

PREEKLAMPSİLİ OLGULARIN TERM PLASENTALARINDA VİLLÖZ TROFOBlast PROLİFERASYONUNUN İNCELENMESİ

Dr. Gülsüm Özlem ELPEK, Dr. Şeyda KARAVELİ, Bio. MSc. Nuran KELEŞ

ÖZET: Preeklampsia ile ilgili çok sayıda araştırmalar yapılmış olmasına karşın, plaseenta ile ilişkili olan bu hastalıkta, villöz trofoblastların proliferatif indekslerinin değerlendirildiği çalışmalar az sayıdadır. Çalışmamızın amacı, preeklampside termdeki plaseentalarda villöz trofoblastların proliferasyon indekslerini incelemek ve elde edilen değerleri normal gebeliklerde elde edilenlerle karşılaştırmaktır. Çalışmamıza, 40 preeklampsia ve 10 normal gebelik olgusuna ait toplam 50 plaseenta dahil edildi. Parafine gömülü doku örneklerinden hazırlanan kesitler Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ve Ki-67 ile immünohistokimyasal olarak boyandı. Her bir kesitte bir projeksiyon mikroskopunda, x400 büyütmede, PCNA ve Ki-67 pozitif ve negatif villöz trofoblastlar sayıldı. PCNA indeksi normal gebeliklerde 27.45 ± 11.90 , preeklampside ise 46.97 ± 18.47 olarak belirlendi. Ki-67 indeksinin ise normal gebeliklerde 8.13 ± 3.02 olduğu saptanırken, bu değerin preeklampside 39.10 ± 16.51 olduğu gözlemlendi. Yapılan istatistiksel analizde iki grubun hem PCNA, hem de Ki-67 endeksleri arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.05$). Sonuçlarımız, preeklampside villus yüzeyinde ortaya çıkan zedelenmeler sonucunda trofoblastların onarım hiperplazisine uğradığı görüşünü desteklemektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: Preeklampsia, trofoblast, PCNA, Ki-67, proliferasyon.

SUMMARY: EVALUATION OF VILLOUS TROPHOBLAST PROLIFERATION IN TERM PLACENTAS OF PREECLAMPTIC PATIENTS. Despite the numerous published studies on preeclampsia, studies evaluating proliferative indices of villous trophoblasts in this disease of the placenta are scarce. Our aim in this study is to evaluate the proliferative indices of villous trophoblasts in term placentas of preeclamptic patients and to compare obtained data with term placentas of normal pregnancies. Fifty placentas, forty from preeclamptic and ten from normal pregnancies were included in this study. Sections from paraffin embedded tissue samples were stained immunohistochemically with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67. In each section by using a projection microscope, at x400 magnification, PCNA and Ki-67 positive and negative trophoblasts were counted. PCNA index was $27.45 \pm 11.90\%$ in normal and $46.97 \pm 18.47\%$ in preeclamptic placentas. Ki-67 indices were $8.13 \pm 3.02\%$ and $39.10 \pm 16.51\%$ in normal and preeclamptic placentas respectively. In statistical analysis, difference between both PCNA and Ki-67 indices in two groups were significant ($p < 0.05$). Our results support the opinion that trophoblasts undergo regeneration hyperplasia as a result of injuries arising on villous surface in preeclampsia.

KEY WORDS: Preeclampsia, trofoblast, PCNA, Ki-67, proliferation.

GİRİŞ

Preeklampsia klinik olarak gebeliğin 2. veya 3. trimestrinde ortaya çıkan, doğumdan sonra gerileyen hipertansiyon, proteinüri, karaciğer ve koagülasyon sistemlerinin tutulumu ile karakterlidir (1,2). Fetusun bulunmadığı molar gebeliklerde de ortaya çıkması, doğum sonrasında bulguların ortadan kalkması, sendromun plaseenta ile ilişkili olduğunu desteklemektedir. Preeklampsinin etyopatogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak multifaktöryel olduğu düşünülmekte ve nedenini açıklamaya yönelik çeşitli hipotezler ortaya atılmaktadır (3,4). Son yıllarda, plaseentadaki trofoblast miktarının preeklampsinin oluşumunda tetiği çeken mekanizmalardan biri olabileceği öne sürülmesine karşın, bu sendromda villöz trofoblast proliferasyonunun araştırıldığı çalışmalar az sayıdadır (5).

Bu çalışmanın amacı, preeklampside termdeki plaseentalarda villöz trofoblastların proliferatif endekslerini, proliferasyon belirleyicileri olan Ki-67 ve proliferating cell nuclear antigen (PCNA) kullanarak incelemek ve elde edilen değerleri normal gebeliklerde izlenen proliferasyon indeksleri ile karşılaştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza 1993-1996 yılları arasında preeklampsia tanısı ile Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından takip ve tedavi edilen 40 olgu ve normal gebeliği olan 10 olguya ait toplam 50 plaseenta dahil edildi. Plaseentaların periferik ve santral bölgelerinden örneklenen ve formalin takibin-

den geçirilerek parafine gömülen dokulardan hazırlanan hematoksilen ve eozin ile boyanmış kesitler ışık mikroskopunda incelenerek izlenen tüm histopatolojik bulgular kaydedildi.

Olgulara ait seçilmiş bloklardan hazırlanan seri kesitler, krom alümlü lamalara alınarak deparafinize edildi. On dakika mikrodalga fırında kaynatıldıktan sonra streptavidin biotin peroksidaz yöntemi ile Ki-67 (MIB-1, dilüsyon: 1/80, Immunotech) ve PCNA (PC10, dilüsyon: 1/50, Dako) primer antikorları kullanılarak boyandı.

Her bir kesitte, bir projeksiyon mikroskobu yardımıyla, 100'e bölünmüş bir test sistemi kullanılarak, sistematik randome olarak örneklenen alanlarda X400 büyütmede, PCNA ve Ki-67 pozitif ve negatif olan trofoblastlar sayıldı (Resim 1). PCNA ve Ki-67 indeksleri pozitif hücrelerin, sayılan total hücre sayısına bölünerek yüzdelendirilmesi ile hesaplandı.

İstatistiksel analiz için Ki-kare ve bağımsız değişkenler için t testi kullanıldı.



Resim 1: Sağlıklı gebelikte Langhans hücrelerinde Ki-67 pozitifliği ve indeksi belirlemede kullanılan test sistemi (MIB-1, zıt boyama Harris hematoksileni x250).

TABLO 1: PREEKLAMPSİ VE KONTROL OLGULARINDA Ki-67 ve PCNA ENDEKSLERİNE AİT DEĞERLER

	Minimum	Maksimum	Ortalama± SEM	Medyan	SD	p Değeri*
Ki-67 Endeksi (%)						
Preeklampsisi	16.68	89.28	39.19±2.61	34.90	16.51	
Kontrol	3.98	13.02	8.13±0.95	7.98	3.02	p<0,0001
PCNA Endeksi (%)						
Preeklampsisi	14.68	86.43	46±972.92	46.20	18.47	
Kontrol	10.68	44.70	27.45±3.76	27	11.90	p<0,003

* p değerleri student t testi ile belirlenmiştir.

SEM: Ortalamanın standart hatası

SD: standart sapma

hücrelerin artmış proliferasyon indeksleri, Hustin ve arkadaşları (11) tarafından preeklampsili plasentalarda timidin kullanılarak yapılan çalışmalarda gösterilirken, Kaltenbach ve arkadaşları (12) hücre proliferasyonunda bir artış saptamamışlardır.

Preeklampside immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak, proliferasyon belirleyicileri ile yapılan kantitatif çalışmalar ise çok az sayıdadır. Raymond ve arkadaşları, preeklampsili olgularda uteroplasental yataкта, intermediate trofoblastlarda PCNA indekslerinin normal gebeliklere oranla daha fazla olduğunu izlemişlerdir (5).

Ki-67 ve Bromodeoksiüridin indekslerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada preeklampsili olgularda Langhans hücrelerinde Ki-67 indeksinin preeklampside daha yüksek oranlarda olduğu izlenmiştir (7). Bizim çalışmamızda ise Ki-67 indeksinin kontrol grubundan yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu izlenmiş, PCNA indeksinin ise 1.71 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Çalışmamızda hücre proliferasyonunun belirlenmesinde Ki-67 ve PCNA birlikte kullanılmıştır ve bilgilerimize göre, preeklampside bu iki antijenin birlikte kullanıldığı bir çalışma yoktur. Serimizde preeklampsili olguların Ki-67 indeksleri Arnholdt ve arkadaşlarının çalışmasında izlenen Ki-67 indeksinden belirgin olarak yüksektir (7). Bu fark çalışmamız için seçilen olguların gebeliğin tek bir trimestrine (term) ait olması ve her iki çalışmada kullanılan kantitatif yöntemlerin farklılığından kaynaklanabilir.

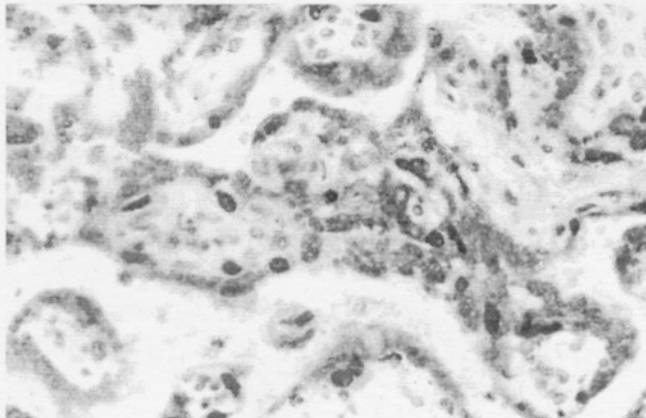
Günümüzde hem normal hem de patolojik gebeliklerde, Langhans hücre proliferasyonunu düzenleyen mekanizmalar bilinmemektedir. Langhans hücreleri, önceki inanın aksine terme dek devamlılıklarını sürdürürler (8). Ancak gebelik süresince Langhans hücrelerinin sayısının değişip değişmediğine dair sonuçlar tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda bu hücrelerin sayısının ilk trimesterde fazla olduğu, terme doğru sayılarının azaldığı saptanmıştır (8). Stereolojik yöntemler kullanılarak yapılan ölçümsel çalışmalarda ise, bu hücrelerin sayılarının gebeliğin son dönemine kadar sabit bir hızla arttığı gösterilmiştir (13). Dolayısıyla, termde Langhans hücre sayı-

SONUÇLAR

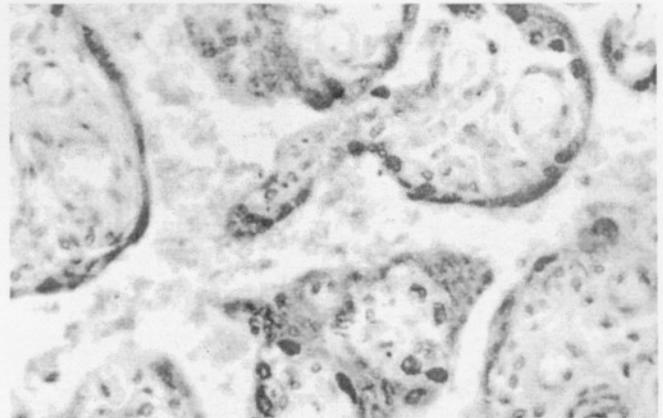
Hem Ki-67, hem de PCNA villöz sitotrofoblastların (Langhans hücreleri) nükleuslarında izlenmekteydi (Resim 2 ve 3). Sinsisyotrofoblastlarda ise pozitiflik saptanmadı. Villöz trofoblastlarda, PCNA indeksi normal gebeliklerde 27.45 ± 11.90 , preeklampside ise 46.97 ± 18.47 olarak belirlendi. Ki-67 indeksinin ise normal gebeliklerde 8.13 ± 3.02 olduğu saptanırken, bu değerin preeklampside 39.10 ± 16.51 olduğu gözlemlendi (Tablo 1). Yapılan istatistiksel analizde, iki grubun hem PCNA, hem de Ki-67 indeksleri arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$) (Tablo 1).

TARTIŞMA

Preeklampsisi, yetersiz plasantasyon sonucu ortaya çıkan plasental iskemi ile plasentadan salınan faktör veya faktörlerin oluşturduğu maternal sendrom olarak da değerlendirilmektedir (6). Plasentada ortaya çıkan enfarktüsler, ultrastrukturel düzeyde izlenen fokal sinsisyal nekroz ve mikrovillus kaybı, plasental iskeminin göstergeleri olarak kabul edilir (4). İskemi sonucunda ortaya çıkan hipoksinin sinsisyumlarda oluşturduğu zedelenme sonrası, proliferasyon yeteneği olmayan bu bölgenin rejenerasyonu Langhans hücrelerinde ortaya çıkan hiperplazi ile sağlanabilmektedir (7). Bu durum sadece preeklampsie özgü değildir. Maternal kan akımı ve oksijen basıncının azaldığı diabetes mellitus, maternal anemi ve hipertansif hastalıklarda da izlenebilir (8). Preeklampside Langhans hücre sayısının normal gebeliklerden daha fazla olduğunu gösteren morfometrik veriler vardır (9,10). Bu



Resim 2: Preeklampside Langhans hücrelerinde izlenen Ki-67 pozitifliği (MIB-1, zıt boyama Harris hematoksileni x400).



Resim 3: Sağlıklı gebelikte Langhans hücrelerinde izlenen PCNA pozitifliği (PC10, zıt boyama Harris hematoksileni x400).

sında izlenen azalmanın, plasentanın matürasyon sürecinde villuslardaki hızlı büyüme ile hücrelerin birbirinden ayrılması sonucunda göreceli olarak ortaya çıktığı kabul edilmektedir (8). Her ne kadar Langhans hücrelerinin sayısı konusunda elde edilen sonuçlar tartışmalı olsa da Ki-67 ve PCNA gibi hücre proliferasyonunu belirleyen antijenler ile yapılan çalışmalarda, ilk trimestrde bu hücrelerin proliferatif indekslerinin daha fazla olduğu ve gebeliğin son dönemlerine doğru azaldığı izlenmiştir (14,15).

Hipoksinin sinsisyum formasyonunu azaltarak, Langhans hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde en etkili faktör olduğu düşünülse de, günümüzde hipoksi dışındaki faktörlerin de Langhans hücre proliferasyonunda rol oynayabileceğine dair kanıtlar vardır. Sinsisyotrofoblastların kendilerinin üretilmediği fonksiyonel komponentlerine artan ihtiyaç ile ortaya çıkan Langhans hücre proliferasyonunun, büyüme faktörleri, tenaskin, insan koryonik gonadotropini (HCG) ile düzenlenebileceği yönünde sonuçlar elde edilmiştir (14,16-19). Bu veriler dikkate alındığında, preeklampside Langhans hücre proliferasyonunun sadece hipoksi ile ilişkili olduğunu düşünmek zordur.

Son yıllarda ortaya atılan bir hipoteze göre tüm gebeliklerde trofoblast miktarına, maternal immün cevabın doğasına ve altta yatan renovasküler duyarlılığa bağlı olarak bir preeklampsia tehdidinin olabileceği, özellikle yeterli miktarda trofoblast antijenlerinin endotel hasarı ile sonlanan immün cevabı tetikleyebileceği önerilmiştir (5). Bu yönü ile artmış trofoblast miktarı, sendromun oluşumunda bulgularının ortaya çıkışında önemli olabilir. Preeklampsia ile sonuçlanabilen molar gebeliklerde, trofoblastların hem sayılarının hem de proliferatif aktivitelerinin normal gebeliklere oranla daha fazla izlenmesi bu hipotezi destekleyebilir (15). Ancak preeklampside gebeliğin terminal döneminde villuslarda Langhans hücrelerinde izlediğimiz artmış Ki-67 ve PCNA indekslerini tek bir nedene bağlamak mümkün değildir.

Preeklampside izlenen Langhans hücrelerinin artmış proliferasyon indeksleri, sinsisyal zedelenmeye bağlı olarak ortaya çıkan bir rejenerasyon hiperplazisini düşündürmektedir. Ancak proliferasyon belirleyicileri ile birlikte Langhans hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülen HCG, tenaskin ve büyüme faktörlerinin birlikte ele alındığı çalışmaların, bu basit görüldüğü kadar da karmaşık olan olayın aydınlatılmasını sağlayabileceği görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

1. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM ve ark. Preeclampsia and endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161:1200-1204.
2. Walsh SW : Preeclampsia: An imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *Am J Obstet Gynecol* 1985;152:335-340.
3. Burrows TD, King A, Loke YW : Expression of adhesion molecules by endovascular trophoblast and decidual endothelial cells: Implications for vascular invasion during implantation. *Placenta* 1994; 15:21-33.
4. Bulmer JN : Immune aspects of pathology of the placental bed contributing to pregnancy pathology. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology* 1992; 6:461-487.
5. Raymond W, Redline MD, Patterson BS. Pre-eclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast. *Hum Pathol* 1995; 26:594-600.
6. Redman CWG:Immunological aspects of pre-eclampsia. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology*.1992; 6:601-615.
7. Arnholdt H, Meisel F, Fandrey K, Löhns U. Proliferation of villous trophoblast of the human placenta in normal and abnormal pregnancies. *Virchow Archiv B Cell Pathology* 1991; 60:365-372.
8. Benirschke K, Kaufmann P: Basic structure of the villous tree. *Pathology of the Placenta*, ed P Kaufmann, 3rd edition., Springer Verlag, New York Inc, 1995 pp: 71-79.
9. Soma H, Yoshida K, Mukaida T, Tabuchi Y. Morphologic changes in the hypertensive placenta. *Contr Gynecol Obstet* 1982; 9:58-75.
10. Teadstale F. Histomorphometry of the human placenta in maternal preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 152:25-31.
11. Hustin J, Foidart JM, Lambotte R. Cellular proliferation in villi of normal and pathological pregnancies. *Gynecol Obstet Invest* 1984; 17:1-9.
12. Kaltenbach FJ, Fettig O, Krieger ML. Autoradiographische Untersuchungen über das Proliferationsverhalten der menschlichen Placenta unter normalen und pathologischen Bedingungen. *Arch Gynäcol* 1974; 216: 369-386.
13. Simpson RA, Mayhew TM, Barnes PR. From 13 weeks to term, the trophoblast of human placenta grows by continuous recruitment of new proliferative unit: a study of nuclear number using dissector. *Placenta* 1992; 13:501-502.
14. Mochizuki M, Maruo T, Matsuo H, Samoto T, Ishihara N. Biology of human trophoblast. *Int J Gynaecol Obstet* 1998; 60 Suppl 1:S21-8.
15. Suresh UR, Hale RJ, Fox H, Buckley CH. Use of proliferation cell nuclear antigen immunoreactivity for distinguishing hydropic abortions from partial hydatidiform moles. *J Clin Pathol* 1993; 46:48-50.
16. Esterman A, Greco MA, Mitani Y, Finlay TH ve ark . The effect of hypoxia on human trophoblast in culture: morphology, glucose transport and metabolism. *Placenta* 1997; 18:129-36.
17. Alsat E, Wyplosz P, Malassine A, Guibourdenche J ve ark. Hypoxia impairs cell fusion and differentiation process in human cytotrophoblast, in vitro. *J Cell Physiol* 1996; 168:346-53.
18. Neudeck H, Oei SL, Stierner B, Hopp H ve ark.. Binding of antibodies against high and low molecular weight cytokeratin proteins in the human placenta with special reference to infarcts, proliferation and differentiation processes. *Histochem J* 1997; 29:419-30.
19. Maruo T, Murata K, Matsuo H, Samoto T ve ark. Insulin-like growth factor-I as a local regulator of proliferation and differentiated function of the human trophoblast in early pregnancy. *Early Pregnancy* 1995; 1:54-61.