin frekans ve tipinin gestasyonel yaşa göre dağılımı

Gestasyonel yaş (Hafta)	Abortus Sayısı	Anomalili Abortus (%)	Anormal Karyotipli Abortuslar (%)			
			Trizomi	Monozomi	Tetraploidi	Yapısal Anomali
5 - 6	9	55.6	33.3	22.2	.0	.0
7 - 8	12	33.3	16.7	8.3	8.3	.0
9 - 10	11	27.3	9.1	9.1	9.1	.0
11 - 12	8	12.5	.0	.0	.0	12.5
Toplam	40	32.5	46.2	30.8	15.4	7.7



Çizelge 4.5: SAB'larda saptanan kromozom düzensizliklerinin tip ve frekansının maternal yaşa göre dağılımı

Gestasyonel yaş (yıl)	Abortus Sayısı	Anomalili Abortus (%)	Anormal Karyotipli Abortuslar (%)			
			Trizomi	Monozomi x	Tetraploidi	Yapısal Anomali
≤ 19	4	25.0	.0	25.0	.0	.0
20 - 24	13	23.1	.0	15.4	7.7	.0
25 - 29	9	33.3	11.1	11.1	.0	11.1
30 - 34	7	28.6	14.3	.0	14.3	.0
35 - 39	4	50.0	50.0	.0	.0	.0
≥ 40	3	66.7	66.7	.0	.0	.0
Toplam	40	32.5	46.2	30.8	15.4	7.7

Çizelge 4.6: Gestasyonel ve maternal yaş ile fetal karyotip ilişkisi

Karyotip	Abortus Sayısı	Gestasyonel yaş (hafta)	Maternal yaş (yıl)
Normal	27	11.5 ± 2.7	28.6 ± 1.6
Anomalili	13	8.1 ± 2.6	31.8 ± 3.2
Trizomi 21	4	9.6 ± 1.8	33.5 ± 3.2
Trizomi 16	1		
Seks kromozom trizomisi	1		
Monozomi X	4	7.9 ± 2.0	24.2 ± 1.9
Tetraploidi	2	8.2 ± 1.1	27.9 ± 2.6
Yapısal anomali	1	12	27

Çizelge 4.7: Normal karyotipli fetuslarda cinsiyet oranı

Sayı	Cinsiyet	Maternal yaş (yıl)	Gestasyonel yaş (hafta)	Sayı	Oran
27	E	28.1 ± 2.8	11.2 ± 2.3	11	0.69
	K	29.2 ± 1.6	11.6 ± 1.1	16	

## TARTIŞMA

İlk trimester spontan abortus örneklerine ilişkin sitogenetik ve elektron mikroskopik değerlendirmeler Bulgular bölümünde izlenen sıraya göre sitogenetik ve elektron mikroskopik analizler olmak üzere iki ana başlık altında tartışılacaktır.

### 5.1. Sitogenetik Analizler

#### 5.1.1. Uygulanan sitogenetik yöntemlere ilişkin bulguların tartışılması

Koryonik villusların sitotrofoblast hücrelerinin yüksek mitotik aktiviteye sahip olma özelliğinden yararlanılarak Simoni et al. (1983) tarafından geliştirilen direkt yöntem ile çok kısa sürede fetal karyotip saptanabilmekte, hücrelerin kültüre edilmeleri gerekmediğinden maternal ve bakteriyal kontaminasyon riski minimum olmaktadır. Direkt yöntemin bu avantajlarına karşın yeterli ve kaliteli metafaz elde etme zorluğu nedeniyle fetal karyotipin belirlenememesi bu yöntemin kullanımını sınırlamaktadır (7, 54, 94, 108, 109, 119, 128).

Bu çalışmada, Çizelge 4.1 de görüldüğü gibi abortus örneklerine uygulanan direkt yöntemde % 95 başarı elde edilmiş ve fetal karyotipin saptanması için yeterli düzeyde metafaz incelenmiştir. Bu başarı koryonik villus örneklerinin 36 saat kültüre edilmesi ile elde edilmiştir. Bu çalışmada uygulanan direkt yöntem diğer araştırmacılar tarafından da direkt yöntemin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için önerilmektedir (50, 108, 109, 110, 112, 128). Ancak, araştırmacılar örneklerin kültür süresi için 24-56 saati bildirmektedirler. Ancak Zahed, Murer-Orlando ve Bobrow (1988)un villuslarda gerçekleştirdikleri hücre siklus çalışmalarında direkt yöntemde mitotik aktivitelerinden yararlanılan

sitotrofoblastlar hücrelerinin S fazı ile total siklus süresinin heterojen olmakla birlikte diğer hücrelere göre biraz daha uzun olduğunu ve hemen tüm hücrelerin 36 saat içerisinde bir siklusu tamamladıklarını bildirmişlerdir. Bu nedenle bizim çalışmamızda villus örnekleri 36 saat kültüre edilmiş ve başarılı sonuç alınmıştır.

Çizelge 4.1 de görüldüğü üzere sitotrofoblastların mitotik aktivite oranları gestasyonun 7 ile 10uncu haftalar arasında yüksek düzeyde iken gebeliğin ileri dönemlerinde bu oranda azalma gözlenmiştir ki bu bulgumuz Tedde ve Tedde Piras (1978) ile uygunluk göstermektedir. Araştırmacılar sitotrofoblastların mitotik aktivitelerinin gestasyonun 6 ile 10uncu haftalar arasında arttığını, 9uncu haftada maksimum düzeye ulaştığını, daha sonra ise yavaş yavaş azaldığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada abortus örneklerine hem direkt hem de uzun süreli kültür yöntemleri birlikte uygulanmış ve saptanan kromozom kuruluşları bakımından yöntemler arasında herhangi bir farklılığın olmadığı, her iki yöntemin birbirini destekler nitelikte olduğu gözlenmiştir. Koryonik villusların fetal karyotip tayininde kullanılmasında karşılaşılan en büyük problem yalancı pozitiflik, yalancı negatiflik ile mozaizizm ve pseudomozaizizm arasındaki farkın değerlendirilememesidir. Özellikle direkt yöntemin uygulandığı örneklerde yalancı pozitiflik oranı oldukça yüksektir ve bu yöntemin fetusun kromozom kuruluşunu yansıtmadığı önesürülmektedir (25, 40, 52, 80, 99, 105, 110, 111, 120, 131). Ancak bizim çalışma bulgularımızda herhangi bir mozaizizm ve pseudomozaizizm olasılığına rastlanılmamış ve her iki yöntemin bulguları birbirlerini desteklemiştir.

Yalancı pozitiflik ve negatiflik ile mozaizizme yol açan ve CV örneklerinin uzun süreli kültüre edilmesinde karşılaşılan en büyük problem maternal hücre kontaminasyonudur. Bizim çalışmamızda fetal villusların ayırımında son derece hassas davranılmış ve buna bağlı olarak da herhangi bir maternal hücre kontaminasyon riski ile karşılaşılmamıştır.

Desidual hücrelerin mitotik yeteneklerinin olmaması direkt yöntemde maternal kontaminasyon riskini azaltmaktadır. Bartels and Hansmann (1990)

direkt yöntemin uygulandığı çalışmalarında 208 erkek fetusa ilişkin 6,000 den fazla metafaz incelediklerini ve sadece bir metafazda dişi karyotip saptadıklarını ve bu nedenle direkt yöntemde maternal kontaminasyon riskinin hemen hiç yok denebilecek kadar minimum olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca fetal villus ayırımında çok dikkatli davranılması ve maternal hücre üremesini azaltan düşük serum konsantrasyonlu özel besiyerlerinin kullanılması uzun süreli kültürde de maternal kontaminasyon olasılığını azaltmaktadır. Bu çalışmada uzun süreli kültür yönteminden elde edilen metafazlarda da herhangi bir maternal hücreye rastlanılmamış olmakla birlikte CVS değerlendirilmelerinde hem direkt hem de uzun süreli kültür yöntemlerinin birlikte kullanılması gerekli olduğu düşüncesindeyiz. Bazı merkezler tek bir yöntemin uygulanmasını tercih ederlerken, direkt yöntemdeki mozaizm-pseudomozaizm, uzun süreli kültür yönteminde ise maternal kontaminasyon riski bir kaç merkezde her iki yöntemin birlikte uygulanması zorunluluk olarak değerlendirilmekte, direkt yöntemin uygulanmadığı ya da yöntemler arasında farklılıkların saptandığı durumlarda maternal ve fetal kromozomların floresans polimorfizmi ile karşılaştırılması gerektiğini savunmaktadırlar (7, 26, 79, 92, 105).

Çizelge 4.2 de CVS'in uzun süreli kültürlerinde farklı besiyerlerinin verimi değerlendirilmiştir. Bulgularımıza göre RPMI-1640 gerek kültürlerdeki ilk üremenin başladığı gün, gerekse kültürlerin çalışmaya alınma süresi diğer besiyerlerine göre daha kısadır. Örneklerin % 77.5 kadarının kültürün başlamasından maksimum 7 gün sonra üremeye başladığı ve % 75 kadarının da 12inci günde preperat haline getirilebilecek düzeye ulaştığı gözlenmiştir. Bu süreler Chang ve Ham's F-10 besiyerlerinde uzamaktadır. Chang besiyerinin kültürlerde maternal hücrelerin üreme riskini azaltan özel bir besiyeri olup tüm kültürlerde çok başarılı olduğu ve pek çok merkez tarafından tercih edildiği bildirilmektedir (24, 27, 112). Ancak bizim bulgularımıza göre RPMI-1640'ın koryonik villus örnekleri için uygun bir besiyeri olduğu, Chang besiyerinin ise alternatif olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.1 de uzun süreli kültür yönteminin uygulandığı örneklerin üreme kapasitesi ile bu örneklerin gestasyonel yaşları arasındaki ilişki de özetlenmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi gestasyonun 6 ile 9uncu haftaları arasında gerçekleşen abortusların % 77.5 kadarında fetal karyotip 14üncü günde saptanmıştır. Bu bulgumuz, villus hücrelerinin mitotik aktivitelerinin 10uncu

haftaya kadar maksimal düzeyde olduğunu bildiren araştırmalarla uygunluk göstermektedir (24, 97, 118).

### 5.1.2. Kromozom anomali frekansı ve anomali tiplerine ilişkin bulguların tartişılması

Bu çalışmada gestasyonun 6 ile 12inci haftaları arasında gerçekleşen 40 spontan abortus rneği sitogenetik yönden değerlendirilmiş ve anomali saptanan örneklerde plasentanın ultrastrüktürel yapısında modifikasyonun olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Sitogenetik analizleri yapılan 40 abortus örneğinin 13 nde (% 32.5) anomalili karyotip saptanmıştır. Bu oran geniş çaplı incelemelerin yapıldığı araştırmalarda saptanan oranlarla karşılaştırıldığında (izelge 5.1) bizim saptadığımız anomali insidansının düşük olduğu gözlenmektedir. Ancak izelgede de görüldüğü gibi değişik araştırmalarda saptanan anomali insidansı % 19 (Andrews et al. 1994) ile % 69.4 (Ohno et al. 1991) arasında geniş bir spektrum oluşturmakta olup bu çalışmada saptanan % 32.5 anomali oranı bu geniş spektrum içerisinde yerini almıştır.

SABlarda gözlenen anomali oranının bu kadar geniş bir spektruma dağılmasında pek çok faktör etkili olmaktadır. Bunlardan biri incelenen abortus örneklerinin gestasyonel yaşlarının etkisidir. ldoğumlarda sadece % 0.6, ileri dönem SABlarda % 6.5 ile % 11.5 (Warburton 1980, Eiben et al. 1990) arasında anomali saptanırken 8-12 haftalık abortuslarda % 25; 2-7 haftalık abortuslarda ise oranın birden artarak % 66lara ulaştığı bildirilmektedir (Boue and Boue 1985, Rehder et al. 1989). Rehder et al (1989) gestasyonun 7 ile 16ıncı haftaları arasındaki abortuslarda % 58.5 oranında anomali saptarken, Hassold et al. (1980a) 24nc gebelik haftasına kadar olan abortusları değerlendirmiş ve % 46 oranında anomali belirlemiştir. Çizelge 5.1 de de gözlendiği gibi değişik gestasyonel dönemlerde saptanan anomali oranları çeşitlilik göstermektedir. Bu çalışmada değerlendirilen abortusların gestasyonel dönemlerine uyum sağlayan araştırmalar karşılaştırıldığında da aynı heterojenite ile karşılaşılmaktadır (izelge 5.2). Hassold et al (1980b) 8 ile 11inci haftalar arasında % 37.2, Eiben et al.

(1990) 5 ile 12inci haftalar arasında % 44.1, Röcklein et al. (1990) 6 ile 16ıncı haftalar arasında % 38.3, Andrews et al. (1984) 5 ile 16ıncı haftalar arasında % 19, Lin et al. (1985) 6 ile 16ıncı haftalar arasında % 37.2, Ohno et al. (1991) 6 ile 16ıncı haftalar arasında % 69.4, Bain et al (1985) 20inci haftaya kadar olan abortuslarda % 42, Hansmann, Bartels and Schubbe ise 15inci haftaya kadar olan abortuslarda % 42.6 oranında kromozom düzensizliği saptamışlardır. Bu oranlara göre bizim çalışmamızda saptadığımız % 32.5 düzeyindeki oran çok büyük farklılık göstermemektedir.

SABlarda gözlenen kromozom anomali tip ve insidansını etkileyen diğer bir faktör de maternal yaştır. Trizomi 21 ile ileri anne yaşı arasındaki korelasyon 1960lardan beri bilinmektedir (Carr 1971). Abortusların sitogenetik yönden incelenmeye başlamasıyla bu ilişkinin yalnız Trizomi 21 için değil, genel olarak tüm trizomiler için de geçerli olduğu saptanmıştır (9, 34, 41, 42, 43, 44, 45, 73, 96, 98, 103, 191).

Ancak trizomi ile ileri anne yaşı arasındaki ilişkinin özellikle küçük kromozom (13-22inci kromozomlar) trizomilerinde çok belirgin olduğu, A, B ve C grubu trizomilerinde maaternal yaş etkisinin daha düşük olduğu bildirilmektedir (41, 42, 43, 44, 45, 57). Lin, Braekeler and Jamra (1985) normal ve anormal karyotipli abortusları ortalama maternal yaş bakımından değerlendirdiğinde bir farklılığın olmadığını, ancak trizomik abortuslarda ortalama maternal yaş oranında anlamlı bir artışın olduğunu bildirmişlerdir. Bugüne kadar SAB örneklerinde yapılan incelemelerde en yüksek oranı saptayan Ohno, Maeda ve Matsunobu (1991) grubu trizomik abortuslar arasında maternal yaş yönünden belirgin bir farklılığın bulunduğunu ve saptadıkları yüksek oranın örneklerindeki ileri maternal yaş yoğunluğundan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu bulgu diğer araştırmalarda da saptanmıştır (3, 33, 34).

Bu çalışmada normal karyotipin saptandığı örneklere ilişkin ortalama maternal yaş  $28.2 \pm 1.6$ , anomalili karyotip saptanan örneklerin ise  $29.8 \pm 3.2$  iken trizomik abortuslarda  $33.5 \pm 3.2$  dir. Trizomik abortuslarda maternal yaşın anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır ki bu bulgumuz literatürle uyum sağlamaktadır.



5.1: SAB'larda saptanan kromozom düzensizliklerinin tip ve frekansı

Referans	Karyotiplenen Örnek Sayısı	Anomalili Karyotip %	Trizomi	45,XO	Tetraploidi	Yapısal Anomali
d et al. 1980	1000	46.3	49.0	24.2	7.1	4.3
t al. 1980	402	53.5	58.6	19.5	3.3	5.1
ws et al. 1984	154	19.0	48.3	27.6	3.5	3.5
t al. 1985	2000	42.0	-	-	-	-
et al. 1985	1498	61.5	53.7	15.3	6.2	3.8
al. 1985	215	37.2	31.3	18.8	3.7	7.6
mann et al. 1986	34	42.6	64.5	7.1	-	16.2
r et al. 1986	100	28.0	32.1	21.4	-	-
et al. 1987	140	48.6	66.2	7.4	22.1	4.4
et al. 1990	750	50.1	62.1	10.5	9.2	4.7
r et al. 1989	200	58.5	45.2	10.3	8.6	1.7
ein et al. 1990	61	59.0	69.4	16.4	13.8	-
et al. 1991	144	69.4	64.0	7.0	9.0	6.0
ki Çalışma 1992	40	32.5	46.2	30.8	15.4	7.7

Çizelge 5.2: Bu çalışmaya uygun gestasyonel dönemlerde saptanan kromozom düzensizlik insidansı

Literatür	Gestasyonel Yaş (hafta)	Anomali Oranı (%)
Hassold et al. 1980	8 - 11	37.2
Andrews et al. 1984	5 - 16	19.0
Bain et al. 1985	≤ 20	42.0
Lin et al. 1985	6 - 16	37.2
Hansmann et al. 1986	≤ 15	42.6
Procter et al. 1986	8 - 27	28.0
Eiben et al. 1987	6 - 24	48.6
Eiben et al. 1990	5 - 12	44.1
Röcklein et al. 1990	6 - 16	38.3
Ohno et al. 1991	6 - 16	69.4
Şimdiki Çalışma 1992	6 - 12	32.5

SABlarda yapılan sitogenetik analizlerde trizomi ilk sırayı alırken monozomi X, poliploidi ve yapısal anomaliler değişik sıralarda trizomiye takip etmektedirler. Bu çalışmada da en çok gözlenen anomali tipi trizomidir (% 46.2). Bunu monozomi X (% 30.8), tetraploidi (% 15.4) ve yapısal kromozom anomalisi (%7.7) takip etmektedir. Literatürdeki anomali tip oranları ile bu çalışmanın değerleri karşılaştırıldığında (Çizelge 5.1) bizim çalışmamızda saptadığımız Monozomi X oranı diğer çalışmalardaki monozomi X düzensizlik oranlarından

yüksektir. Araştırma grubunda normal karyotipin gözleendiği örneklerde ortalama maternal yaş  $28.2 \pm 3.2$  iken monozomi X'in saptandığı olgularda  $26.2 \pm 1.9$  dur. Monozomi X'in yüksek oranda gözlenmesinin araştırma popülasyonundaki genç annelerden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çünkü abortuslarda yapılan incelemelerde monozomi X düzensizliğinin saptandığı örneklerin anne yaşlarının, trizomilerdekinin aksine normal popülasyona göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (13, 33, 34, 42, 56, 73, 123). Aynı eğilim poliploidide de gözlenmiştir. Bu çalışmada triploidik olgulara hiç rastlanılmamıştır ki bunun çalışma popülasyonunun küçük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna karşılık literatürde % 1.7 (Rehder et al. 1989) ile % 7.6 (Lin et al. 1985) arasında gözlenen tetraploidi bu çalışmada % 7.7 oranında saptanmıştır. Tetraploidik olguların maternal yaşlarının da ( $27.9 \pm 2.6$ ) normal ve anomalili karyotipe sahip olgulardan daha düşük olduğu gözlenmiştir ki bu bulgumuz da literatürle uyum içindedir (33, 34, 42, 91)

Bu bulgulara dayanarak bu çalışmada saptanan kromozom anomali oranının (% 32.5) düşük olmasında maternal yaşın genç olmasının etkisinin büyük olduğu kanısındayız.

Bu çalışmada gözlenen trizomik abortuslarda trizomi 21, trizomi 16 ve seks kromozom trizomisi saptanmıştır. Trizomilerin özellikle küçük kromozomlarda gözlenmesi görüşü ile bizim bulgumuz benzerlik göstermekle birlikte abortusları değerlendiren diğer çalışmalar incelendiğinde ilk sırayı 22inci kromozom trizomisi alırken bunu trizomi 16 ve trizomi 21 izlemektedir. Bu çalışmada ise trizomi hiç gözlenmemiş, buna karşılık trizomi 21 4 örnekte, trizomi 16 ise sadece bir örnekte saptanmıştır. Trizomi tipleri bakımından bulgularımız literatürden farklılık göstermektedir.

### **5.1.3. Normal karyotipli fetuslardaki cinsiyet oranına ilişkin bulguların tartışılması**

Direkt ve uzun süreli kültür yöntemleriyle incelenen ve sonuçları birbirini destekleyen ilk trimester abortus örneklerinde normal karyotip saptanan 28

örnekte genel erkek:kız oranı 0.69 (11:16) olarak belirlenmiştir. Normal karyotipli kızların daha fazla olduğunu gösteren bu bulgu maternal hücre kontaminasyon olasılığını ortaya çıkarmaktadır. Ancak yukarı bölümlerde de belirtildiği gibi örneklerin değerlendirilmesinde direkt yöntem uygulandığı ve kültür yönteminde elde edilen karyotiplerle paralellik gösterdiğinden bu olasılık ortadan kaldırılmıştır. Bartels and Hansmann (1990) direkt yöntemin uygulandığı çalışmalarında 208 erkek fetusa ilişkin 6,000 den fazla metafaz incelediklerini ve sadece bir metafazda dişi karyotip saptadıklarını ve bu nedenle direkt yöntemde maternal kontaminasyon riskinin hemen hiç yok denebilecek kadar minimum olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar 250 SAB'da yaptıkları çalışmalarında normal karyotipli örneklerdeki cinsiyet oranı 0.77 olarak saptamışlar ve gebeliğin erken döneminde normal karyotipli fetusların kaybını gestasyonun ilk günlerinde gerçekleşen biyolojik fenomenden kaynaklandığını, X kromozomlarının inaktivasyon ya da reaktivasyonu sırasındaki bir düzensizliğin etkenlerden biri olabileceğini bildirmektedirler. Diğer araştırmacıların çalışmalarında da normal karyotipli dişi fetusların daha fazla olduğu gözlenmiştir (33, 34, 42, 73, 91).

## 5.2. Elektron Mikroskopik Analizlere İlişkin Bulguların Tartışılması

Plasentanın farklı gelişim dönemlerinde villuslarda ortaya çıkan morfolojik modifikasyonlar ile mikrovillusların yapısal organizasyonundaki değişimler pek çok araştırmacı tarafından incelenmiştir (17, 18, 19, 62, 63, 89, 106, 107). Koryonik villusların sayısı ve boyları artarken çapları küçülür, villus ağacı devamlı dallanarak stem, intermediate ve terminal villuslar ortaya çıkar. Gestasyon boyunca, plasental villusların farklı komponentlerinde de morfolojik modifikasyonlarla karşılaşılır: sitotrofoblastik hücreler yavaş yavaş kaybolur, villus stromasının kalınlaşmasına bağlı olarak sinsisyal tabaka inceler. Bazı araştırmacılar bu modifikasyonları plasental yaşlanma olarak değerlendirirken, daha rasyonel olan çalışmalar bu değişimleri maturasyon ve farklılaşma olarak yorumlamaktadırlar (8, 29, 89).

Değişik gestasyonel dönemlerdeki normal plasenta incelemelerinin yanısıra SAB örneklerinde de histolojik ve ultrastrüktürel analizler pek çok araştırmacı

tarafından gerçekleştirilmektedir (8, 51, 65, 78, 88, 103). Ancak ultrastrüktürel ve üç boyutlu plasental villus incelemeleri özellikle son yıllarda yoğunlaşmıştır.

Bu çalışmada saptanan kromozom düzensizliklerine paralel olarak yürütülen ultrastrüktürel incelemelerde normal karyotipli örnekler göre kromozom anomalili olgularda belirgin bir plasental immatürite dikkati çekmektedir. Tüm örneklerin villuslarında sinsisyal dallanma çok minimum düzeyde gözlenirken, sinsisyotrofoblastların selüler yüzeyindeki özelleşmenin yani mikrovillus oluşumunun yetersiz ve/veya düzensiz olduğu geniş stem villuslar saptanmıştır. Trofoblastik yüzey, maternal kandan metabolit transportunun yapıldığı ilk noktadır. Bu yüzeyin oldukça geniş ve düzenli olması transportun yeterli düzeyde yapılabilmesi için şarttır. Ancak örneklerimizde mikrovillusların yetersiz ve dejenere olması anne-fetus arasındaki alışverişin etkili düzeyde yapılmasını engellemiştir. Plasentanın yetersiz olması fetusun gelişimini etkileyerek gelişme geriliğine ve daha ileri düzeyde fetal ölüme neden olmaktadır. Örneklerimizde saptadığımız bu özellikler literatürle uyum içindedir (8, 78, 89, 98, 103).

Kromozom düzensizliğine sahip abortus örneklerimizde özellikle monozomi X saptananlarda mikrovillus gelişimi son derece yetersizdir (Resim 5) ki bu da monozomi X gösteren fetusların diğer anomalili fetuslara göre daha erken dönemde abort olmalarının nedenini açıklamaktadır.

Plasental immatürite nedenlerinden biri de sinsisyal dallanmanın yetersiz olmasıdır. Genel olarak tüm kromozom anomalili fetuslarda saptanan yetersiz sinsisyal dallanma matür ve terminal villus dallanmasını ve dolayısıyla da arborizasyonu engellemiştir. Örneklerimizde incelediğimiz tüm villuslar avaskülerdir ki iki bulgumuz birbirini desteklemektedir.

Maternal sirkülasyondaki oksijen fetal sirkülasyona geçerken fetustaki CO<sub>2</sub> in maternal kana geçmesi plasental villuslar aracılığıyla olmakta ve sinsisyotrofoblastlarda bulunan karbonik anhidraz enzimi bu reaksiyonu katalizlemektedir (Aliakbar, Brown and Nicolaidis 1990). Ancak, özellikle trizomik olgularda olmak üzere kromozom anomalili tüm örneklerde ileri

düzeyde sinsisyum dejenerasyonu ile karşılaşmıştır ki bu da karbonik anhidraz enziminin katalizleme görevini tam olarak yerine getirememesine ve buna bağlı olarak anne-fetus arasındaki gaz transportunun yetersiz olmasına yol açmış olabilir.

Bu çalışmada trizomik abortusların bir bölümünde myelin figürler saptanmıştır ki literatür değerlendirmesinde bu tür bir yapıya rastlanılmamıştır. Miyelin figürler, EM analizlerinde örneklerin glutaraldehit fiksasyonuna bağlı olarak da çıkabilmektedir. Ancak tüm örnekler aynı prosedürün uygulanmasına karşın bu tür yapıların sadece üç örnekte gözlenmesi anlamlı olarak değerlendirilmiş ve bu yapıların teknik hatadan değil, olgulara ilişkin endokrinolojik ve ultrastrüktürel özelliklerden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Miyelin figürler hCG sekresyon düzensizliğinin ileri safhasında ortaya çıkar. Myelin figürlerin saptandığı olgularda sinsisyotrofoblast dejenerasyonu ileri düzeydedir. Sinsisyotrofoblastlarda bulunan EGF reseptörleri dejenerasyona bağlı olarak hCG ve hPL sekresyon düzeyini düzenleme görevini yerine getirememiş olabilir. hCG korpus luteumun dejenere olmasını engellemektedir. Ancak yetersiz miktardaki hCG sekresyonu korpus luteumun dejenere olmasına yol açmış ve buna bağlı olarak da abortus gerçekleşmiştir.

Röcklein et al. (1990) poliploidik abortus örneklerinde fibrin birikimi ile fibröz villus stromasının saptandığını ve bu bulguların retansiyon ile bağlantılı olabileceğini bildirmiştir. Bizim tetraploidik iki olgumuzda da trofoblast dejenerasyonu ile birlikte seyreden fibrin birikimi gözlenmiştir. Honore et al. (1976), tetraploidik olgularda fokal villöz enfaktını spesifik düzensizlik olarak bildirmekle birlikte bu çalışmada bu yapıyla karşılaşmamıştır.

Sitogenetik inceleme yapmadan, ultrastrüktürel yapının incelenmesiyle anomalili karyotipin saptanıp saptanamayacağı pek çok araştırmacı tarafından değerlendirilmiştir. Honore et al. (1976), sadece plasental histolojiyi değerlendirerek % 80 doğru karyotipik tanıya ulaştıklarını bildirmektedirler. Ancak, doğru karyotipe ulaşma başarısı Muntefering et al. (1987) (Minguillon 1987'den) tarafından % 67, Minguillon et al. (1987) tarafından ise % 55 olarak bildirilmiştir. Bunlara karşılık Novak et al. (1988) normal ve anomalili karyotipli örneklerin histolojik bulguları arasında anlamlı farklılıkların olmadığını, Rehder

ve ark. (1989) da kromozom analizi yapılmadan kromozom düzensizliğinin belirlenmesini sağlayacak spesifik morfolojik kriterlerin olmadığını, plasental morfolojinin kromozom düzensizliğinin tipinden çok şiddeti ve ortaya çıkışına bağlı olduğunu, anormal villus yapısının anomalili karyotipte gözleneceği gibi normal karyotiplerde de bulunabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, araştırma popülasyonunun çok küçük olması ve buna bağlı olarak kromozom anomalili örnek sayısının az olması, her kromozom düzensizliğine spesifik olan bir düzensizliğin kesin olarak belirlenmesini kısıtlamıştır. Bununla birlikte, bulgularımız ve literatür doğrultusunda her kromozom düzensizliğine özgü ultrastrüktürel yapının olmadığını, genel bazı modifikasyonların anormal karyotipli tüm plasentalarda gözlendiğini savunuyoruz. Kromozom düzensizliği, ultrastrüktürel yapı ve hormonal denge faktörlerinin karşılıklı etkileşimi ile abortusların oluştuğunu öne sürmekle birlikte bu üçlünün etkilerinin detaylı olarak incelenmesi gerektiği görüşündeyiz.

## 6. SONUÇ

Bu çalışmada, gestasyonel yaşları 6 ile 12inci haftalar arasında olan 40 spontan abortus materyali sitogenetik ve ultrastrüktürel yapı bakımından incelenmiş, sitogenetik analizlerde uygulanan yöntemler ile kullanılan besiyerleri, kromozom anomali insidans ve tipleri, elektron mikroskopik analizlerde ise anomalili karyotip ile ultrastrüktürel yapı arasında bir ilişki olup olmadığı değerlendirilerek şu sonuçlara varılmıştır.

Abortus örneklerinin sitogenetik analizlerinde koryonik villuslara hem direkt hem de uzun süreli kültür yöntemleri birlikte uygulanmıştır. Direkt yöntem için geçerli olan yeterli ve kaliteli metafaz elde etme zorluğu villusların 36 saat kültüre edilmesi ile çözümlenmiş ve 38 örnekte (% 95) başarı elde edilmiştir.

CVS'e uygulanan ikinci yöntem olan uzun süreli kültür yönteminde Chang, Ham's F-10 ve RPMI-1640 besiyerleri karşılaştırmalı olarak kullanılmış ve RPMI-1640 besiyerinin kullanıldığı kültürlerde hücreler diğer kültürlerle göre daha kısa süre içinde üremeye başlayarak mikroskopta incelenebilecek duruma gelmişlerdir. Bu bulgular doğrultusunda CVS için RPMI-1640 ın en verimli besiyeri olduğu, Chang besiyerinin veriminin daha düşük olmasından dolayı RPMI-1640a alternatif olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Direkt yöntemde mozaisizm-pseudomozaisizm, uzun süreli kültür yönteminde de maternal hücre kontaminasyon riski ile karşılaşılmanın, her iki yöntemin bulguları birbirini desteklemiştir. Bununla beraber, direkt ve uzun süreli kültür yöntemlerinin birlikte kullanılması, direkt yöntemin uygulanmadığı durumlarda maternal ve fetal kromozomların floresans polimorfizmi bakımından değerlendirilmesinin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.



Gestasyonun erken dönemlerinde gerçekleşen abortus örneklerinin ileri dönemlerde gerçekleşenlere göre çok daha kısa sürede üredikleri, mitotik aktivitelerinin gestasyonun 10uncu haftasına kadar en yüksek düzeyde oldukları, daha sonra yavaş yavaş azaldıkları saptanmıştır.

Gebeliğin 6-12inci haftaları arasında gerçekleşen 40 SAB örneğinin % 32.5 kadarında kromozom anomalisi saptanmıştır. Kromozom anomali oranının diğer çalışmalara göre düşük olmasının; araştırma popülasyonundaki genç annelerin oranının yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir .

Saptanan kromozom düzensizlikleri arasında trizomik abortuslar ilk sırayı alırken, monozomi X, tetraploidi ve yapısal kromozom anomalisi diğer gözlenen anomalilerdir. Gestasyonel dönem ile anomali tipleri karşılaştırıldığında monozomi X saptanan örneklerin daha erken dönemlerde abort olduğu, buna karşılık trizomik fetusların en geç atılan örnekler olduğu gözlemlendi. Buna bağlı olarak trizomi 16 ve 21 düzensizliklerinin daha az letal , buna karşılık monozomi X sayısal anomalisinin letalite oranının çok yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Maternal yaş ile anomali tip ilişkilerinde ise trizomik abortuslardaki anne yaşının normal ve anomalili örneklerin anne yaşlarından anlamlı düzeyde fazla olduğu, buna karşılık monozomi X gösteren örneklerdeki anne yaşının ise en düşük ortalamayı gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca, bu çalışmada monozomi X oranının diğer araştırmalara göre daha yüksek oranda gözlenmesinde araştırma popülasyonunun genç annelerden oluşmasının etken olduğu kanısına varılmıştır. Tetraploidide de ortalama anne yaşının diğer oranlara göre daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Kromozom düzensizliği olan abortus örnekleri ultrastrüktürel olarak incelenmiş ve belirli kromozom düzensizliklerine spesifik olan ultrastrüktürel modifikasyonların olup olmadığı değerlendirilmiştir. İncelemeler sonucunda trizomik örneklerde ileri derecede mikrovillus ve sinsisyotrofoblast

dejenerasyonunun hakim olduğu, intervillöz boşlukta sinsisyal kalıntıların yoğun olarak bulunduğu gözlendi ve sinsisyotrofoblast dejenerasyonuna bağlı olarak anne-fetus arasındaki gaz ve metabolit alışverişinin yetersiz olmasıyla abortusun olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun yanısıra trizomik abortusların bazılarının sinsisyotrofoblast hücrelerinde saptanan miyelin figür oluşumunun da plasentadaki hormonal dengeyi bozarak korpus luteum dejenerasyonuna ve buna bağlı olarak da abortusa neden olduğu kanısındayız. Özellikle monozomi X olmak üzere diğer tüm anormal karyotipli örneklerde mikrovillus sayısındaki belirgin azalma ve hidropik görünüm diğer ince yapı düzensizlikleridir.

Tüm kromozom anomalili örnekler diğer normal karyotipli örneklerle ultrastrüktürel yapı bakımından karşılaştırıldığında villöz dallanmanın ve mikrovillus oluşumunun anomalili örneklerde yetersiz olmasına bağlı olarak ortaya çıkan plasental immatüritenin ortak bir özellik olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmada, araştırma populasyonunun küçük olması ve buna bağlı olarak anomalili karyotipe sahip örnek sayısının yetersiz olması, her kromozom düzensizliğine spesifik olabilecek ultrastrüktürel yapının belirlenmesini engellemiştir. Ancak bu çalışmada, abortusların anomalili karyotip, ultrastrüktürel yapı ve hormonal denge faktörlerinin karşılıklı etkileşiminden kaynaklandığı, her kromozom düzensizliğine özgü olabilecek bir ultrastrüktürel yapının bulunmadığı, genel olarak tüm anomalili karyotipe sahip fetuslarda plasental immatüritenin ortak bir bulgu olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu incelemelerin devam etmesi ve üç boyutlu villus yapıları ile karyotiplerin birlikte değerlendirilmesi ile bu konunun aydınlığa kavuşacağı kanısındayız.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Aliakbar, S., Brown, P.R., Nicolaidis, K.H.: Localization of CAI and CAIII isoenzymes in normal term human placenta by immunofluorescence techniques. *Placenta*, **11**: 35-39, 1990.
2. Andrews, T., Dunlop, W., Roberts, D.F.: Cytogenetic studies in spontaneous abortuses. *Hum.Genet.*, **66**: 77-84, 1984.
3. Bain, A.D., Ellis, D.M., Gibson, J., Holwill, A.M.G., Johnston, T.H., Murray, R.S.: The cytogenetics of early abortion in South-East Scotland. *Amer.J.Hum.Genet.*, **37**(Suppl.):A86, 1985.
4. Bartels, I., Hansmann, I.: Excess of females in chromosomally normal spontaneous abortuses. *Am.J.Med.Genet.*, **35**: 297-298, 1990.
5. Başaran, N.: Laboratory Manual. Anadolu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Eskişehir, 1987.
6. Başaran, N.: Cytogenetic analyses of chorionic villi. T.C.Anadolu Univ.Yay.No.290, Tıp Fak.Yay.No. 20, Eskişehir, 1988.
7. Başaran, S., Miny, D., Holzgreve, W., Pawlowitzki, I., Horst, J.: Prenatal tanıda sitogenetik yöntemler. *Jinek.Obstet.Derg.*, **1**: 180-186, 1987.
8. Biagini, G., Vasi, V., Pugnali, A., Valensise, H., Rizzoli, R., Miccoli, M.C., Mazzanti, L., Cester, N., Romanini, C.: Morphological development of the human placenta in normal and complicated gestation: A qualitative and ultrastructural study. *Gynecol.Obstet. Invest.*, **28**: 62-69, 1989.
9. Boue, J., Boue, A., Lazor, D.: Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology*, **12**: 11-26, 1975.
10. Boue, A., Boue, J.: Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv.Hum.Genet.*, **14**: 1-57, 1985.
11. Boyd, J.D., Hamilton, W.J.: Development and structure of the human placenta from the end of the 3rd month of gestation. *J.Obstet.Gynaec.Brit.Cwlth.*, **74**: 161-226, 1970.
12. Burton, G.J.: The fine structure of the human placental villus as revealed by scanning electron microscopy. *Scanning Microsc.*, **1**: 1811-1828, 1987.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

13. Canki, N., Warburton, D., Byrne, J.: Morphological characteristics of monosomy X in spontaneous abortions. *Ann.Genet.*, **31**: 4-13, 1988.
14. Caritis, S.N., Hirsch, R.D., Zeleznik, A.J.: Adrenergic stimulation of placental progesterone production. *J.Clin.Endoc.Metab.*, **56**: 969-972, 1983.
15. Carr, D.H.: Chromosomes and Abortion. *Adv.Hum.Genet.*, **2**: 201-249, 1971.
16. Carr, D.H.: Cytogenetic aspects of induced and spontaneous abortions. *Clin.Obstet.Gynecol.*, **15**: 203-219, 1972.
17. Castellucci, M., Zaccheo, D., Pescetto, G.: A three dimensional study of the normal human placental villus core. *Cell Tissue Res.*, **210**: 235-247, 1980.
18. Castellucci, M., Kaufmann, P.: A three dimensional study of the normal human placental villous core: II. Stromal architecture. *Placenta*, **3**: 269-285, 1982a.
19. Castellucci, M., Kaufmann, P.: Evolution of the stroma in human chorionic villi throughout pregnancy. *Bibl.Anat.*, **22**: 40-45, 1982.
20. Castellucci, M., Martinoli, C., Foidart, J.M., Zaccheo, D., Kaufmann, P.: The connective core of the human placental villi throughout pregnancy. An ultrastructural, immunohistochemical and immunological study. *J.Anat.*, **137**: 788-789, 1983.
21. Castellucci, M., Schweikhart, G., Kaufmann, P., Zaccheo, D.: The stromal architecture of the immature intermediate villus of the human placenta. *Gynecol.Obstet.Invest.*, **18**: 95-99, 1984.
22. Castellucci, M., Celona, A., Bartels, H., Steininger, B., Benedetto, V., Kaufmann, P.: Mitosis of the Hofbauer cell: Possible implications for a fetal macrophage. *Placenta*, **8**: 65-76, 1987.
23. Castellucci, M., Scheper, M., Scheffen, I., Celona, A., Kaufmann, P.: The development of the human placental villous tree. *Anat.Embryol.*, **181**: 117-128, 1990.
24. Chang, H. and Jones, O.W.: In vitro characteristics of human fetal cells obtained from chorionic villus sampling and amniocentesis. *Pren.Diagn.*, **36**: 367-378, 1988.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

25. Cheung, S.W., Crane, J.D., Beaver, H.A., Burgess, A.C.: Chromosome mosaicism and maternal cell contamination in chorionic villi. *Pren.Diagn.*, **7**: 535-542, 1987.
26. Cooke, H.M.G., Penketh, J.A., Delhanty, J.D.A.: An evaluation of maternal cell contamination in cultures of chorionic villi for the prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. *Clin.Genet.*, **30**: 485-493, 1984.
27. Czepulkowski, B.H., Rooney, D.E.: *Human Cytogenetics*, IRL Press, Oxford, 1986, pp: 1-36.
28. Demir, R., Erbenği, T.: Some new findings about Hofbauer cells in the chorionic villi of the human placenta. *Acta Anat.*, **119**: 18-26, 1984.
29. Demir, R., Kaufmann, D., Castellucci, M., Erbenği, T., Kotowski, A.: Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat.* **136**: 190-203, 1989.
30. Demir, R., Üner, M., Erbenği, T., Kaya, M.: Ultrastructural investigation of the effects of cigarette smoking on the human placenta. *J.Obstet.Gynecol.*, **10**: 289-298, 1990.
31. Dempsey, E.W.: The development of capillaries in the villi of early human placenta. *Am.J.Anat.*, **134**: 221-238, 1972.
32. Durfee, R.B., Pernoll, M.L.: Early Pregnancy Risks. In Pernoll, M.L.: *Obstetric and Gynecologic Diagnosis and Treatments.*, 7th Edit., Appleton and Lange, U.S.A., pp. 300-308, 1991.
33. Eiben, B., Borgmann, S., Schübbe, I., Hansmann, I.: A cytogenetic study directly from chorionic villi of 140 spontaneous abortions. *Hum.Genet.*, **77**: 137-141, 1987.
34. Eiben, B., Bartels, I., Bahr-Porsch, S., Borgmann, S.: Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am.J.Hum.Genet.*, **47**: 656-663, 1990.
35. Enders, A.C., King, B.F.: The cytology of Hofbauer cells. *Anatomical Record*, **167**: 231-252, 1970.
36. Faulk, W.P., McIntyre, J.A.: Trophoblast survival. *Transplantation*, **32**: 1-5, 1981.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

37. Fujikura, T., Ezaki, K., Nishimura, H.: Chorionic villi and syncytial sprouts in spontaneous and induced abortions. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **110**: 547-555,1971.
38. Habashi, S., Burton, G.J., Steven, D.H.: Morphological study of the fetal vasculature of the human term placenta:scanning electron microscopy of corrosion casts. *Placenta*, **4**: 41-56,1983.
39. Hansmann, I., Bartels, I., Schübbe, I.: Cytogenetic analysis of early human abortuses after preperation of chromosomes directly from chorionic villi. *Hum.Genet.*, **72**: 189, 1986.
40. Harrison, K.B.: X chromosome inactivation in the human cytotrophoblast. *Cytogenet.Cell Genet.*, **52**: 37-41, 1989.
41. Hassold, T., Matsuyama, A.: Origin of trisomies in human spontaneous abortions. *Hum.Genet.*, **46**: 285-94, 1979.
42. Hassold, T., Jacobs, P., Kline, J., Stein, Z., Warburton, D.: Effect of maternal age on autosomal trisomies. *Ann.Hum.Genet.*, **44**: 29-36, 1980a.
43. Hassold, T., Chen, N., Funkhouser, J., Jooss, T., Manuel, B., Matsuura, J., Matsuyoma, A., Wilson, C., Yamane, J.A., Jacobs,P.A.: A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions.*Ann.Hum.Genet.*, **44**:151-164, 1980b.
44. Hassold, T.: Mosaic trisomies in human spontaneous abortions. *Hum.Genet.*,**61**: 31-35, 1982.
45. Hassold, T., Warburton, D., Kline, J., Stein, Z.: The relationship ofmaternal age and trisomy among trisomic spontaneous abortions. *Am.J.Hum.Genet.*, **36**: 1349-1356, 1984.
46. Hatcher, N.H., Willey, A.M. (Eds): *Perinatal Genetics. Diagnosis and Treatment.* London, Academic Press, Inc., 1986, pp. 3-22.
47. Heaton, D.E., Czepulkowski, B.H., Horwell, D.H., Coleman, D.V.Chromosome analysis of first trimester chorionic villus biopsies prepared by a maceration technique. *Pren.Diagn.*, **4**: 279-287, 1984.
48. Heim, S., Kristoffersson, U., Mandahl, N., Mineur, A., Mitelman, F., Edvall, H., Gustavii, B.: Chromosome analysis in 100 cases of first trimester trophoblast sampling. *Clin.Genet.*, **27**: 451-457, 1985.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

49. Heinrich, D., Aoki, A., Metz, J.: Fetal capillary organization indifferent types of placenta. *Trophoblast Res.*, **3**: 149-162, 1988.
50. Holmes, D.S., Fifer, A.M., Mackenzie, W.E., Griffiths, M.J., Newton, J.R.: Direct and short term culture preparation of chorionic villi. Is any one method best? *Pren.Diagn.*, **8**: 501-509, 1988.
51. Honore, L.H., Dill, F.J., Poland, B.: Placental morphology inspontaneous human abortuses with normal and abnormal karyotypes. *Teratology*, **14**: 151-166, 1976.
52. Hunt, P.A., Jacobs, P.A.: In vitro growth and chromosome constitution of placental cells.I. Spontaneous and elective abortions. *Cytogenet.Cell Genet.*, **39**: 1-6, 1985.
53. Jauniaux, E., Burton, G.J., Moscoso, G.J., Hustin, J.: Development of the early human placenta: A morphometric study. *Placenta*, **12**: 269-276, 1991.
54. Jotterand-Bellomo, M., Gaide, A-C., Thonney, F.: Chromosome analysis of chorionic villi. Technique and Results. *Contr.Gynec.Obstet.*, **15**: 70-79, 1986.
55. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O.: *Basic Histology*. 6th edit., Typopress, Lebanon, 1989, pp. 452-458.
56. Kajii, T., Ohama, K.: Inverse maternal age effect in monosomy X. *Hum.Genet.*, **51**: 147-151, 1979.
57. Kajii, T., Ferrier, A., Niikawa, N., Takahara, H., Ohama, K.:Anatomic andchromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. *Hum.Genet.*, **55**: 87-98, 1980.
58. Kalousek, D.K., Dill, F.J.: Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions. *Science*, **221**: 665-667, 1983.
59. Kalousek, D.K., Barrett, I.J., McGilliuray, B.C.: Placental mosaicism and intrauterine survival of trisomies 13 and 18. *Am.J.Hum.Genet.*, **44**: 338-343, 1989.
60. Kasugai, M., Kato, H., Iryama, H., Kato, M., Ningawa, T., Tomada, Y.: The roles of Ca<sup>2+</sup> and adenosine 3',5'-monophosphate in the regulation of progesterone production by human placental tissue. *J.Clin.Endoc. Metab.*, **65**: 122-126, 1987.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

61. Kaufmann, P., Stark, J., Stegner, H.E.: The villous stroma of the human placenta.I. The ultrastructure of fixed connective tissue cells. *Cell Tissue Res.*, **177**: 105-121, 1977.
62. Kaufmann, P., Sen, D.K., Schweikhart, G.: Classification of human placental villi.I. Histology. *Cell Tissue Res.*, **200**: 409-423, 1979.
63. Kaufmann, P.: Development and differentiation of the human placental villous tree. *Bibl.Anat.*, **22**: 29-39, 1982.
64. Kaufmann, P., Bruns, U., Leiser, R., Luekhardt, M., Winterhager, E.: The fetal vascularisation of term human placental villi.II. Intermediate and terminal villi. *Anat.Embryol.*, **173**: 203-214, 1985.
65. Kaufmann, P., Luckhardt, M., Schweikhart, G., Cattle, S.J.: Cross sectional features and three dimensional structure of human placental villi. *Placenta*, **8**: 235-247, 1987.
66. Kaufmann, P., Luckhardt, M., Leiser, R.: Three dimensional representation of the fetal vessel system in the human placenta. *Trophoblast Res.*, **3**: 113-137, 1988.
67. Kawagoe, K., Akiyama, J., Kawamoto, T., Morishita, Y., Mori, S.: Immunohistochemical demonstration of Epidermal Growth Factor (EGF) receptors in human placental villi. *Placenta*, **11**: 7-15, 1990.
68. Kayalı, H.: İnsan embriyolojisi. İkinci baskı. Güven Yayıncılık San.Tic.A.Ş., 1982.
69. Kennerknecht, I., Terinde, R.: Intrauterine growth retardation associated with chromosomal aneuploidy confined to the placenta. Three observations:Triple trisomy 6,21,22, trisomy 16 and trisomy 18. *Pren.Diagn.*, **10**: 539-544, 1990.
70. Kline, J., Stein, Z., Susser, M., Warburton, D.: Induced abortion and the chromosomal characteristics of subsequent miscarriages (spontaneous abortions). *Am.J.Epidem.*, **123**: 1066-1078, 1986.
71. Kline, J., Stein, Z., Susser, M.: Very early pregnancy: Fertilization and implantation frequency and cause of loss. Porter, I.H., Hatcher, N.H., Willey, A.M.(Eds). *Perinatal Genetics, Diagnosis and Treatment*. London, Academic Press, Inc., 1986, pp.2-22.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

72. Leiser, R., Luckhardt, M., Kaufmann, P., Winterhager, E., Bruns, U.: The fetal vascularization of term human placental villi. I. Peripheral stem villi. *Anat.Embryol.*, **173**: 71-80, 1985.
73. Lin, C.C., De Braekeleer, M., Jamro, H.: Cytogenetic studies in spontaneous abortion: the Calgary experience. *Can.J.Genet.Cytol.*, **27**: 565-570, 1985.
74. Martinoli, C., Castellucci, M., Zaccheo, D., Kaufmann, P.: Scanning electron microscopy of stromal cells of human placental villi throughout pregnancy. *Cell Tissue Res.*, **235**: 647-655, 1984.
75. Martinville, B., Brakemore, K.J., Mahoney, M.J., Francke, U.: DNA analysis of first trimester chorionic villous biopsies: Test for maternal contamination. *Am.J.Hum.Genet.*, **36**: 1357-1368, 1984.
76. Maruo, T., Mochizuki, M.: Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptor and myc oncogene product in human placenta: Implication for trophoblast and differentiation. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **156**: 721-727, 1987.
77. Maslar, I.A., Hess, D.C., Buckmaster, J.G., Lazur, J.J., Stanczyk, F.Z.: Steroid production by early pregnancy. *Placenta*, **11**: 277-288, 1990.
78. Minguillon, C., Eiben, B., Bahr-Porsch, S., Vogel, M., Hansmann, I.: The predictive value of chorionic villus histology for identifying chromosomally normal and abnormal spontaneous abortions. *Hum.Genet.*, 1989.
79. Miny, P., Holzgreve, W., Başaran, S., Beller, F.K., Pawlowitzki, L-H.: Maternal cell contamination in chorionic villi cultures.-Exclusion by chromosomal fluorescence polymorphisms. *Clin.Genet.*, **28**: 262-263, 1985.
80. Miny, P., Başaran, S., Pawlowitzki, L-H., Horst, J., Holzgreve, W.: Validity of cytogenetic analyses from trophoblast tissue throughout gestation. *Am.J.Med.Genet.*, **33**: 136-141, 1989.
81. Moe, N.: Mitotic activity in the syncytiotrophoblast of the human chorionic villi. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **110**: 431, 1971.
82. Morrish, D.W., Bhardwaj, D., Dobbagh, L.K., Marusyk, H., Siy, O.: Epidermal growth factor induces differentiation and secretion of human chorionic gonadotrophin and human placental lactogen in normal human placenta. *J.Clin.Endoc.Metab.*, **65**: 1287-1290, 1987.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

83. Morton, N.E., Hassold, J., Funkhauser, J., Mckenna, P.W., Lew, R.: Cytogenetic surveillance of spontaneous abortions. *Cytogenet.Cell Genet.*, **33**: 425-427, 1982.
84. Morton, M.E., Chiu, D., Holland, C., Jacobs, P.A., Pettay, D.: Chromosome anomalies as predictors of recurrence risk for spontaneous abortion. *Am.J.Med.Genet.*, **28**: 353-360, 1987.
85. Murrer-Orlando, M., Lerena, J., Mcguire, M., Zahed, L., Crolla, J., Babrow, M., Sheridon, R.: Chromosome banding in direct preparations of chorionic villi. *Pren.Diagn.*, **8**: 461-469, 1989.
86. Nestler, J.E., Williams, T.: Modulation of aromatase and P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme activities of human placental cytotrophoblasts by insulin and insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, **121**: 1845-1852, 1987.
87. Niikawa, N., Merotto, E., Kajii, T.: Origin of acrocentric trisomies in spontaneous abortuses. *Hum.Genet.*, **40**: 73-78, 1977.
88. Novak, R., Agamanolis, D., Dasu, S., Igel, H., Platt, M., Robinson, H., Shehata, B.: Histologic analysis of placental tissue in first trimester abortions. *Pediatr.Pathol.*, **8**: 477-482, 1988.
89. Novak, R.: A brief review of the anatomy, histology and ultrastructure of the full-term placenta. *Arch.Pathol.Lab.Med.*, **115**: 654-658, 1991.
90. Ockleford, C., Barker, C., Griffiths, J., McTurk, G., Fisher, R., Lawler, S.: Hydatidiform mole: An ultrastructural analysis of syncytiotrophoblast surface organization. *Placenta*, **10**: 195-212, 1989.
91. Ohno, M., Maeda, T., Matsunobu, A.: A cytogenetic study of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. *Obstet.Gynecol.*, **77**: 394-398, 1991.
92. Olson, S., Buckmaster, J., Bissonnette, J., Magenis, E.: Comparison of maternal and fetal chromosome heteromorphisms to monitor maternal cell contamination in chorionic villus samples. *Pren.Diagn.*, **7**: 413-417, 1986.
93. Ornoy, A., Salamon-Arnon, J., Ben-Zur, Z., Kohn, G.: Placental findings in spontaneous abortions and stillbirths. *Teratology*, **24**: 243-252, 1981.
94. Perry, T.B., Vekemans, S.M.J., Lippmann, A., Hamilton, E.F., Fournier, J.R.: Chorionic villi sampling: Clinical experience, immediate complications and patient attitudes. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **151**: 161-166, 1985.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

95. Procter, S.E., Watt, J.L., Gray, E.S.: Cytogenetic analysis in 100 spontaneous abortions in North-East Scotland. *Clin.Genet.*, **29**: 101-103, 1986.
96. Procter, S.E., Watt, J.L., Gray, E.S.: Chorion in culture. *Clin.Genet.*, **29**: 104-107, 1986.
97. Raabe, G., Miller, K.: Cell proliferation in chorionic villi at different gestational ages, as analysed by premature chromosome condensation. *Cytogenet.Cell Genet.*, **54**: 127--131, 1990.
98. Rehder, H., Coerdts, W., Eggers, R., Klink, F., Schwinger, E.: Is there a correlation between morphological and cytogenetic findings in placental tissue from early missed abortions? *Hum.Genet.*, **82**: 377-385, 1989.
99. Richkind, K.E., Risch, N.J.: Sensitivity of chromosomal mosaicism detection by different tissue culture methods. *Pren.Diagn.*, **10**: 519-527, 1990.
100. Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H., Sasse, J., Ekblom, P., Kemler, R., Doetschman, T.: Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem cell derived embryoid bodies. *Development*, **102**: 471-478, 1988.
101. Ritvos, O., Bützow, R., Jalkanen, J., Stenman, U-H., Ranta, T.: Differential regulation of hCG and progesterone secretion by cholera toxin and phorbol ester in human cytotrophoblasts. *Molec.Cellular Endoc.*, **56**: 165-169, 1988.
102. Romagnano, A., Featherstone, T., Sun, L., Crane, J.P., Cheung, S.W.: Direct preparations from chorionic villi-relationship between villous morphology and mitotic index. *Pren.Diagn.*, **9**: 385-391, 1989.
103. Röckelein, G., Ulmer, R., Schwille, R.: Surface and branching of placental villi in early abortion: relationship to karyotype. *Virchows Archiv.A.Pathol.Anat.*, **417**: 151-158, 1990.
104. Sadler, T.W.: *Langman's Medical Embryology*. 6th edit., U.S.A., 1990, pp.26-106.
105. Schulze, B., Miller, K.: Chromosomal mosaicism and maternal cell contamination in chorionic villi cultures. *Clin.Genet.*, **30**: 239-240, 1986.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

106. Schweikhart, G., Kaufmann, P., Beck, T.: Morphology of placental villi after premature delivery and its clinical relevance. *Arch.Gynecol.*, **239**:101-114, 1986.
107. Sen, D.K., Kaufmann, P., Schweikhart, G.: Classification of human placental villi.II. Morphometry. *Cell Tissue Res.*, **200**: 425-434, 1979.
108. Simoni, G., Brambati, S.B., Danesino, C., Rossella, F., Terzoli, G.L., Ferrari, M.,Fraccaro, M.: Efficient direct chromosome analysis and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Hum.Genet.*, **63**: 349-357, 1983.
109. Simoni, G., Brambati, S.B., Danesino, C., Terzoli, G.L., Romitti, L., Rossella, F., Fraccaro, M.: Diagnostic application of first trimester trophoblast sampling in 100 pregnancies. *Hum.Genet.*, **66**: 252-259,1984.
110. Simoni, G., Terzoli, G.L., Rossella, F.: Direct chromosome preperation and culture using CV. *Am.J.Med.Genet.*, **35**: 181-183, 1990.
111. Smidt-Jensen, S. and Lind, A-M.: A case of first trimester chromosomal mosaicism confined to the cultivation of the gestational products. *Clin.Genet.*, **32**: 133-136, 1987.
112. Smidt-Jensen, S., Christensen, B. and Lind, A-M.: Chorionic villus culture for prenatal diagnosis of chromosome defects: Reduction of the long term cultivation time. *Pren.Diagn.*, **9**: 309-319, 1989.
113. Smitt, C.H.: Incubation techniques and investigation of placental transport mechanisms in vitro. *Placenta (Suppl.2)*, 163-176, 1981.
114. Soma, H., Yashida, K., Mukaida, T., Tabuchi, Y.: Morphologicchanges in the hypertensive placenta. *Contr.Gynecol.Obstet.*, **9**: 57-75, 1982.
115. Stene, J., Stene, E. and Mikelsen, M.: Risk for chromosome abnormality at amniocentesis following a child with a non-inherited chromosome aberration. *Pren.Diagn.*, **4**: 81-95, 1984.
116. Sutherland, G., Carter, R.F., Bould, R., Smith, J.J., Bain, A.D.: Chromosome studies at the paediatric necroscopy. *Ann.Hum.Genet.*, **42**:173-181, 1978.
117. Teasdale, F., Jean-Jacques, G.: Morphometric evaluation of the microvillous surface enlargement factor in the human placenta from mid-gestation at term. *Placenta*, **6**: 375-381, 1985,

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

118. Tedde, G., Tedde Piras, A.: Mitotic index of the Langhans' cells in the normal human placenta from early stages of pregnancy to the term. *Acta Anat.*, **100**: 114-119, 1978.
119. Tharapel, A.T., Dacus, J.V., Tharapel, S.A., Shaver, D.C., Wilroy, J.: First trimester chorionic villi sampling and direct chromosome preparations. *Clin.Genet.*, **29**: 502-507, 1986.
120. Vejerslev, L.O., Mikkelsen, M.: The European Colloberative Study on mosaicism in chorionic villus sampling: Data from 1986 to 1987. *Pren.Diagn.*, **9**: 575-588, 1989.
121. Vorherr, H.: Placental insufficiency in relation to postterm pregnancy and fetal postmaturity. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **123**: 67-103, 1975.
122. Warburton, D., Kline, J., Stein, Z., Susser, M.: Monosomy X: A chromosomal anomaly associated with young maternal age. *Lancet*, **I**: 167-169, 1980.
123. Warburton, D., Kline, J., Stein, Z., Strobino, B.: Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. Porter, I.H., Hatcher, N.H., Willey, A.M.(Eds). *Perinatal Genetics, Diagnosis and Treatment*. London, Academic Press, Inc., 1986, pp. 23-40.
124. Warburton, D., Kline, J., Stein, Z., Hutzler, M., Chin, A., Hassold, T.: Does the karyotype of a spontaneous abortion predict the karyotype of a subsequent abortion? Evidence from 273 women with two karyotyped spontaneous abortions. *Am.J.Hum.Genet.*, **41**: 465-483, 1987.
125. Watanabe, M., Ito, T., Yamamoto, M., Watanabe, G.: Origin of mitotic cells of the chorionic villi in direct chromosome analysis. *Hum.Genet.*, **44**: 191-193, 1978.
126. William's Obstetrics. 4th Edit., 1989, pp.100-140.
127. Wilson, C.B., Haas, J.E., Weaver, W.M.: Isolation, purification and characteristics of mononuclear phagocytes from human placentas. *J.Immun.Met.*, **56**: 305-317, 1983.
128. Wynn, R.M.: Principles of placentation and early human placental development. University Park Press, Baltimore, 1975.
129. Yu, M-T, Yu, C-Y, Yu, C-X, Maidman, J., Warburton, D.: Improved methods of direct and cultured chromosome preparations from chorionic villous samples. *Am.J.Hum.Genet.*, **38**: 576-581, 1986.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

130. Zaccheo, D., Zicca, A., Candoni, A., Leprini, A., Castellucci, M.: Preliminary observations on Hofbauer cells in short-term culture. *Bibl.Anat.*, **22**: 63-68, 1982.
131. Zahed, L., Murer-Orlando, M., Bobrow, M.: Cell cycle studies in chorionic villi. *Hum.Genet.*, **80**: 127-134, 1988.
132. Zhou, X., Tong, H., Wong, S., Shen, Q., Fu, X., Cui, Y.: Chromosome abnormalities in early pregnancy analyzed by direct chromosome preparation of chorionic villi. *Hum.Genet.*, **83**: 277-279, 1989.