



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DİYABETİN VASKÜLER KOMPLİKASYONLARININ
GÖBEK KORDONU VE FETAL MEMBRANLARDA
AKUAPORİN 9 PROTEİNİ İLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Selin KENAN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ

Haziran 2020

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DİYABETİN VASKÜLER KOMPLİKASYONLARININ
GÖBEK KORDONU VE FETAL MEMBRANLARDA
AKUAPORİN 9 PROTEİNİ İLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Selin KENAN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından **TF.UT.18.35** proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Histoloji ve Embriyoloji ANABİLİM DALI

TEZİN ADI **Diyabetin vasküler komplikasyonlarının göbek kordonu ve fetal membranlarda akuaporin 9 proteini ile ilişkisi**

DR. Selin Kenan

TARİH: 11.06.2020

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

Tıp Fakültesi Dekanı
Prof.Dr.Can DEMİREL
Dekan

Bu tez çalışmasının "Tıpta Uzmanlık" derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile "Tıpta Uzmanlık" tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Dr. Öğr. Üyesi Nuray Bostancıeri
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ
2. Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ
3. Dr. Öğr. Üyesi Ash YAYLALI

I. ÖNSÖZ

Öncelikle asistanlık sürem boyunca bilgilerini, tecrübelerini, desteğini ve güler yüzünü benden esirgemeyen değerli Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Mehmet Yüncü'ye, yine her konuda bana çok yardımcı olan sevgili tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Nuray Bostancı'ne, laboratuvarındaki tecrübe ve bilgilerini benle her zaman paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Türker'e ve tüm hocalarıma çok teşekkür ederim.

Tezimin Real Time PCR çalışmalarında bana sonuna kadar desteğini, yardımını ve güler yüzünü esirgemeyen, Gaziantep Üniversitesi İleri Düzey Araştırma Laboratuvarı sorumlusu Öğr. Gör. Dr. Demet TAŞDEMİR, Arş. Gör. Sedat İLHAN ve yüksek lisans öğrencilerine,

Tezimi maddi olarak destekleyen Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı'na, dokuların temin edilmesinde yardımcı olan Sağlık Bakanlığı Cengiz Gökçek Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi Başhekimliği'ne, ayrıca Uzm. Dr. Ali OVAYOLU'na,

Tez çalışmalarım sırasında benden yardımlarını ve anlayışlarını esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma,

En önemlisi de bu süreçte bana en büyük motivasyon kaynağım canım kızım Begüm Ece başta olmak üzere tüm aileme, eşime teşekkürlerimi sunarım.

II. İÇİNDEKİLER

I. ÖNSÖZ.....	III
II. İÇİNDEKİLER.....	IV
III. ÖZET.....	VII
IV. ABSTRACT.....	IX
V. KISALTMALAR.....	XI
VI. TABLO LİSTESİ.....	XII
VII. RESİM LİSTESİ.....	XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	XVI
2. GENEL BİLGİLER.....	1
2.1.Göbek kordonu.....	1
2.1.1.Göbek kordonu anatomisi.....	1
2.1.2.Göbek kordonu histolojisi.....	1
2.2.Fetal membranlar.....	2
2.3.Göbek kordonu ve fetal membranların embriyolojisi.....	4
2.4.Diyabetes Mellitus (DM)	8
2.4.1.Tanım ve sınıflandırma.....	8
2.4.2. DM Semptomları ve Tanı Kriterler.....	9
2.4.3. DM komplikasyonları.....	10
2.5.Gestasyonel Diyabetes .mellitus (GDM)	11
2.5.1.GDM patogenezi.....	11
2.5.2.GDM tanısı.....	12
2.6.Gebelikte DM.....	13
2.6.1.Diyabetin Göbek Kordonu ve Fetal Membranlara etkileri.....	14
2.7.Akuaporinler.....	15
2.7.1.Akuaporinlerin keşfi.....	15
2.7.2.Akuaporinlerin yapısal özellikleri ve işlevi.....	16
2.7.3.Akuaporinlerin sınıflandırılması.....	17

2.7.4. Göbek kordonu ve fetal membranlarda akuaporinler.....	20
--	----

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....23

3.1. Revers Transkripsiyon ve Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) Çalışması	23
---	----

3.1.1. Doku homojenizasyon protokolü.....	24
---	----

3.1.2. Dokudan saflaştırma kolonu kullanılarak RNA izolasyon protokolü.....	24
---	----

3.1.3 RNA ölçümü.....	25
-----------------------	----

3.1.4. . RNA'dan komplementer DNA eldesi	26
--	----

3.1.5. Revers transkripsiyon kit protokolü	26
--	----

3.1.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı (Real Time qPCR) PCR analizi.....	28
---	----

3.2. Histopatolojik inceleme.....	31
-----------------------------------	----

3.2.1. Işık mikroskobu için dokuların hazırlanması.....	31
---	----

3.2.2. Kesitlerin Alınması ve Boyanmaları.....	32
--	----

3.2.3. Göbek Kordonu Çapı ve Damar Duvar Kalınlıklarının Ölçülmesi.....	33
---	----

3.2.4. Göbek Kordonu ve Metal Membranların İmmünohistokimyasal İncelenmesi.....	33
---	----

3.3. İstatistiksel değerlendirme.....	34
---------------------------------------	----

4. BULGULAR.....36

4.1. Demografik veriler	36
-------------------------------	----

4.2. Işık mikroskobik bulgular	38
--------------------------------------	----

4.3. İmmünohistokimyasal bulgular.....	46
--	----

4.4. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu bulguları.....	54
--	----

5. TARTIŞMA55

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
III.KAYNAKLAR.....	61



IV.ÖZET

DİYABETİN VASKÜLER KOMPLİKASYONLARININ, GÖBEK KORDONU VE FETAL MEMBRANLARDA AKUAPORİN 9 PROTEİNİ İLE İLİŞKİSİ

Dr. Selin KENAN

Uzmanlık Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı, Dr. Öğr Üyesi Nuray BOSTANCIERİ

Haziran 2020 79 sayfa

Diyabetes Mellitus(DM), insülin hormon eksikliği veya insülin etkisindeki defektler sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır. DM, uzun dönemde ise progresif gelişen spesifik komplikasyonlara yol açar ve bunlar hastalığa bağlı morbidite ve erken mortalitenin en önemli nedenleridir. Gebelikte ise DM en sık görülen metabolik bozukluktur. Gebelik öncesinde başlayıp, nefropati, retinopati gibi kronik komplikasyon gelişmiş bir gebe ile gebeliği sırasında diyabet hastalığı oluşmuş bir gebenin, bebeklerinin farklı klinik tablo sergilediği görülmüştür.

Göbek kordonu ve fetal membranlar akuaporin proteini açısından zengin dokulardır. Çalışmamızda daha önceden diyabet hastası olup, vasküler komplikasyon olarak nefropati gelişmiş (VK-PGDM) 6 gebe, gebeliği sırasında diyabet tanısı almış (GDM) 6 gebe ve herhangi bir hastalığı bulunmayan (KONTROL) 6 gebeden doğum sonrası alınan göbek kordonları ve fetal membranlar kullanıldı. Dokular ışık mikroskopik inceleme için Hematoksilen-Eozin (H-E) ile, immünohistokimyasal değerlendirme için Anti akuaporin 9 antikoru ile boyandı ve görsel olarak karşılaştırıldı. Daha sonra aynı dokuların -80 °C’ de muhafaza edilen kısmından Kantitatif Gerçek-Zamanlı (Real-Time) PCR (qPCR) yapılarak akuaporin 9 mRNA açısından kantitatif karşılaştırması yapıldı.

Çalışmamızın sonucunda GDM ve VK-PGDM grubunda göbek kordonlarında AQP-9 ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilirken; fetal membranlarda AQP-9 ekspresyonu açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Anahtar Kelimeler: Göbek kordonu, amniyon membranı, koryon membranı, gestasyonel diyabet, akuaporin

V. ABSTRACT

THE RELATIONSHIP OF VASCULAR COMPLICATIONS OF DIABETES WITH THE AQUAPORIN 9 PROTEIN IN UMBILICAL CORD AND FETAL MEMBRANES

MD. Selin KENAN

Thesis for specialization, Department of Histology and Embriology

Supervisors, Asis. Prof. Dr. Nuray Bostancıeri

June 2020, 79 pages

DM is a chronic hyperglycemic group of metabolism diseases that lead to disorders in carbohydrate, protein and fat metabolism as a result of insulin hormone deficiency or insulin effect defects. DM leads to specific complications that develop progressively in the long term, and these are the most important causes of disease-related morbidity and early mortality. It has been observed that a pregnant woman who developed a chronic complication such as nephropathy and retinopathy before pregnancy, and a pregnant woman with diabetes during her pregnancy displayed different clinical pictures.

The umbilical cord and fetal membranes are tissues rich in aquaporin protein. In our study, umbilical cords and fetal membranes taken from 6 pregnant women who had diabetes and who had nephropathy (VK-PGDM) as a vascular complication, diagnosed with diabetes during pregnancy (GDM) and 6 pregnant women without any disease (CONTROL) were used. Tissues were stained with Hematoxylin-Eosin (H-E) for light microscopic examination, and with Anti-aquaporin 9 antibody for immunohistochemical evaluation and visually compared. Then, quantitative real-time (real-time) PCR (qPCR) was performed from the part of the same tissues preserved at -80°C and quantitative comparison of the aquaporin 9 mRNA level was made.

As a result of our study, while a statistically significant decrease in AQP-9 expressions in umbilical cords was detected in GDM and VK-PGDM group; There was no statistically significant difference between the groups in terms of AQP-9 expression in fetal membranes

Keywords: Umbilical cord, amniotic membrane, chorionic membrane, gestational diabetes, aquaporin 9

VI. KISALTMALAR

DM: Diyabetes Mellitus

GDM: Gestasyonel Diyabetes Mellitus

PGDM: Pregestasyonel Diyabetes Mellitus

VK-PGDM: Vasküler komplikasyonlu Pregestasyonel Diyabetes Mellitus

HbA1C: Glikozillenmiş hemoglobin

GK: Göbek Kordonu

WJ: Wharton jölesi

FM: Fetal Membran

µL: Mikrolitre

cm: Santimetre

dk: dakika

sn: saniye

OGTT: Oral Glukoz Tolerans Testi

AQP: Akuaporin

H-E: Hematoksilen – Eozin

ACTB: B-Aktin

cDNA: Complementary Dna/Komplementer Dna

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

RNA: Ribo nükleik asit

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction/Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

n-RBC: (nucleated – red blood cell)



VII. TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Diyabetes mellitus tanı kriterleri.....	10
Tablo 2: GDM tanı algoritması.....	13
Tablo 3: White sınıflaması.....	14
Tablo 4: Göbek kordonu ve fetal membranlarda akuaporinlerin lokalizasyonları.....	21
Tablo 5: Revers transkripsiyon ana karışımı içeriği.....	26
Tablo 6: Termal döngüleyici protokolü.....	27
Tablo 7: qPCR kit bileşenleri.....	28
Tablo 8: qPCR karışımı.....	29
Tablo 9: qPCR işlemini gerçekleştirmek için cihaz protokolü.....	31
Tablo 10: Işık mikroskopik doku takip protokolü.....	31
Tablo 11: Hematoksilen-Eozin / H-E boya protokolü.....	32
Tablo 12: Çalışma hastalarının demografik özellikleri.....	36
Tablo 13: Demografik verilerin gruplar arası karşılaştırması.....	37
Tablo 14: AKŞ, HbA1c ve GK çapları açısından gruplar arası karşılaştırma.....	38
Tablo 15: Göbek kordonu AQP-9 ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırması.....	54
Tablo 16: Fetal membranlarda AQP-9 ekspresyonlarının gruplar arası karşılaştırması....	54
Tablo 17: Göbek kordonu ve fetal membranlarda AQP-9 ekspresyon değerlerinin gruplardan bağımsız olarak karşılaştırması.....	55

VIII. RESİM LİSTESİ

Resim1. Sarmal yapıda göbek kordonu ve içinde vasküler yapılar.....	1
Resim 2: Hematoksilen – Eozin ile boyanmış fetal membranlar	3
Resim 3: Plasenta, göbek kordonu, amniyon, koryon membranı ve villus yapılarının şematik gösterimi.....	4
Resim 4: Embriyolojik gelişimin 12. Gününde ekstraembriyonik mezodermin oluşması..	5
Resim 5: Koryon boşluğunun giderek genişlemesiyle bağlantı sapının oluşumu.....	5
Resim 6: Amniyon kesesinin genişlemesiyle göbek kordonunun şekillenmesi	7
Resim 7: Amniyon, koryon ve desidua parietalisin füzyonunun şematizasyonu.....	7
Resim 8: GDM – PGDM kısa-uzun süreli plasental etkiler.....	15
Resim 9: Lipid zarda yer alan akuaporin kanal yapısı (kum saati modeli).....	17
Resim 10: Akuaporinlerin vücutta lokalizasyonları.....	20
Resim 11: Dokudan saflaştırma kolonu kullanılarak izole edilen RNA’lar	25
Resim 12: Mikro-hacim spektrofotometre cihazında ölçüm için kullanılan plate ve mikro-hacim spektrofotometre cihazı.....	26
Resim 13: İzole edilen RNA dan elde edilen c DNA.....	28
Resim 14: q PCR cihazı ve bağlı olduğu bilgisayar sistemi.....	30
Resim 15: Real time PCR işleminin gerçekleşeceği c DNA tüpleri.....	30
Resim 16: Kontrol grubu göbek kordonu arter (H-E 4x).....	40
Resim 17: Kontrol grubu göbek kordonu ven (H-E 4x).....	40
Resim 18: Kontrol grubu göbek kordonu amniyon zarı (H-E 20x).....	41
Resim 19: Kontrol grubu fetal membran (H-E 20x).....	41

Resim 20: GDM arter (H-E 4x).....	42
Resim 21: GDM ven (H-E 4x).....	42
Resim 22: GDM göbek kordonu amniyon zarı ve wharton jölesi (H-E 20x).....	43
Resim 23: GDM fetal membran (H-E 20x).....	43
Resim 24: PGDM göbek kordonu arter (H-E 4x).....	44
Resim 25: PGDM göbek kordonu ven (H-E 4x).....	44
Resim 26: PGDM göbek kordonu amniyon zarı ve wharton jölesi (H-E 10x).....	45
Resim 27: PGDM fetal membran (H-E 10x).....	45
Resim 28: PGDM fetal membran (H-E 20x).....	46
Resim 29: Kontrol grubu göbek kordonu amnion (Anti-AQP-9 100x).....	47
Resim 30: Kontrol grubu fetal membran (Anti-AQP-9 40x).....	47
Resim 31: Kontrol grubu göbek kordonu endotel (Anti-AQP-9 100x).....	48
Resim 32: Kontrol grubu fetal membran (Anti-AQP-9 100x).....	48
Resim 33: GDM göbek kordonu amniyon (Anti-AQP-9 100x)	49
Resim 34: GDM göbek kordonu arter endotel (Anti-AQP-9 100x)	49
Resim 35: GDM fetal membran (Anti-AQP-9 20x).....	50
Resim 36: GDM fetal membran (Anti-AQP-9 100x).....	50
Resim 37: PGDM göbek kordonu endotel (Anti-AQP-9 100x).....	51
Resim 38: PGDM fetal membran amniyon (Anti-AQP-9 40x).....	51
Resim 39: PGDM fetal membran (Anti-AQP-9 100x).....	52
Resim 40: PGDM göbek kordonu amniyon (Anti-AQP-9 40x).....	52
Resim 41: PGDM göbek kordonu amniyon (Anti-AQP-9 100x).....	53

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Akuaporinler plazma membranlarında suyun hızlı ve yoğun geçişi için özelleşmiş proteinlerdir. Hemen hemen vücutta tüm dokularda bulunan Akuaporinlerin 13 alt tipi tanımlanmıştır ve bu alt tiplerden 5 tanesinin (AQP 1, 3, 4, 8 ve 9) insan plasenta ve fetal membranlarında bulunduğu tespit edilmiştir.

Türk Diyabet Cemiyeti verilerine göre toplumumuzda DM prevalansı oldukça yüksektir(%13.7) ve görülme sıklığı giderek arttığı için büyük önem arz etmektedir. DM uzun dönemde, anormal damar oluşumu ile karakterize vaskülopati meydana getirmektedir. Diyabetik gebeler White sınıflamasında; Gestasyonel Diyabet (GDM), Pregestasyonel Diyabet (PGDM) olarak ayrılmış, PGDM’li gebeler ise vasküler komplikasyon varlığı ve sayısına göre alt sınıflara ayrılmıştır(1).

Yapılan literatür taramasında fetal membranlarda AQP-9 düzeyinin gestasyonel diyabetik gebelerde, idiyopatik koryoamniyonitte, preeklamsi olgularında artmış ekspresyonu kantitatif olarak gösterilmiştir. Yine başka bir çalışmada plasenta ve göbek kordonunda preeklampitik hastalarda AQP-9 ekspresyonunun artışı gösterilmiştir. Literatürde gestasyonel diyabetes mellitus ve normal gebelerin göbek kordonunda AQP-9 miktarını karşılaştıran bir çalışmaya, dahası vasküler komplikasyon geliştirmiş pregestasyonel diyabetli hastaların göbek kordonu ve fetal membranlarında AQP-9 miktarını değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızın hipotezine göre diyabetle oluşan hiperglisemiye bağlı olarak metabolik değişiklikler ve hipoperfüzyon sonucunda göbek kordonu ve fetal membranlarda AQP-9 miktarlarının değişiklik göstereceği ve bu değişikliğin GDM ve PGDM gruplarında farklı olacağı düşünülmektedir.

Bu hipotez çerçevesinde çalışmamızın amacı; daha önceden diyabeti olan ve vasküler komplikasyon geliştirmiş (VK-PGDM) (White D, F, R, H sınıfı) gebeler, gestasyonel diyabeti olan gebeler (GDM) ve herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan normal gebelerden (K) alınan göbek kordonu ve fetal membranları kullanılarak;

1. Vasküler komplikasyon gelişmiş gebelerde göbek kordonu ve fetal membranların

histomorfolojik yapısını inceleyerek, normal gebelerin ve GDM’li gebelerin göbek kordonu ve fetal membranları ile karşılaştırmasını yapmak

2. Aynı gruplarda göbek kordonu ve fetal membranlarda; immünohistokimyasal olarak human AQP-9 antikoru kullanılarak boyamaları yapıp; görsel olarak gruplar arası yapısal farklılık olup olmadığını göstermek

3. Gruplar arası farklılık olup olmadığının kantitatif olarak reverse transkripsiyon kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemiyle eş zamanlı olarak gösterilmesi amaçlanmıştır



2. GENEL BİLGİLER

2.1.Göbek kordonu

2.1.1.Anatomisi

Göbek kordonu fetusu plasentaya bağlayan, fetusun su, besin ve oksijen ihtiyacını karşılayan temel yapıdır(2). Ortalama 50-60 cm uzunluğunda, 1.5-2 cm çapında ve termde yaklaşık 40 gram ağırlığındadır. Uzunluğu amniyotik sıvı volümü ve fetal mobilitayla doğru orantılıdır(3). Fetal insersiyon bölgesinden plasentaya kadar olan toplam uzunluğu boyunca sarmal şeklinde bir yapıya sahiptir. Bu sarmal DNA sarmalına benzer yapıda olup helikal özelliğe sahiptir ve nasıl oluştuğu net olarak bilinmemektedir. Ancak fetal hareket, embriyonun pasif hareketleri, fetal hemodinamik etkiler, umbilikal arter duvarının muskuler yapısından kaynaklandığı sanılmaktadır(4). Göbek kordonu dışarıdan amniyon zarı ile sarılı olup, içerisinde 2 arter, 1 ven ve bu damarları çevreleyen jelöz yapıda Wharton jölesi bulunur. Bu nedenle yarı şeffaf görünümlü bir yapıya sahiptir ve oldukça esnektir(5,6).



Resim1. Sarmal yapıda göbek kordonu ve içinde vasküler yapılar

2.1.2.Histolojisi

Göbek kordonunun epitelyal örtüsü, embriyonun erken gelişmesi sırasında kordonu kapsayan amniyotik epitelden türer. Tek/çok katlı yassı-kübik epitel yapısındadır(7). Altında kalan stromaya subamniyotik stroma adı verilir, stromanın bu bölümünde az

sayıda stroma hücresi, dağınık ve ince kollajen lif demetleriyle (tip I, III ve VI kollajen) birlikte bol miktarda hücreler arası sıvı içeren bir ortamda bulunur. Subamniyon tabakasının altında insan göbek kordonunun büyük bölümünü oluşturan ve damarların çevresinde kalın bir koruyucu manto yapısı oluşturan Wharton jeli adında muköz bağ dokusu yapısı (göbek kordonu ve fetal organlarda) bulunur. Yapısında kapillerler, lenfatikler ve sinir lifleri bulunmaz. Bazı özel boyalarla kordonun plasentaya yakın ucunda küçük otonomik sinir liflerinin bulunabileceği gösterilmiştir. Wharton jeli deoksijene kan ve metabolik atık ürünlerini fetustan plasentaya taşıyan iki umbilikal arter ve oksijenli ve beslenme açısından zengin kanı plasentadan fetusa taşıyan umbilikal veni sarar. Ayrıca Wharton jeli, büyüme faktörleri gibi bazı bileşiklerin depolanması için de önemli bir rol oynar. Wharton Jölesinin ana hücreleri myofibroblastlardır. Miyofibroblast; aktin, kas-dışı miyozin, vimentin ve desmin içeriği ile umbilikal kan akımını düzenleyebilecek kontraktıl özelliktedir. Alfa düz kas aktin, perivasküler alanda ve amnion zarına yakın hücrelerde daha çok sentezlenirken, intervasküler alanda daha az bulunur. Myofibroblastların ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin, gebelik dönemlerine göre ve stromanın farklı bölgelerinde dağılımlarına göre değişiklik gösterdikleri, böylece göbek kordonunun turgorunu düzenlemede etkili olduğu anlaşılmıştır(8,9).

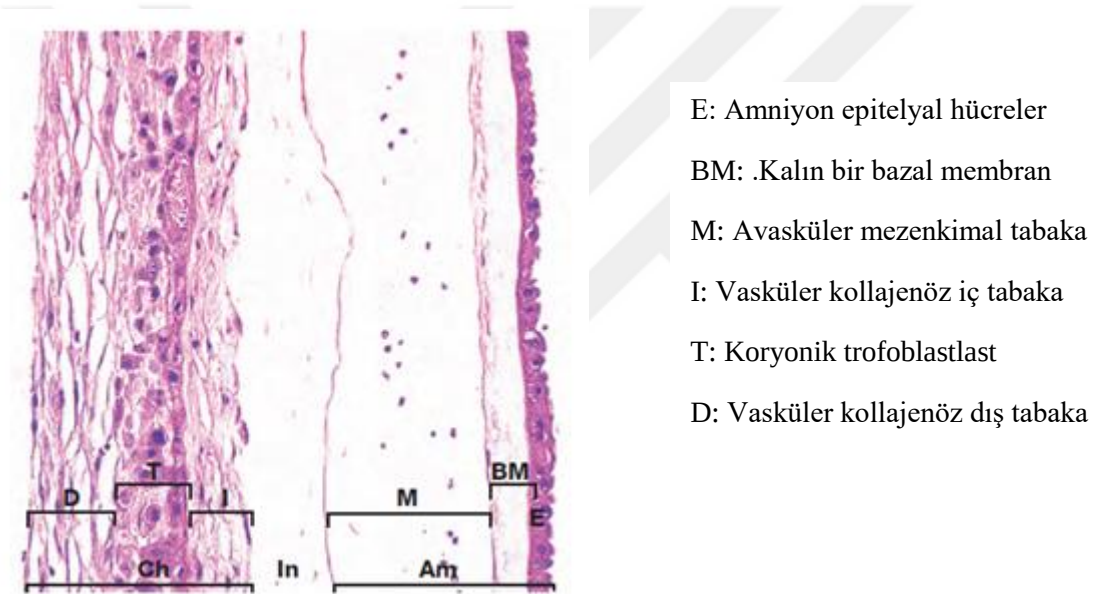
Umbilikal arterler histolojik olarak internal elastik laminası olmayan çift katlı muskuler duvardan oluşur. Umbilikal ven ise ince duvarlı ve lümeni geniştir. İnternal elastik laminaya sahip tek katlı düzensiz sirküler tipte kas tabakasından oluşur. Vasküler yapılar fetüsün beslenmesi için gerekli olan birçok makromolekül (kollajen, elastin, proteoglikanlar ve glikoproteinler) içerir. Göbek kordonu plasentanın fetal yüzeyine ulaştığında, kan damarları koryonik villuslara giren birçok dallara bölünmüştür. Koryonik villuslarda arteriokapiller venöz sistemi oluştururlar ve oksijenli kan, fetusa, koryonik vililerdeki venüller ve venler yoluyla geri döner. Bunlar göbek kordonunda umbilikal veni oluşturmak için birleşir.

2.2.Fetal membranlar

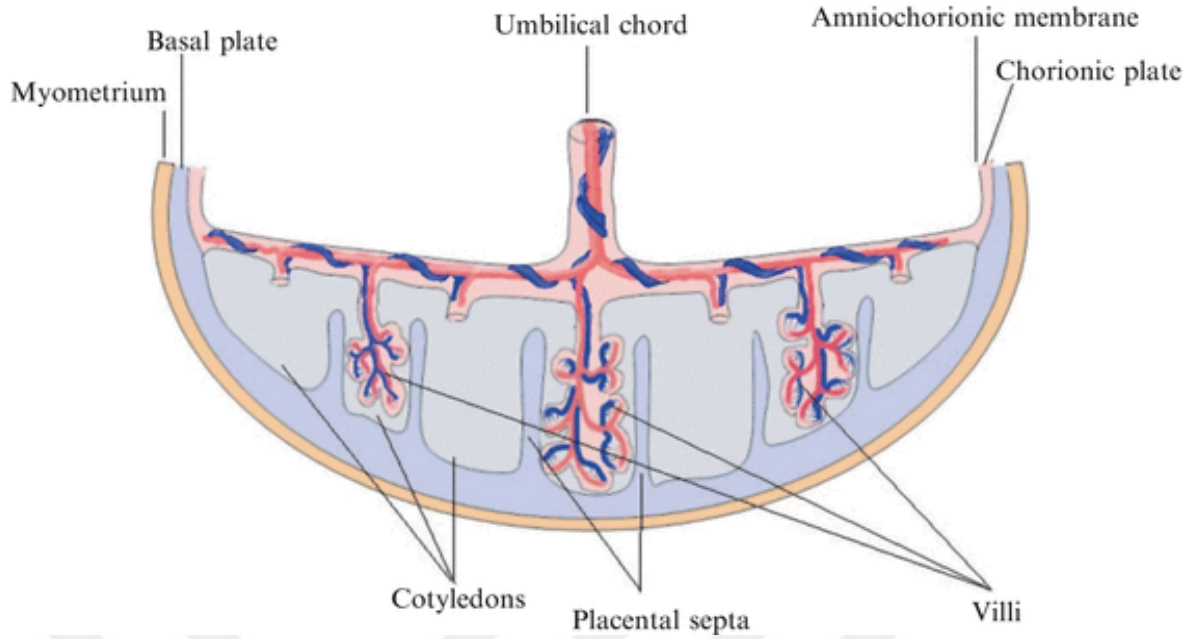
Fetal membranlar; insanda amniyotik ve koryonik membranlardan oluşur. Amniyon zarı, vaskülarizasyonu ve inervasyonu olmayan bir bağ dokusu tabakası ve amniyon sıvısı ile doğrudan temas halinde olan tek katlı bir epitelyum tabakasından oluşur(10). Bu epitelyum ekstraembriyonik ektoderm kaynaklıdır; kollajen tip IV, laminin, fibronektin

ve nidojenden zengin kalın bir bazal membrana sahiptir. Ekstraembriyonik mezodermden köken alan bağ dokusundan oluşan kısım ise kollajen tip I ve III ü içeren üç tabakaya bölünmüştür: iç aselüler kompakt tabaka, gevşek fibroblast tabaka ve dış süngerimsi tabaka. Amniyon ve koryon zarı dış süngerimsi tabaka sayesinde künt diseksiyon yoluyla kolaylıkla ayrılabilir(11,12).

Koryonik membran ise 3 tabakaya ayrılmıştır: İntermediate zon ekstraembriyonik kölom kalıntısını temsil eder ve kalınlığı değişkendir, koryonu amniyondan ayıran bölgedir. Vasküler kollajenöz iç tabaka ekstraembriyonik mezodermden köken alır. Vasküler kollajenöz dış tabaka desidua kapsüllaris içeren maternal orijinli dış tabakadır. Bu 2 tabakanın arasında trofoblastik hücreler bulunur.(13)



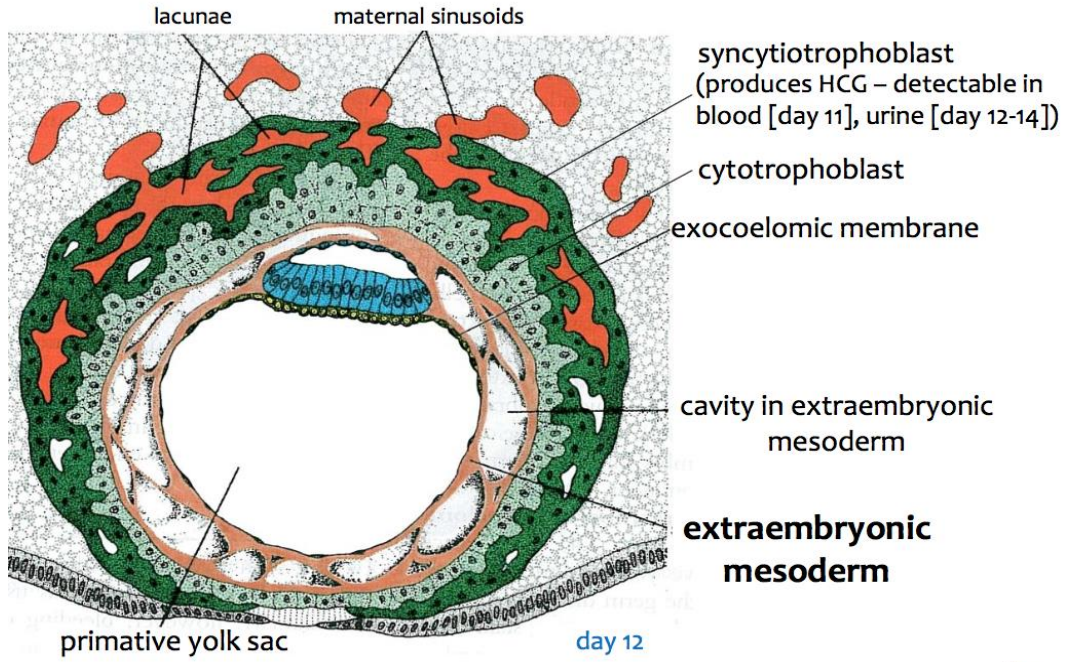
Resim 2: Hematoksilen – Eozin ile boyanmış fetal membranlar



Resim 3: Plasenta, göbek kordonu, amniyon, koryon membranı ve villus yapılarının şematik gösterimi

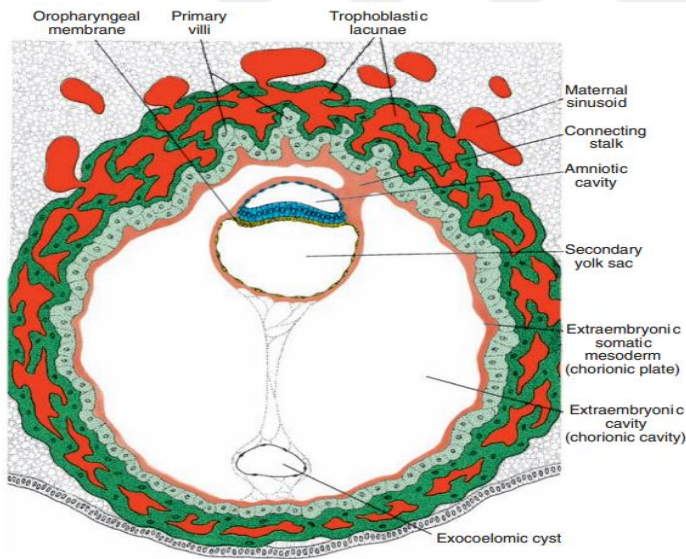
2.3.Göbek Kordonu Ve Fetal Membranların Embriyolojisi

Embriyonik gelişimin 9.gününde anembriyonik kutuptaki hipoblast hücreleri farklılaşarak sitotrofoblastların iç yüzünü döşeyen ekzosölomik membranı (hauser membranı) oluştururlar. Bu membran hipoblastla birlikte ekzosölomik boşluğu (primitif yolk sac) çevreler. Embriyonik gelişimin 11 ve 12. Günlerinde embriyo uterusu tamamen implante olmuş ve implantasyon bölgesindeki hasar fibrin tıkaçıyla kapatılmış durumdadır. Bu esnada sitotrofoblastların iç yüzüyle ekzosölomik boşluğun dış yüzü arasında yeni bir hücre topluluğu oluşur. Yolk sac hücrelerinden köken alan bu hücreler ekstraembriyonik mezoderm adlı bağ dokusu yapısını oluştururlar. Daha sonra içinde büyük boşluklar oluşur; bu boşluklara ekstraembriyonik kölom ya da koryon boşluğu denir. Koryon boşluğu amniyon ve primitif yolk sac ı çevreler..Koryon boşluğunun iyice genişlemesiyle sitotrofoblastların iç yüzünü döşeyen ekstraembriyonik mezoderm koryon plağı adını alır ve ekstraembriyonik boşluğun koryon boşluğunu katettiği tek bölge bağlantı sapında kalır. Bu kısım daha sonra kan damarlarının oluşumuyla göbek kordonuna dönüşür. Amniyonun dış mezenkimal katmanı daha sonra korionamnion veya fetal membranları oluşturacak olan koryonun iç mezenkimal katmanı ile birleşir. İki katmanın doğumda birbirinden ayrılması genellikle zordur(14).



S 4.4

Resim 4: Embriyolojik gelişimin 12. Gününde ekstraembriyonik mezodermin oluşması

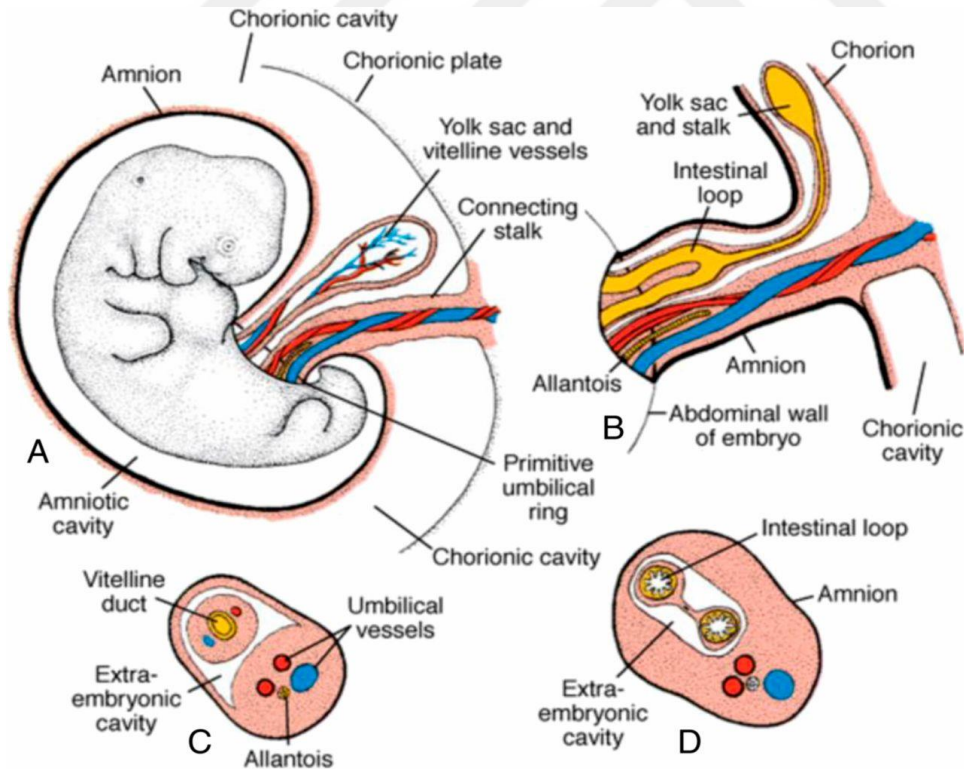


Resim 5: Koryon boşluğunun giderek genişlemesiyle bağlantı sapının oluşumu

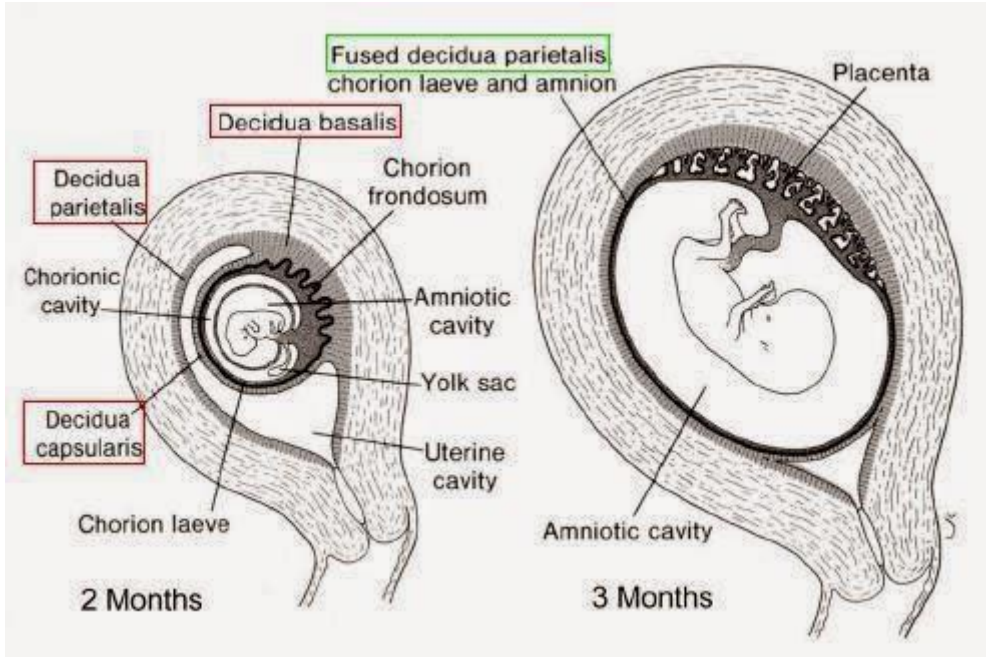
Göbek kordonu konsepsiyondan sonraki 28. günde gelişir ve fetusların %95'inde 9 haftada gelişimi tamamlanır. Göbek kordonunun gelişimi, erken embriyoyu çevreleyen ve bağlantı sapı ile koryona bağlı kalan ekstraembriyonik kölom-koryon boşluğunun oluşumu ile başlar. Gelişimin 5.haftasında amniyonla embriyonik ektodermin birleşim yerinde bulunan pirimitif göbek halkası (amniyoektodermal birleşim) içerisinde 3 yapı geçer:

- 1) Bağlantı sapı; allantois ve 2 arter 1 venden oluşan umbilikal damarlar
- 2) Yolk kesesi sapı (vitellin kanal) ve beraberindeki vitellin damarlar
- 3) İntra ve ekstraembriyonik boşlukları birbirine bağlayan kanal

Daha fazla embriyonik gelişme ile bağlantı sapı ventrale doğru yer değiştirirken, vitellüs kesesini orta barsağa bağlayan vitello-intestinal kanal ise kaudale doğru yer değiştirir. Embriyo büyüdükçe amniyon kesesi koryon boşluğundan daha hızlı genişleyerek koryon boşluğunun küçülmesine neden olur(15). Büyüyen amniyon kesesi ince bir koryon boşluğuyla sarılmış olan vitello-intestinal kanal ve vitellüs kesesi kalıntısına da bası yapar. 3. Ayın sonunda amniyon iyice genişleyerek koryonik plakla birleşir, koryon boşluğu yok olur, ardından vitellüs kesesi büzüşerek zamanla yok olur. Yine 3. Ayın sonlarında barsak halkaları karın boşluğuna geri döner(16). Allantois, vitellin kanal ve bu kanala ait damarların da kaybolmasıyla göbek kordonu wharton jölesi ile çevrili umbilikal damarlardan oluşan bir yapı olarak kalır (13,17,18).



Resim 6: Amniyon kesesinin genişlemesiyle göbek kordonunun şekillenmesi



Resim 7: Amniyon, koryon ve desidua parietalisin füzyonunun şematizasyonu

2.4. Diyabetes mellitus

2.4.1. Tanım ve sınıflandırma

Diabetes eski Yunanca'da sifon anlamına gelir ve aşırı idrar yapımını anlatır. Mellitus ise yine Yunanca'da bal anlamına gelen mel kelimesinden geliştirilmiştir. DM, insülin hormon eksikliği veya insülin etkisindeki defektler sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır.

Bir hastaya bir tür diyabet diyebilmek çoğu zaman tanı anında mevcut olan koşullara bağlıdır ve birçok diyabetik hastayı belli bir sınıfa dahil etmek kolay değildir. Örneğin; gestasyonel diyabet olan bir kişi doğumdan sonra da hiperglisemik olmaya devam edebilir ve tip 2 diyabete sahip olabilir. Aynı şekilde yüksek dozda ekzojen steroid alımına bağlı diyabet olan bir kişi glukokortikoidler kesildikten sonra normoglisemik hale gelebilir. Amerikan Diyabet Cemiyeti'nin (American Diabetes Association, ADA) yaptığı etiyolojik sınıflamaya göre başlıca 4 grup vardır.(19,20)

- 1- Tip 1 DM (genellikle mutlak insülin eksikliğine yol açan otoimmün beta hücre yıkımı nedeniyle)
- 2- Tip 2 DM (genellikle insülin direnci zemininde, beta hücrelerindeki insülin sekresyonunun progressif kaybına bağlı)
- 3- Gestasyonel DM (gebelik öncesi normal olup gebeliğin 2. veya 3. trimesterında tanısı konan diyabet)
- 4- Diğer nedenlere bağlı olarak gelişen spesifik diyabet tipleri;
 - Monogenik diyabet sendromları (neonatal diyabet ve MODY gibi)
 - Ekzokrin pankreas hastalıkları (kistik fibrozis ve kronik pankreatit gibi)
 - İlaçlara veya kimyasal ajanlara bağlı gelişen diyabet (glukokortikoid kullanımı, HIV/AIDS tedavisi sonrası veya organ transplantasyonu sonrası kullanılan immünsüpresif ajanlara bağlı)

Tip 1 ve tip 2 DM, klinik prezentasyon ve hastalık progresyonunun önemli ölçüde değişebileceği heterojen hastalıklardır. Sınıflandırma, tedavinin belirlenmesi açısından çok önemlidir; ancak bazı kişiler tanı anında tip 1 veya tip 2 DM olarak sınıflandırılmazlar. Tip 2 DM' nin sadece yetişkinlerde ve tip 1 DM' nin sadece çocuklarda geliştiği yönündeki geleneksel paradigmlar artık doğru değildir; çünkü her iki hastalık da her iki yaş grubunda görülebilir. Tip 1 DM' li çocuklar, genellikle poliüri, polidipsi gibi semptomlar ve hastaların yaklaşık üçte birini etkileyen diyabetik ketoasidoz ile prezente olurlar (20). Tip 1 DM başlangıcı, erişkinlerde daha değişken olup çocuklarda görülen klasik semptomlarla birlikte olmayabilir. Özellikle bazı etnik gruplardaki tip 2 diyabetik hastalar bazen başlangıçta diyabetik ketoasidoz ile başvurabilirler (21). Başlangıçta tüm yaş gruplarında diyabet tipini ayırt etmede zorluklar görülebilmeye rağmen, doğru teşhis zaman içinde belirgin hale gelir. Hem tip 1 hem de tip 2 DM' de çeşitli genetik ve çevresel faktörler, klinik olarak hipergliseminin ortaya çıktığı beta hücre kitlesinin ve/veya fonksiyonunun progressif kaybına neden olabilir. Hiperglisemi meydana geldiğinde progresyon oranları farklı olmasına rağmen her tür diyabet hastası aynı kronik komplikasyonları geliştirme riski altındadır.(21)

2.4.2.Diyabet Semptomları ve Tanı Kriterleri

Hastaların büyük çoğunluğu asemptomatiktir ve hiperglisemi rutin bakılan laboratuvar incelemesinde tespit edilmektedir. Genel semptomlar:

- Poliüri
- Polidipsi
- Polifaji ve iştahsızlık
- Noktüri
- Ağız kuruluğu
- Bulanık görme
- Açıklanamayan kilo kaybı

Tablo 1: Diyabetes mellitus tanı kriterleri (22)

Tablo 1. Diabetes mellitus ve glukoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri*					
	Aşkar DM	İzole IFG**	İzole IGT	IFG + IGT	DM riski yüksek
APG (≥ 8 saat açlıkta)	≥ 126 mg/dL	100-125 mg/dL	< 100 mg/dL	100-125 mg/dL	-
OGTT 2. st. PG (75 g glukoz ile)	≥ 200 mg/dL	< 140 mg/dL	140-199 mg/dL	140-199 mg/dL	-
Rastgele PG	≥ 200 mg/dL + Diyabet semptomları	-	-	-	-
A1C***	≥ %6.5 (≥ 48 mmol/mol)	-	-	-	%5.7-6.4 (39-46 mmol/mol)

* Glisemi venöz plazmada glukoz oksidaz yöntemiyle mg/dL olarak ölçülür.
 ** 2006 yılı DSÖ/IDF raporunda normal APG kesim noktasının 110 mg/dL ve IFG: 110-125 mg/dL olarak korunması benimsenmiştir.
 *** Standardize yöntemlerle ölçülmelidir.
 DM: Diabetes mellitus, APG: Açlık plazma glukozu, 2. st PG: İkinci saat tokluk plazma glukozu, OGTT: Oral glukoz tolerans testi, A1C: Glikozillenmiş hemoglobin A_{1c}, IFG: Bozulmuş açlık glukozu (Impaired Fasting Glucose), IGT: Bozulmuş glukoz toleransı (Impaired Glucose Tolerance), DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü, IDF: Uluslararası Diyabet Federasyonu.

Tabloda, 8 saat açlık sonrası ölçülen glukoz değeri; Açlık Plazma Glukozu (APG); hastaya verilecek 75 g'lık oral glukoz sonrası bakılan plazma glukoz seviyesi testleri ise OGTT olarak ifade edilmektedir.

- APG'nin 126 mg/dl,
- OGTT de 2. saatte ölçülen plazma glukozunun 200 mg/dl,
- Rastgele bakılan plazma glukozunun 200 mg/dl,
- Glikozillenmiş hemoglobini ifade eden HbA1C nin ise % 6.5 (≥ 48 mmol/mol) ve üzerinde olması

şeklinde dört yöntemden herhangi biri ile aşikar diyabet tanısı konulabilmektedir. Tabloda verilen İzole Bozulmuş Açlık Glukozu (BAG) ve İzole Bozulmuş Glukoz Toleransı (BGT) gibi (plazma glukozunun ara değerlerde kaldığı ölçümlerde) durumlarda ikinci bir testle tanıyı doğrulamak gerekmektedir.

2.4.3.Diyabetin Komplikasyonları

Diyabetin komplikasyonları genel olarak akut ve kronik komplikasyonlar olmak üzere 2 ye ayrılır. Akut komplikasyonlar:

- Diyabetik ketoasidoz (DKA)
- Hiperozmolar hiperglisemik durum (HHD)
- Laktik asidoz (LA)
- Hipoglisemi

DM, uzun dönemde ise progresif gelişen spesifik komplikasyonlara yol açar ve bunlar hastalığa bağlı morbidite ve erken mortalitenin en önemli nedenleridir. Diyabetin kronik komplikasyonları mikrovasküler ve makrovasküler olarak sınıflandırılabilir.(23)

Mikrovasküler komplikasyonlar:

- Sinir sistemi harabiyeti (nöropati)
- Renal sistem harabiyeti (nefropati)
- Göz harabiyeti (retinopati)

Makrovasküler komplikasyonlar:

- Kardiovasküler hastalık,
- Felç
- Periferel vasküler hastalıklardır.

2.5.Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM)

2.5.1.GDM patogenezi

Normal gebelik, plasental hormonlara bağı olarak özellikle ikinci trimesterde insülin duyarlılığının bozulmasından dolayı “diyabetojenik bir durum” olarak yorumlanabilir(24). Gebelikte vücudun enerji ihtiyacı artmıştır. Bebeğin gelişimi için gerekli enerjiyi sağlamak için daha fazla glukoz gereksinim duyulur. Bu nedenle gebeliğin ilk aylarında açlık kan şekeri normale göre düşük düzeydedir. Postprandiyal glukoz düzeyleri ise uzun süre yüksek kalmaktadır. Bunun sebebi insüline olan periferik direncin artmasıdır(25). Gebe kanında yüksek miktarda bulunan lipoproteinler, trigliseritler ve serbest yağ asitleri de hiperglisemiye katkıda bulunurlar(26). İlk trimester, maternal protein, glikojen, yağ depoları ve glikoneogenezin arttığı anabolik bir evredir. Östrojen insülin direncine karşı koruyucu bir etki gösterirken, progesteron insülin direncini artırır. Gebeliğin erken dönemlerinde maternal yüksek insülin düzeyleri lipogenezi artırır, lipolizi ise baskılar. Gebelikte insülin reseptörlerinde azalma yoktur. İkinci trimester başında yükselmeye başlayan İnsan Plasental Laktojen (hPL), İnsülin Reseptör Substrat-1 (IRS-1) fosforilasyonunda azalmaya ve bundan dolayı belirgin insülin direncine yol açar. hPL’nin yanı sıra, gebelik ilerledikçe anne kanındaki miktarları artan prolaktin, kortizol ve leptin gibi insülin antagonisti hormonların da etkisi ile insülin duyarlılığı azalır. Söz konusu hormonlar ve progesteron, insüline duyarlı hücrelerin glukoz alımını bozarak etki gösterirler ve gebeliğin diyabetojen bir durum olmasından sorumlu ana hormonlardır. Plasental hormonların anne kan glukoz homeostazisi üzerindeki etkilerinden dolayı GDM belirgin olarak üçüncü trimesterde gebeleri etkiler. Normal bir gebelikte üçüncü trimesterde insülin duyarlılığında % 44’lük bir azalma saptanmıştır. Non-Diyabetik gebelerde insülin direncindeki bu artış, insülin üretimindeki artış ile rahatlıkla dengeler. Normal koşullar altında yeterli insülin salgılayabilen fakat gebeliğin artan insülin rezistansını karşılayamayan gebelerde ise gestasyonel diyabet meydana gelir(27,28).

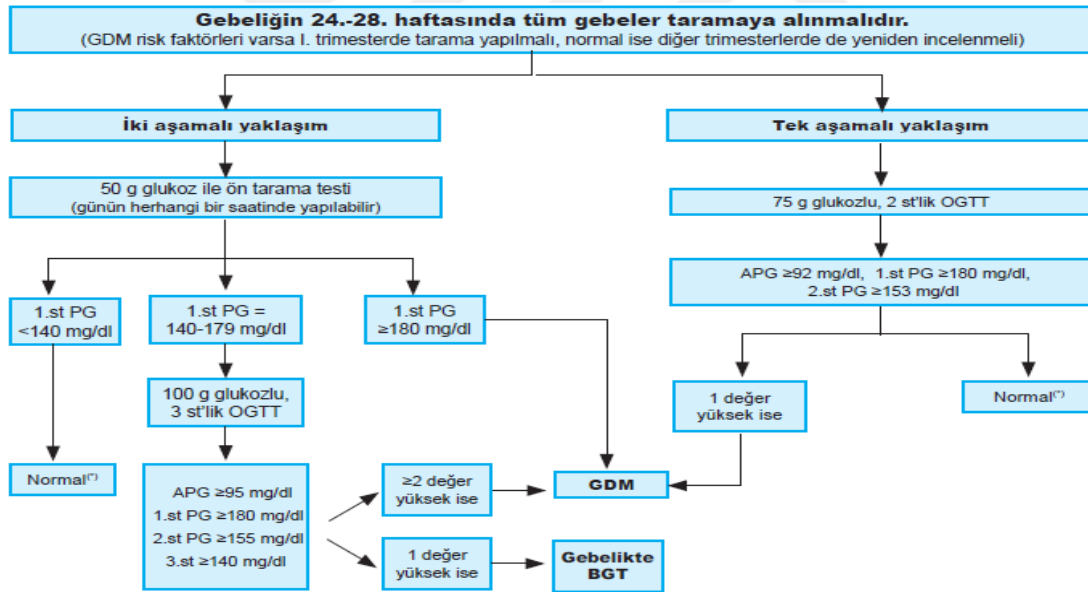
Gestasyonel Diyabetes Mellitus kısa ve uzun vadede önemli maternal ve fetal komplikasyonlarla ilişkilendirilmiştir. GDM, organogenez tamamlandıktan sonra ortaya çıkan bir problem olduğundan dolayı konjenital anomali görülmesi beklenmez. Annenin kan şekeri düzeyleri fetal komplikasyonlar için belirleyicidir. Diyabetik gebelerin bebeklerinde makrozomi, polisitemi, hipoglisemi, hiperbilirubinemi, hipokalsemi, Respiratuvar Distress Sendromu (RDS) gibi neonatal morbiditeler, normal gebelere göre daha sık rastlanır. Bu risk artışı gebelik öncesinde diyabeti olan gebelerde (Pregestasyonel diyabet, PGDM) ise daha fazladır.(29-33)

2.5.2.GDM tanısı

Klinikte GDM tanısı için tek aşamalı veya iki aşamalı yaklaşımlar kullanılmaktadır. Tarama ve tanı yöntemlerinin tüm gebelere mi yoksa sadece riskli gebelere mi uygulanması gerektiği, bu testlerin tek ya da iki aşamalı olması ve tanısal eşik değerler konularında bir fikir birliği bulunmaz(34).2013 yılında yayınlanan WHO raporunda, GDM tanısı için AKŞ: 92-125 mg/dL veya OGTT 2. saat kan şekeri: 153-199 mg/dL kriterlerinden birinin bulunmasının GDM tanısı için yeterli olduğu vurgulanmıştır.

Türk endokrinoloji ve metabolizma derneği'nin 2019 kılavuzunda da GDM tek aşamalı ve iki aşamalı tanı algoritması tablodaki gibidir(23).

Tablo 2: GDM tanı algoritması(22)



ŞEKİL 1.2: TEMD iki aşamalı ve tek aşamalı gestasyonel diyabet taraması ve tanısı

^(*)GDM risk faktörleri varsa 3. trimesterde yeniden incelenmeli. GDM: Gestasyonel diabetes mellitus, PG: Plazma glukozu, OGTT: Oral glukoz tolerans testi, APG: Açlık plazma glukozu, BGT: Bozulmuş glukoz toleransı.

2.6.Gebelikte DM

Gebeliğin en sık görülen metabolik bozukluğu olan DM tüm gebelerin yaklaşık % 5-6'sında görülür. Bunun % 90'ını GDM, % 10'unu pregestasyonel DM oluşturur. Bunların

da %8'i tip 2 DM ve % 2 'si tip 1 DM' dur. Pregestasyonel Diyabetes Mellitus (PGDM) gebelik öncesi başlamış aşikar diyabettir. Erken gebelik haftasında rutin kontrollerde açlık hiperglisemisi saptanmasının GDM'dan çok aşikar diyabete bağlı geliştiği düşünülür. GDM, bütün doğumlardaki komplikasyonların %3-5'inden sorumludur(35). Diyabeti olan gebelerde fetal ve maternal riski belirlemek için ilk sınıflandırma 1949 yılında Priscilla White tarafından geliştirilmiştir. Bu sınıflama; diyabetin süresi, başlangıç yaşı ve eşlik eden komplikasyonlara göre yapılır. White sınıflaması tanı yaşının genç olması ve diyabetin uzun süreli olması durumlarında, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların artmasına ve bu komplikasyonların maternal ve fetal sonuçları etkilemesine dayanır(1)(36).

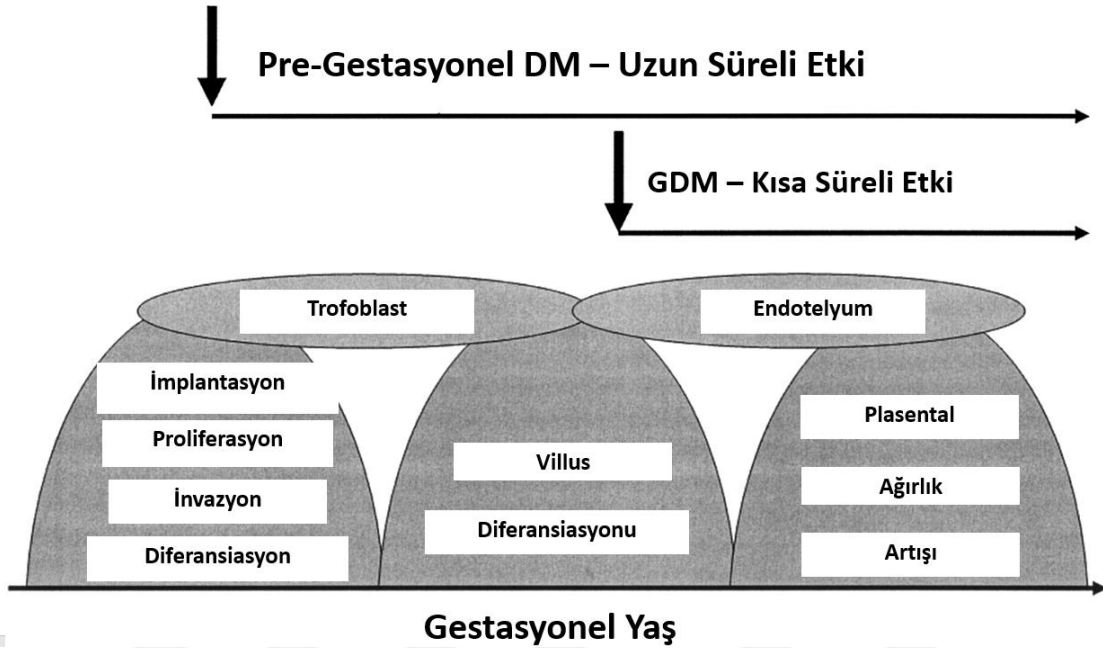
Tablo 3: White sınıflaması(22)

Grup	Sınıf
Gestasyonel diyabet	
A1	Herhangi bir yaş ve sürede, yalnız diyetle regüle
A2	Herhangi bir yaş ve sürede, diyet + insülin ile tedavi edilen
Pregestasyonel diyabet	
B	Diyabet tanısındaki yaşı ≥ 20 yıl ve diyabet süresi < 10 yıl, komplikasyonsuz
C	Diyabet tanısındaki yaşı veya diyabet süresi: 10-19 yıl, komplikasyonsuz
D	Diyabet tanısındaki yaşı < 10 yıl veya diyabet süresi ≥ 20 yıl
F	Herhangi bir yaş ve sürede, insülin tedavisinde, nefropati (> 500 mg/gün protein) var.
R	Herhangi bir yaş ve sürede, insülin tedavisinde, proliferatif retinopati var
RF	Herhangi bir yaş ve sürede, insülin tedavisinde; R ve F sınıfındaki özelliklerin bir arada bulunması
H	Klinik olarak tespit edilmiş aterosklerotik kalp hastalığı
T	Renal transplantasyon öyküsü

2.6.1.Diyabetin Göbek Kordonu ve Fetal Membranlar Üzerine Etkileri

Maternal diyabette, plasentaya, göbek kordonuna, embriyoya zarar veren karmaşık ve çok faktörlü süreçlerde hem maternal ortam hem de genetik arka plan önemlidir. Bu dokuların diyabetten etkilenmesi diğer dokular gibi annenin diyabetinin süresi, bu süre zarfında sıkı takip ve tedavi edilip edilmemesi ve vasküler komplikasyon derecesiyle yakından ilişkilidir. Genel olarak diyabetli anne bebeklerinin göbek kordon çapları makrozomik fetüslerde daha büyük, WJ miktarı da artmış olarak görülmüştür. Fetal

membranlarda ise GDM üzerinden yapılan çalışmalarda villus lumeninin artması ve sinsityal nodüllerin varlığı ile yüksek villus yoğunluğu ile karakterize koryonik villuslarda immatürite, ayrıca terminal villuslarda stromal ödem, koranjiozis(villöz hipervaskülarite), çekirdekli eritrositler (n-RBC), gözlenmiştir(37-40).



Resim 8: GDM – PGDM kısa-uzun süreli plasental etkiler

2.7.Akuaporinler

2.7.1.Akuaporinlerin Keşfi

Hücreler çift katlı lipit tabaka, proteinler ve oligosakkaritlerden oluşan hücre zarı (plazmalemma) ile dış ortamdan ayrılır. Hücre zarı, hücrenin yapısal bütünlüğünü sağlar ve hücreyle dış ortam arasındaki madde alışverişini kontrol eder. Tüm canlılarda en fazla bulunan ve canlılık için vazgeçilmez bir molekül olan suyun hücre zarından geçişi, hücre hacminin ve sitoplazma osmolaritesinin düzenlenmesini sağlar. Moleküler düzeyde ise su birçok önemli molekülün konfigürasyonunda ve metabolik süreçlerde yer alır. Suyun zar boyunca hareketi uzun yıllardır araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Su gibi küçük ve nötral moleküller, hücre zarını pasif difüzyon ile geçebilir. Ancak suyun hızlı ve yoğun geçişi, bu iş için özelleşmiş kanallar yardımıyla olmaktadır. Bu kanallara akuaporin adı verilmektedir.(41) Yüksek gradient olan bölgede su geçişi transmembran pasif transport yolu ile gerçekleşir ve ozmotik kuvvetin yüksek olmasından dolayı yeterli olabilir. Buna

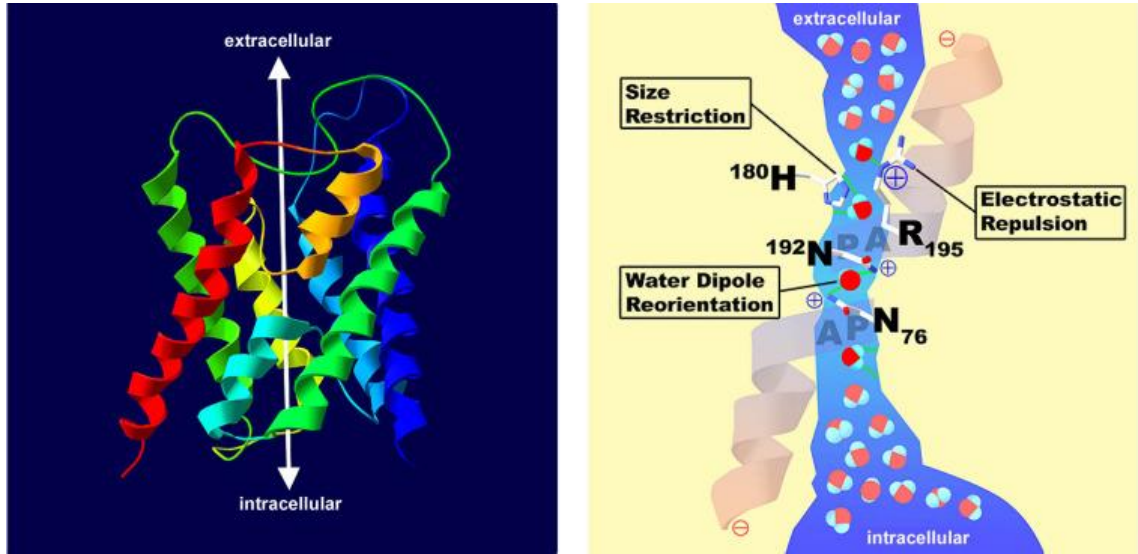
karşı ozmotik fark küçükse pasif transport tek başına yetmez olur ve gereken geçişi akuaporinler sağlar.(42)

İlk olarak Benga ve ark. 1985’de insan eritrositlerinin zarında su kanal proteinlerini keşfetmişler ve bunu 1986’da yayımlamışlardır. 1991 yılında Smith ve Agre eritrosit zarında Rh antijeniyle birlikte ‘Channel-forming Integral Protein 28’ adlı su kanalını tanımlamışlardır (43). Preston ve Agre’nin de içinde bulunduğu grup, 1992 yılında *Xenopus* oositleri üzerinde ‘Channel-forming Integral Protein 28’in su kanalı olabileceğini göstermişlerdir(44). 1993 yılında Fushimi ve ark. renal toplayıcı tübülde su kanalının bir başka formunu tanımlamışlardır. Aynı yıl Agre ve ark. ‘Channel-forming Integral Protein 28’in adını AQP1 olarak değiştirmişlerdir. AQP1 kanalından bir saniyede yaklaşık 3×10^9 su molekülü çok hızlı bir şekilde geçmektedir. Çeşitli çalışmalarıyla zarlardan su geçişinin moleküler temelini aydınlatması nedeniyle Peter Agre 2003 yılında Nobel Kimya ödülünü almaya hak kazanmıştır(45) .

2.7.2.Akuaporinlerin Yapısal Özellikleri ve İşlevi

1994 yılının başlarında önerilen kum saati modeline göre su kanalları asparajin-prolin-alanin (NPA) bölgeleri içerir ve zarı 6 kez geçer. Kanal proteininin hem amino hem karboksi ucu sitozolik yüzdedir ve A, C ve E bölgeleri dış yüzde, B ve D bölgeleri ise sitoplazmik yüzeyde dönüş yapar. NPA bölgelerindeki B ve E dönüşleri bitişik konuma getirilerek kum saatinin merkezinde sınırlandırılmış bir alan oluşturulur ve NPA tekrar bölgesinin yanındaki su akışı tek sıra halinde gerçekleşir. Kanal altında, su gibi küçük moleküllerin geçişine izin veren, özellikli bir boğaz bölgesi bulunur. Boğazı meydana getiren yan zincirler fenilalanin, histidin, sistein ve arginininden meydana gelir. Hem suyun hızlı geçişini sağlayan hem de yalnız suyu geçiren bu kanallarda bu olağanüstü selektif geçirgenliğin sebebi, akuaporinlerin dört monomere sahip olması ve tek başına su moleküllerinin geçişine izin veren her monomerin 2-3 Å° çapında transmembran poruna sahip olmasıdır. Kanal proteinlerinde monomer ve por sayısı kanaldan kanala değişkenlik gösterir. Örneğin; potasyum kanalı akuaporin gibi dört monomere sahiptir ancak bu dört monomer yalnız bir por oluşturur. Anyon kanalları pentamerik yapıda ve tek pora sahiptir. Klor kanalı ise her monomerde pora sahip olan iki alt üniteden meydana gelmektedir. Su kanallarından su ve diğer solütlerin geçişi

konsantrasyon farkına göre yürütülen pasif taşıma mekanizmasının bir tipi olan kolaylaştırılmış difüzyon ile olur(46,47).



Resim 9: Lipid zarda yer alan akuaporin kanal yapısı (kum saati modeli)

2.7.3. Akuaporinlerin Sınıflandırılması

Memelilerin tüm hücre tiplerinde 13 akuaporin (AQP) türünden (AQP0-12) bahsedilmekle birlikte 14 AQP olduğunu söyleyen yayınlar da mevcuttur ve bunlar hemen hemen vücudun her dokusunda bulunurlar(48). AQP ailesinden 0, 1, 2, 4, 5, 6 ve 8 sadece su kanalı olarak işlev görürler. AQP3, 7, 9, 10 ise gliserolün de geçişini sağladıkları için akuagliseroporinler olarak adlandırılırlar. Son zamanlarda tanımlanan AQP11 ve AQP12 ise süperakuaporin olarak adlandırılırlar. Sitoplazma yerleşimlidir ve fonksiyonları henüz tam olarak anlaşılmamıştır.

AQP0: Sadece göz lensinde bulunur. AQP0'ın insan hastalıklarıyla ilişkisi, konjenital kataraktı olan büyük ailelerde yapılan genetik bağlantı analizleriyle gösterilmiştir. İnsan AQP0'ı klonlanarak xenopus oositleri ile yapılan çalışmalarda mutant genin ifadenmesinde bir sorun olmadığı ancak proteinin plazma zardaki hareketinin kusurlu olduğu görülmüştür.(31)

AQP1: Böbreklerde vasa rektanin inen kolunda, tubuler lümeninden interstisyuma büyük madde geçiş yollarında ve damar boşluklarında tanımlanmıştır. Ayrıca AQP1, damar ağlarında önemli salgı rolleri olan epitellerde (beyin omurilik sıvısı), gözün bölümlerinde

pigment içermeyen epitellerde ve akciğerdeki bronşlar dahil bir çok organın kılcal damar epitellerinde gösterilmiştir(42).

AQP2: Vazopressin ile ilişkili olup vazopressin miktarı artınca AQP2'nin su geçirgenliği azalmaktadır. Aynı zamanda AQP2'nin böbrekteki miktarı belirtilenin altında olduğunda potasyum düşüklüğü ve nocturnal enuresis (gece idrarını tutamama), üstünde ise kalp yetmezliği, uygunsuz ADH sendromu gibi hastalıklar görülebilir.(49)

AQP3: Su ve gliserol geçişinin yapıldığı böbrek, hava kanalları, deri ve gözde bulunan aquaporindir. İnsanlarda eritrositlerde bulunurken böceklerin sindirim yolunda ve beyinde yer alır. Mikrobik dünyada çok çeşidi vardır. Bitkiler en geniş yelpazeyi sunmaktadır.

AQP4: Glial hücrelerde, bez epitelinde, akciğerlerde, retinada, çizgili kas sarkolemmasında, midede, subaraknoid astroglial hücrelerinin içinde, kılcal damar ve toplardamar duvarlarında, vasopressin salgılayan nöronların etrafındaki glial lamellae'nin içinde bulunan, supraoptik çekirdek içeren osmosensory kısımlarda bulunur(50). Beyindeki glial hücrelerde bulunmasına rağmen nöronlarda bulunmaz. Suyun AQP4 sayesinde kan beyin bariyerini aştığı düşünülmektedir. AQP4'ün beyin hücrelerindeki etkinliği de vasopressin tarafından uyarılır. AQP4 geninde okuma hatası meydana geldiğinde hiponatremik beyin ödemi ve iskemik beyin hasarı gelişir(51).

AQP5: Lakrimal ve mukozal bezlerin apikal zarında ifade edildiği gibi alveollerde de yaygın olarak görülür. Bu yaygınlık kolinerjik uyarana cevap olarak artan bronkospazma sebep olur. AQP5 göz yüzeyindeki korneal epitelde hidrasyon ve şeffaflık sağlar ve korneal yara iyileşmesinde görevlidir. Glandular sıvı salınımı için sınırlandırıcı rolü olan AQP5, insan, sıçan ve farenin ter bezlerinin apikal yüzeyinde fazlaca ifade edilir. Fazla terleme bu sayede önlenir.

AQP6: AQP2 ve AQP5'e benzemesine rağmen fonksiyonel farklılıklar içeren AQP6'lar minimum düzeyde su geçirgenliği gösterir.

AQP7: Proksimal tubulde bulunmuştur. Bu bölgede yağ metabolizmasına etki ettiği düşünülür. İçinde AQP7'nin de bulunduğu aquagliseroporinlerin açlık halinde gliserol taşıyıcısı olarak görevleri çok önemlidir. AQP7 adipoz dokuda trigliseritlerin indirgenmesi sonucu oluşan gliserol için çıkış oluşturarak su ve gliserol geçişini sağlar.

AQP8: Sindirim sistemi boyunca çeşitli yerlerde, testislerde ve kalpte bulunur.

AQP9: Karaciğer, testis, beyin ve beyaz kan hücrelerinde bulunan AQP9 gliserol ve su gibi küçük yüksüz yapıların geçiş kanallarıdır. Hepatositlerde AQP-9 bir gliserol kanalı ve ürenin diffüzyonunu arttıran proteindir. Karaciğerde gliserol açlık dönemindeki glukoneogeneze katılır. Gerçekten 4 günlük açlıktan sonra AQP-9'un ekspresyonunda belirli yükselme izlenmekte, tekrar beslenme sonrası düzeyi düşmektedir.

AQP-9'un beyin metabolizmasına bir metabolit kanalı olarak katıldığı öne sürülmüştür. Asidik ortamda laktik asite olan geçirgenlik artar ve beyin iskemisi sırasında oluşan laktik asidoz, AQP-9'un aşırı miktarda olan laktik asiti astrositlerden uzaklaştırılmasını hızlandırır. Sonuç olarak, iskemi sırasında AQP-9 ekstrasellüler boşluğu laktat ve gliserolden temizlemektedir. Reperfüzyon döneminde AQP-9 astrositler ve nöronlar arasındaki laktik asit transportunu kolaylaştırarak, laktik asitin enerji substratı olarak kullanılmasını sağlar. Beyindeki AQP-9 fonksiyonu ile ilgili bu hipotez hala spekülatiftir(52,53).

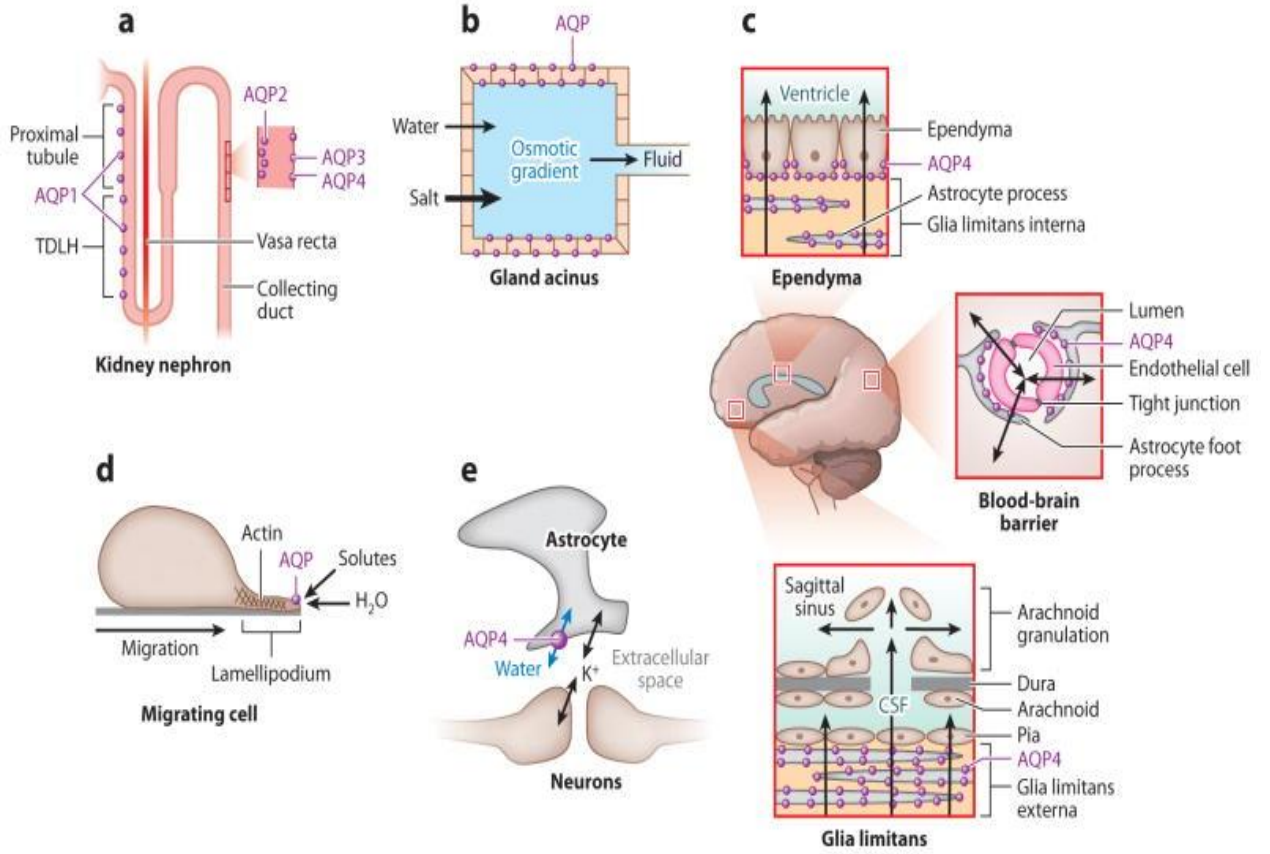
Benzer şekilde, preeklampsi gibi, yüzeysel implantasyona bağlı gelişen fetomaternal hipoksi ile karakterize olan plasental patolojilerinde, AQP-9'un enerji dengesine dahil olduğu düşünülmektedir(54).

Ayrıca fetal membranlarda ve plasental sinsityotrofoblastlarda bol miktarda bulunur.(54-57).

Akuaporin 9 kanallarının üre diffüzyonunda olan rolü de önemlidir. Plasentada A tipi "üre taşıyıcı" (UT-A) bulunduğu tespit edilmiştir. AQP-9 UT-A'nın fonksiyonunu tamamlayıp, üre "uptake" ve plasentadan elimine edilmesini sağlar(58).

AQP11: AQP11'in böbrekte ve karaciğerde ifade edildiği bilinmektedir ama tam olarak görevleri anlaşılamamıştır.

AQP12: Pankreasta ifadelenen AQP12'nin hangi yapı ve maddelere geçirgen olduğu bilinmemektedir.



Resim 10: Akuaporinlerin vücutta lokalizasyonları

2.7.4. Göbek Kordonu Ve Fetal Membranlarda Akuaporinler

Akuaporinlerin fetal gelişim sürecinde de önemli görevleri vardır. Plasenta ve fetal membranlar arasında sıvı alışverişi, deri keratinizasyonundan önce amniyotik sıvı oluşumu, normal beyin gelişiminde serebrospinal sıvı oluşumu ve akciğer gelişimi esnasında sıvı sekresyonu bunlardan bazılarıdır. İmplantasyon öncesinde blastosist gelişim safhasında blastosöl kavitesi, etrafını çevreleyen trofoektoderm epiteli tarafından salınan sıvı ile doludur. Akuaporin 3 ve 8, trofoektoderm basolateral membranında, akuaporin 9 ise apikal membranında baskın olarak bulunmaktadır. Gelişimin ilerleyen basamaklarında trofoektoderm, korion ve plasentayı meydana getirir. İnsan plasenta ve fetal membranlarında bugüne kadar 5 AQP (AQP 1, 3, 4, 8 ve 9) tespit edilmiştir(59)(55)(60). Gebeliğin ilk trimesterinde plasental villüslerin dış ve iç tabaka sinsityotrofoblastlarında yüksek düzeyde AQP 4 izlenmiştir(51,61). Akuaporinler sadece fizyolojik değil, çok sayıda patolojik durumda da rol oynar. Fetüsün, annenin kan

dolaşımından transplasental geçiş yoluyla temin edilen su ihtiyacı, gebelik haftası ilerledikçe artmaktadır. Gebelik ilerledikçe, plasental su akımı artışının akuaporinler aracılığı ile karşılanabileceği, AQP 1, 3, 8 ve 9'un amniotik sıvı regülasyonunda belirgin bir rol oynayabilecekleri düşünülmektedir(55).

Tablo 4: Göbek kordonu ve fetal membranlarda akuaporinlerin lokalizasyonları

Akuaporin	Lokalizasyon			
	Koryon	Amniotik membranlar	Plasental damarlar	Trofoblast
AQP 1	+	+	+	-
AQP 3	+	+	-	+
AQP 4	-	-	-	+
AQP 8	+	+	-	+
AQP-9	+	+	-	+

AQP-9'un normal ve preeklampitik plasentalarda olan fonksiyonel aktivitesi ve miktarı araştırılmış ve preeklampitik plasentada AQP-9'un miktarının arttığı, fonksiyonunun azaldığı gösterilmiştir(62). İmmünohistokimyasal yöntem AQP9'un preeklampitik plasentalarda sadece apikal bölgede değil, bazal bölgede ve sitoplazmada da yerleştiğini göstermektedir. Preeklampitik plasentalarda AQP-9'un su ve mannitol transportu için fonksiyonelliği azalmıştır. Yapılan bir deneysel çalışmada, koyunların plasentalarında, fetal zarlarda ve umbilikal kordda AQP-9 ekspresyonu plasental dokuda ve umbilikal kordda saptamayıp, fetal zarlarda ekspresyonunun olduğu saptanmıştır. Başka bir çalışmada ise koryon,amniyon ve plasentada AQP9 ekspresyonu gösterilmiş ancak göbek kordonunda gösterilememiştir.Hatta AQP9 mRNA ekspresyonunun koryonda daha yüksek, amniyonda daha düşük olduğu gösterilmiştir. (56). Başka bir çalışmada gestasyonel diyabette trofoblastik hücrelerde ve fetal membranlarda aquaporin 9 seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı gösterilmiştir(63). İnsülin, hCG(human coryonic gonadotropin), cAMP ve CFTR'nin akuaporinlerin moleküler ve fonksiyonel ifadesinin düzenlenmesinde rol oynadığı bulunmuştur(55) . Yapılan literatür taraması bize gösteriyor ki akuaporinin amniyon miktarına olan baskın etkisi göz önünde bulundurularak çalışmalar preeklamsi, oligo-polihidroamniyoz ve plasenta üzerinde yoğunlaştırılmış, vasküler komplikasyon gelişmiş pregestasyonel diyabet ve bunun göbek

kordonu ve fetal membranlar üzerindeki akuaporin miktarları üzerindeki etkisi üzerinde çalışma yapılmamıştır(62). Akuaporinlerin diyabette vaskülopatiye bağı sayıca ya da fonksiyonel olarak azalması ya da artması gebelikte komplikasyonlara ya da bebek üzerinde olumsuz etkilere sebep olabilir. Bu olumsuz etkilerin tanımlanması da tedavi ve önlemler açısından yol gösterici olacaktır. Bu nedenle amacımız bu etkileşimi araştırmaktır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda kullanılan göbek kordonları ve fetal membranlar Gaziantep Cengiz Gökçek Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi'nde doğum yapan, gebeliğinden önce diyabet hastalığı olan ve vasküler komplikasyon olarak nefropatisi tespit edilen 6 gebe, gestasyonel diyabeti olan 6 gebe ve herhangi bir hastalığı bulunmayan 6 gebe olmak üzere toplam 18 kişiden alınmıştır. Çalışmamız için güç analizi yapılmıştır ve buna göre 2 grup arasında 0,70 lik farkın (%10-%80) istatistiksel olarak anlamlı bulunması için gerekli minimum örnek genişliği her grupta 6 kişi olarak belirlenmiştir. (($\alpha=0,05$), Testin gücü=($1-\beta=0,80$))

Pregestasyonel diyabeti olan gebelerden White Sınıflamasına göre F sınıfı olan gebeler çalışmaya alınmıştır. F sınıfı renal hastalığı olan gebe kadınların %5-10'unu tanımlar. Son yapılan White sınıflamasına göre, bu grup gebeliğin ilk 20 haftasında azalmış kreatin klirensi ve/veya 24 saatte en az 400 mg proteinürisi olan hastaları içerir. Çalışmamızda; gebelerden 24 saatlik idrar toplanarak, protein değeri ölçülmüş ve 24 saatlik idrarda en az 400 mg proteinürisi olan gebeler çalışmamıza dahil edilmiştir.

Anne adayının bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu okuyup onaylamasını takiben doğum sonrası göbek kordonu plasentaya en yakın yerinden 10 cm olacak şekilde kesildi ve amniyokoryonik membranlar göbek kordonunun insertio kısmının etrafında plasentanın fetal kısmı üzerinden diseke edildi. Alınan dokular PBS ile yıkanarak bir kısmı PCR için kullanılmak üzere -80 derecede muhafaza edildi. Dokuların kalan kısmı ise formaldehite alındı. Alınan dokularla birlikte göbek kordonunun bebekte kalan kısmı ile plasental kısmının toplamının boyu ve ağırlığı hesaplandı. Plasenta ağırlığı tartıldı, bebek kilosu, boyu ölçülerek kayıt edildi. Daha sonra alınan göbek kordonu parçaları Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İleri Düzey Eğitim ve Araştırma Laboratuvarı (İDEAL)'na getirilerek ön işlem aşamalarına geçildi.

3.1.Revers Transkripsiyon ve Kantitatif Gerçek-Zamanlı (Real-Time) PCR Çalışması

Revers transkripsiyon ve real time PCR çalışmaları Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İDEAL laboratuvarında yapıldı. -80’de beklemekte olan dokulardan her bir hastanın göbek kordonu ve fetal membranları 50 mg olacak şekilde tartıldı, yuvarlak tabanlı 2 ml lik ependorflara alındı. Her bir göbek kordonu ve fetal membranın üzerine ayrı ayrı 500 μ L nükleozol (Macherey – Nagel LOT:1511/0001) eklendi. Buz bloğunun üzerine alınarak T25 digital ULTRA TURRAX (IKA) homojenizatörde homojenize edildi. Homojenizasyonun ardından, Macherey – Nagel NucleoSpin RNA/protein izolasyon kiti (LOT: 1805/001) modifiye edilmiş protokolle RNA saflaştırma basamakları uygulandı.

3.1.1.Doku homojenizasyon protokolü

1. Doku parçaları 2 mL’lik yuvarlak tabanlı tüplere alındı.
2. Doku parçasının üzerine 500 μ L nükleozol (lisis solüsyonu) eklendi.
3. İçerisinde doku ve lisis solüsyonu bulunan tüp buz içerisinde iken homojenizatör probu tüpün içine girecek şekilde homojenizatör yüksekliği ayarlandı.
4. Homojenizatörün maksimum hızında 30’ar saniyelik üç tekrar ile homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi.
5. Homojenat üzerine 200 μ L RNAaz free water çözeltisi eklendi. Karışım 15 saniye vortekslenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

Lizat oda sıcaklığında 10350 rpm’de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.

3.1.2.Dokudan saflaştırma kolonu kullanılarak RNA izolasyon protokolü

1. Süpernatanta 600 μ L %70 etanol eklendi.
2. Etanol eklenmesinin ardından oluşabilecek görünür çökeltilerin dağılması için tüp çok hafif vortekslendi.
3. Saflaştırma kolonuna örneğin 650 μ L’si aktarıldı.

4. 0°C 8450 rpm’de 30 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı ve saflaştırma kolonu aynı toplama tüpü içerisine yeniden takıldı.
5. Tüm örnek işlenene kadar adım 3 ve 4 tekrarlandı.
6. Saflaştırma kolonu yeni bir 2 mL’lik toplama tüpüne takıldı. Kolon üzerine 700 µL RA3 yıkama tamponu eklendi.30 saniye 8450 rpm’de santrifüjlendi. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı.
7. Saflaştırma kolonuna, 350 µL RA3 yıkama tamponu eklendi.2 dakika 8450 rpm’de santrifüjlendi. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı ve saflaştırma kolonu 1.5 mL’lik bir toplama tüpüne yerleştirildi.
8. Kolonda kalan etanolü uzaklaştırmak için kapağı açık bir biçimde oda ısısında 3 dakika inkübe edildi.
9. 60 µL RNaz içermeyen su saflaştırma kolonunun merkezine eklendi. Saflaştırma kolonu 1 dakika 9900 rpm’de santrifüj edildi.



Resim 11: Dokudan saflaştırma kolonu kullanılarak izole edilen RNA’lar

3.1.3.RNA ölçümü

Toplama tüpüne aktarılmış olan RNA'nın miktar ve kalitesini belirlemek için spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Multiskan® GO (Thermo Scientific) mikro-hacim spektrofotometrede izole edilen RNA'ların saflık derecesi ve konsantrasyonları belirlendi. Elde edilen RNA'lar -20°C'de saklandı.



Resim 12: Mikro-hacim spektrofotometre cihazında ölçüm için kullanılan plate ve mikro-hacim spektrofotometre cihazı

3.1.4.RNA'dan komplementer DNA (cDNA) eldesi

İzole edilen RNA'nın cDNA'ya çevrilmesi için A.B.T.TM cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity) kullanıldı. İşlemler kit protokolünün önerdiği şekilde uygulandı.

3.1.5.Revers transkripsiyon kit protokolü

1. Buz üzerinde kalıp RNA ve kit bileşenleri çözdürüldü.
2. Tablo 5'e göre revers transkripsiyon ana karışımı buz üzerinde hazırlandı.

Tablo 5: Revers transkripsiyon ana karışımı içeriği

20 µL cDNA Karışımı İçin	Volüm
10X Reaction Buffer	2 µL
dN P mix (2.5 mM each)	1 µL
	2 µL

Random hexamer (50 μ M)	
Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	1 μ L
RNase Inhibitor	0,5 μ L
RNase free Water	3,5 μ L
RNA Template	10 μ L

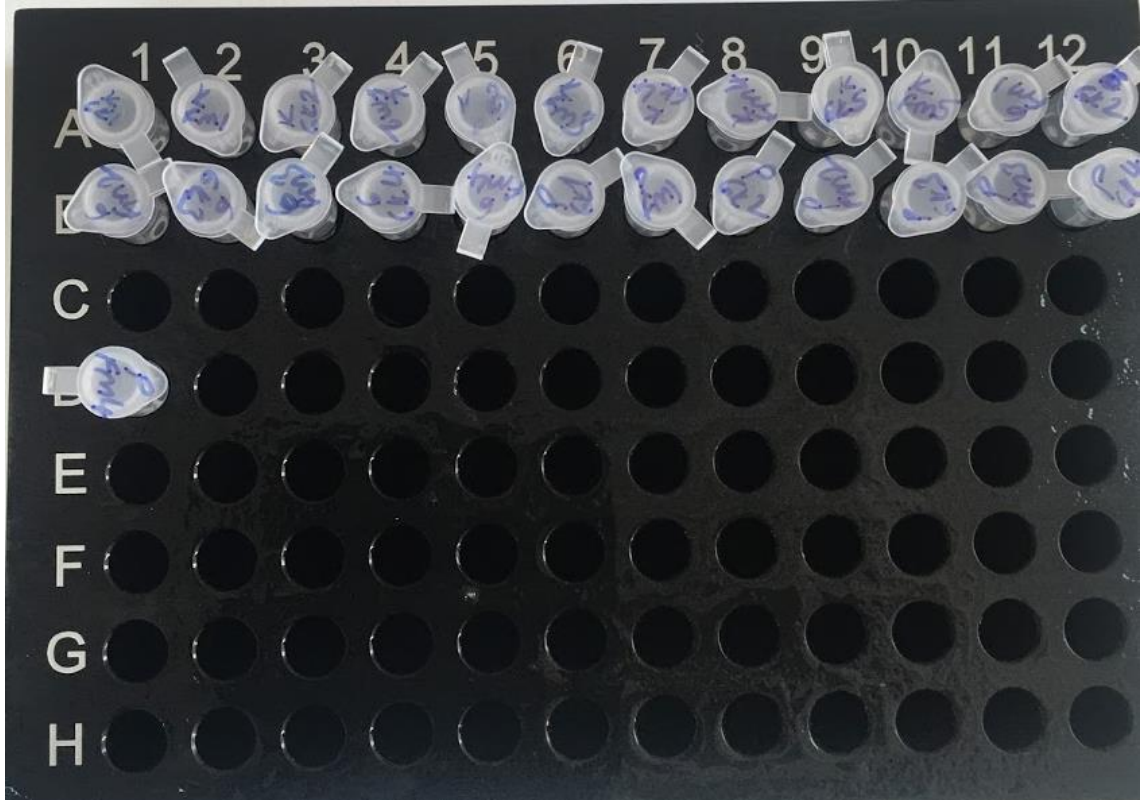
3. Tek bir reaksiyon için hacim 20 μ L'ye ayarlandı. 10 μ L RT ana karışımının üzerine 10 μ L RNA örneği eklendi. Karıştırmak için iki defa aşağı yukarı pipetaj yapıldı ve tüpün kapağı kapatıldı.

4. Hava kabarcıklarını yok etmek ve içeriği döndürmek için tüp kısaca santrifjlendi.

5. Tablo 6'ya göre termal döngüleyici protokolü uygulandı.

Tablo 6: Termal döngüleyici protokolü

	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık($^{\circ}$ C)	25	37	85	4
Zaman (dakika)	10	120	5	∞



Resim 13: İzole edilen RNA dan elde edilen cDNA

3.1.6.Kantitatif Gerçek Zamanlı (Real Time qPCR) PCR analizi

Real time PCR reaksiyonu, DNA bağlayan boyaların kullanımı ile amplifikasyonun eş zamanlı olarak takibine olanak sağlar. Bu amaçla; Akuaporin 9 proteininin ekspresyon analizi için RT² SYBR Green qPCR Master Mix (Qiagen, LOT: 76301612) kullanıldı.

Tablo 7: qPCR kit bileşenleri

Bileşen	Hacim (μl)
RT ² SYBR Green qPCR Master Mix	2 x 1,35 μL

qPCR ön karışımının hazırlanması

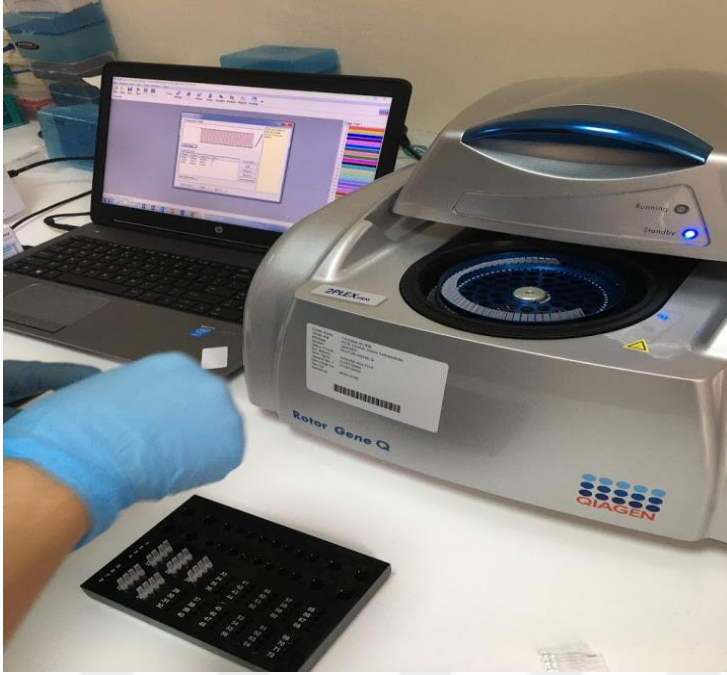
1. Ana karışım hazırlanırken kullanılacak tüm bileşenlerin buz üzerinde erimesi beklendi. Çözülmeden sonra bileşenler kısaca santrifüjlendi.

2. qPCR işlemi için cDNA hariç Tablo 8’de verilen bileşenler eklenerek, reaksiyon ana karışımı hazırlandı.

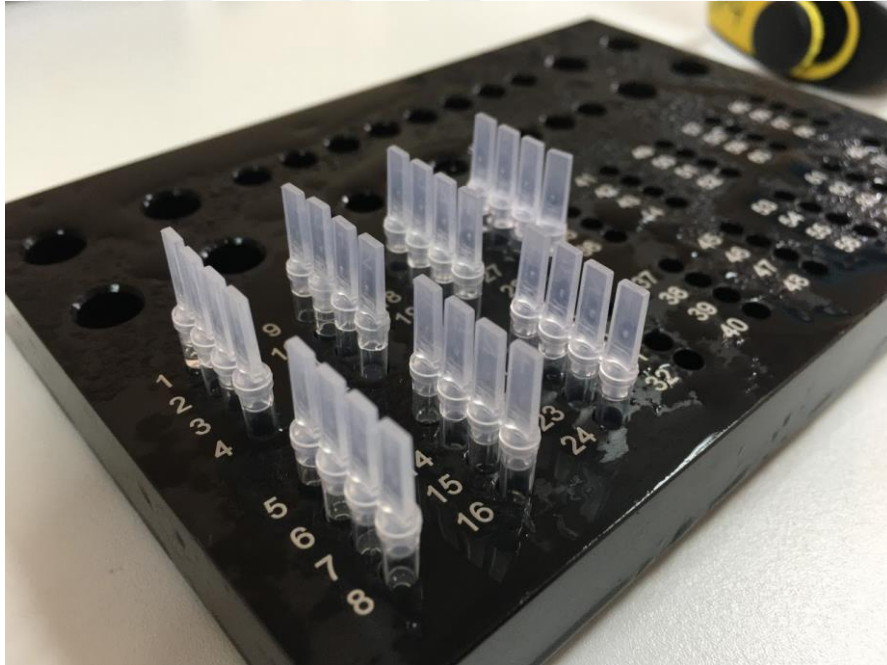
Tablo 8: qPCR karışımı

Bileşen	Hacim (µl)
SYBR green	12,5
Forward + Reverse primer	1
RNase free water	6,5
cDNA	1

Hazırlanan karışım 20 µl olacak şekilde uygun tüpe aktarıldı ve her örneğe ait 1 µl cDNA, qPCR ön karışımı içeren tüplere eklendi. Bileşenler buz üzerinde yavaşça karıştırıldı ve Rotor Gene Q (QIAGEN) (Resim 14) cihazına yüklendi. Bilgisayarda uygun reaksiyon koşulları ayarlanarak (Tablo 9) cihaz çalıştırıldı.



Resim 14: qPCR cihazı ve bağılı olduğu bilgisayar sistemi



Resim 15: Real time PCR işleminin gerçekleşeceği cDNA tüpleri

Tablo 9: qPCR işlemini gerçekleştirmek için cihaz protokolü

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	10 dk	40
Denatürasyon	94	15 sn	40
Bağlanma	60	60 dk	40

RealTime PCR sonrasında elde edilen Ct değerleri (threshold cycle) için Excel tablosu yapıldı. Bu Excel tablosun yüklendiği GeneGlobe Veri Analizi Merkezinde, kontrol ve kat değişim kriteri olarak ACTB (beta aktin) referans geni kullanıldı ve ham veri normalizasyonu ile $\Delta\Delta CT$ yöntemine dayalı gerçek zamanlı PCR verileri analiz edildi.

3.2.Histopatolojik İnceleme

3.2.1.Işık mikroskobu için dokuların hazırlanması

Göbek kordonu ve fetal membranlar % 10'luk formaldehit çözeltisi içinde fikse edildi. Fikse olup sertleşen dokulardan enine olacak şekilde yaklaşık 0,5 cm'lik parçalar alınarak kasetlere koyulduktan sonra kodlandı. Doku takip işlemleri manuel olarak Tablo 10'daki protokole gerçekleştirildi. Takip işlemi tamamlanan dokular parafin bloklara gömüldü.

Tablo 10: Işık mikroskobik doku takip protokolü

İşlem ve Kimyasal	Süresi
Akan su	1 gece
%60'lık Alkol	30 dakika
%70'lik Alkol	30 dakika

%80'lık Alkol	30 dakika
%90'lık Alkol	30 dakika
%100'lük Alkol	1 saat
%100'lük Alkol	1 saat
Ksilen + Alkol	1 saat
Ksilen I	30 dakika
Ksilen II	30 dakika
Parafin I	1 saat
Parafin II	1 saat
Gömme	

3.2.2.Kesitlerin Alınması ve Boyanmaları

Leica RM 2245 mikrotomunda parafin bloklardan 4-5µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler 1 gece etüvde bekletildikten sonra Hematoksilen-Eozin / H-E boyaması uygulandı.

Tablo11: Hematoksilen-Eozin / H-E boya protokolü

İŞLEM VE KİMYASAL SÜRESİ	İŞLEM VE KİMYASAL SÜRESİ
Ksilen	30 dk - 1 sa
Azalan alkol serileri (%100, %90, %80, %70)	3'er dk
Distile su	3 dk
Hematoksilen	20 dk.
Akar çeşme suyu	15 dk
Distile su	2 dk.
Eozin	5dk

Distile su alkala	Distile su alkala
Artan alkol serileri (%90, %96, %100).	2’şer dk
Ksilen	1 sa
Kapatma	Kapatma

3.2.3. Göbek Kordonu apı ve Damar Duvar Kalınlıklarının Ölçülmesi

Göbek kordonu damar duvar kalınlıkları ImageJ 1.51K Analiz Programı yardımı ile Leica DM 750 ışık mikroskobu ile incelenerek ölçüldü. Her grupta 10x ve 4x’lik büyütmelelerde, her bir damar duvarının kalınlığı 4 farklı yerden ölçölüp ortalamaları alınarak kayıt edildi.

Göbek kordonu çapı ve damar çapları ise 4x’lik büyütmede görülen her bir alanı 0,5 cm olarak hesaplayıp en geniş çap ve en dar çapın ortalaması alınarak, ölçümleri kayıt edildi. Damar lümen çapları da yine aynı yöntemle, en geniş ve en dar çapların ortalama ölçüleri alınarak hesaplandı.

3.2.4. Göbek Kordonu ve Metal Membranların İmmünohistokimyasal İncelenmesi

Göbek kordonu ve fetal membranlarda akuaporin 9 proteini varlığını immünohistokimyasal olarak göstermek için anti akuaporin 9 antikoru kullanıldı.

Bloklanmış dokulardan Leica RM 2245 (Almanya) mikrotomunda 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak pozitif şarjlı lamlara yerleştirildi ve bir gece 60 °C etüvde bekletildi. İmmünohistokimyasal incelemenin diğer basamakları şu şekilde uygulanmıştır:

1. Lamlar deparafinizasyon işlemi için 1 saat ksilende bekletildikten sonra azalan alkol serilerinden geçirildi ve rehidrate etmek için distile suda birkaç dakika bekletildi.
2. Dokuların üzerine, %3 Hidrojen Peroksit (H₂O₂) çözeltisi damlatılarak 15 dk bekletildi.
3. Dokuların etrafı PAP Pen ile çerçeveslendi.
4. 2x5 dk PBS ile yıkama yapıldı.

5. Antijen kurtarma aşaması için lamalar tripsin damlatılarak oda ısısında 10 dk bekletildi.
6. 4x5 dk PBS ile yıkama yapıldı. O esnada -20°C' de bekleyen primer antikor hazırlandı.
7. Dokular oda ısısında 4 dk protein blokta bırakıldı.
8. Dokular 1/500 oranında dilüe edilmiş primer antikorla oda ısısında 2 saat sıcak su dolu küvette inkübe edildi.
9. 4x5 dk PBS ile yıkama yapıldı.
10. Dokulara 10 dk biyotinlenmiş sekonder antikor uygulaması yapıldı.
11. 4x5 dk PBS ile yıkama yapıldı.
12. 10 dakika straptavidin peroksidaz uygulaması yapıldı
13. 4x5 dk PBS ile yıkama yapıldı.
14. Dokular 1-2 dk taze olarak hazırlanmış DAB kromojen (kahverengi renk görülene kadar) ile boyandı.
15. 1 kere PBS ile yıkama yapıldı.
16. 2x5 dk distile sudan geçirildi.
17. 5 dk Mayer's Hematoksilende bekletildi.
18. Lamalar önce musluk suyu, sonra distile sudan geçirilerek yıkandı, artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi.
19. 30 dk ksilende bekletildikten sonra ksilen bazlı kapatma maddesiyle kapatma yapıldı.

3.3.İstatistiksel değerlendirme

Çalışmadan elde edilen AQP-9 değerlerinin gruplara göre normal dağılım testi Kolmogorov-smirnov ve Shapiro Wilk testleri ile yapılmıştır. Verilerin gruplara göre normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir ($p>0,05$). AQP9 değerlerini çalışma gruplarına göre karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Buna ek olarak AQP-9 değerlerinin göbek kordonu ve fetal membran gruplarına göre karşılaştırmada bağımsız örneklem t testi kullanılmıştır. Analizler SPSS 22.0 programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. $P<0,05$ anlamlılık seviyesi seçilmiştir.

BULGULAR

4.1. Demografik veriler

Çalışmamızda gebelerin ve bebeklerin demografik verileri karşılaştırmalarında, her grupta gebelerin ortalama yaşı ve gebelikte aldığı kilo açısından gruplar arası anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. ($p=0,175$, $p=0,386$). Bebeklerin doğum ağırlığı, GK ağırlığı ve uzunluğu, plasenta ağırlıkları bakımından gruplar arası anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,621$, $p=0,113$, $p=0,608$).

Tablo 12: Çalışma hastalarının demografik özellikleri

	GDM	PGDM	KONTROL
Yaş	33	34,7	29,8
Hb(gram/dL)	11,57	12,54	11,64
HbA1C(%)	5,4	6,8	5,1
Gebelikte kilo artışı(kilogram)	11,7	7,7	10,1
Bebek Doğum Ağırlığı(gr)	3351	3184	3281
GK Ağırlığı(gr)	61	56,8	43,2
GK Uzunluğu(cm)	62,7	57,2	49,8
Plasenta Ağırlığı(gr)	657,8	619,2	604,2
Doğum Haftası	37,8	37	38,4

GDM Grubu; Gestasyonel diyabetli annelerden doğan bebeklerinin GK çapları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış tespit edilmiş, fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,191$). GK çaplarının VK-PGDM ile karşılaştırılmasında ise anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p=0,008$). GDM’li gebelerin AKŞ, HbA1c’lerinin karşılaştırılmasında ise kontrol grubu ile bir farklılık bulunmazken ($p=0,707$, $p=0,483$), VK-PGDM ile karşılaştırılmasında ise anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (Tablo 12, Tablo 13) ($p=0,002$, $p=0,001$).

PGDM Grubu; Pregestasyonel Diyabeti olup vasküler komplikasyon geliştirmiş gebelerin AKŞ ve HbA1c'leri kontrol ve GDM grubu ile karşılaştırınca anlamlı olarak farklılık tespit edilmiştir ($p=0,001$, $p=0,002$). Bu annelerin bebeklerinin GK çaplarında ise; kontrol grubu ile fark bulunmazken, GDM'li grup ile karşılaştırılmasında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p=0,191$, $p=0,008$).

Tablo 13: Demografik verilerin gruplar arası karşılaştırması

		N	Ortalama $\pm$ SD	P
Yaş†	GDM	6	33,00 $\pm$ 4,83	0,175
	VK-PGDM	6	34,71 $\pm$ 6,70	
	K	6	29,85 $\pm$ 3,18	
	Total	18	32,52 $\pm$ 5,26	
Açlık kan şekeri(mg/dl)	GDM	6	100,71 $\pm$ 40,51	0,002**
	VK-PGDM	6	194,28 $\pm$ 68,02	
	K	6	90,57 $\pm$ 33,69	
	Total	18	128,52 $\pm$ 67,15	
HbA1c(%)*	GDM	6	5,41 $\pm$ 0,69	0,001**
	VK-PGDM	6	6,85 $\pm$ 0,81	
	K	6	5,16 $\pm$ 0,36	
	Total	18	5,81 $\pm$ 0,98	
Gebelikte Aldığı Kilo(kilogram)*	GDM	6	11,71 $\pm$ 2,92	0,386
	VK-PGDM	6	7,78 $\pm$ 7,97	
	K	6	10,92 $\pm$ 4,24	
	Total	18	10,14 $\pm$ 5,48	
Bebek Doğum Ağırlığı (gr)*	GDM	6	3351,42 $\pm$ 406,42	0,621
	P	6	3184,28 $\pm$ 326,37	
	K	6	3281,42 $\pm$ 366,67	
	Total	18	3239,04 $\pm$ 358,42	
GK Ağırlığı (gr)*	GDM	6	61,00 $\pm$ 21,19	0,122
	VK-PGDM	6	56,85 $\pm$ 11,95	
	K	6	43,28 $\pm$ 13,03	
	Total	18	53,71 $\pm$ 16,99	
GK Uzunluğu (cm)†	GDM	6	62,71 $\pm$ 10,16	0,113
	VK-PGDM	6	57,28 $\pm$ 17,78	
	K	6	49,85 $\pm$ 10,54	
	Total	18	56,61 $\pm$ 13,72	
Plasenta Ağırlığı (gr)*	GDM	6	657,85 $\pm$ 87,31	0,608
	VK-PGDM	6	619,28 $\pm$ 114,39	
	K	6	604,28 $\pm$ 103,17	
	Total	18	627,14 $\pm$ 99,70	
GK çapı (cm)*	GDM	6	1,31 $\pm$ 0,27	0,027**
	VK-PGDM	6	1,031 $\pm$ 0,12	
	K	6	1,18 $\pm$ 0,06	
	Total	18	1,17 $\pm$ 0,20	

†Kruskal Wallis testi *ANOVA testi, ** $p<0,05$

Tablo 14: AKŞ, HbA1c ve GK çapları açısından gruplar arası karşılaştırma

Gruplar Arası Çoklu Karşılaştırma			
Dependent Variable			P
AKŞ	GDM	VK-PGDM	0,002*
		K	0,707
	VK-PGDM	GDM	0,002*
		K	0,001*
	K	GDM	0,707
		VK-PGDM	0,001*
HbA1c	GDM	VK-PGDM	0,001*
		K	0,483
	VK-PGDM	GDM	0,001*
		K	0,001*
	K	GDM	0,483
		VK-PGDM	0,001*
GK çap/cm	GDM	VK-PGDM	0,008*
		K	0,191
	VK-PGDM	GDM	0,008*
		K	0,123
	K	GDM	0,191
		VK-PGDM	0,123

*p<0,05

4.2. Işık mikroskopik bulgular

Çalışmamızda Kontrol, GDM ve VK-PGDM gruplarını oluşturan göbek kordonu ve fetal membranları ışık mikroskopik olarak değerlendirmek için H-E boyama yöntemi kullanıldı.

Kontrol Grubu: Göbek kordonunda Amnion zarı, WJ, ven ve arterler normal histolojik yapıda izlendi.

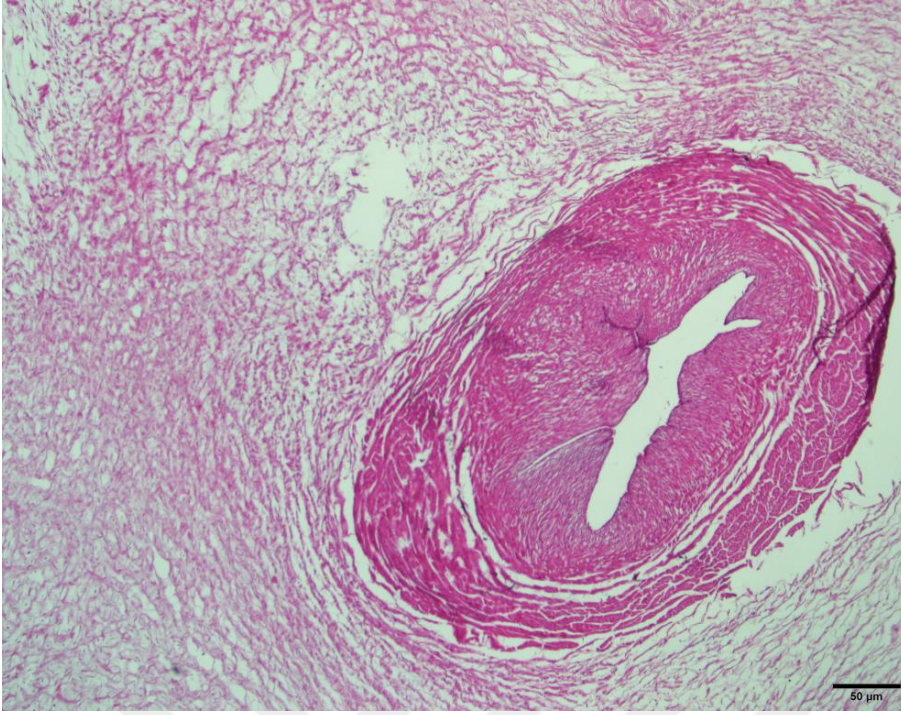
Fetal membranların amniyotik tarafını oluşturan amnion epiteli ve bazal membranı, avasküler mezenşimal tabaka; membranların koryonik tarafını oluşturan vasküler kollajenöz iç tabaka, koryonik trofoblastlar ve vasküler kollajenöz dış tabaka; ayrıca bu iki membranı birbirinden ayıran intermedier tabaka normal histolojik görünümde izlendi.

GDM grubu: Göbek kordonunda Wharton jölesi'nde demografik verileri destekleyecek şekilde göbek kordonu çapının artmasına sebep olacak ödematöz alanlar gözlemlendi (Resim 20). GK çapında artma ($p=0,027$), A1 çapında artma ($p=0,044$) istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Diğer duvar kalınlıklarında da sayısal olarak artma tespit edilirken, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,117$, $p=0,053$, $p=0,143$).

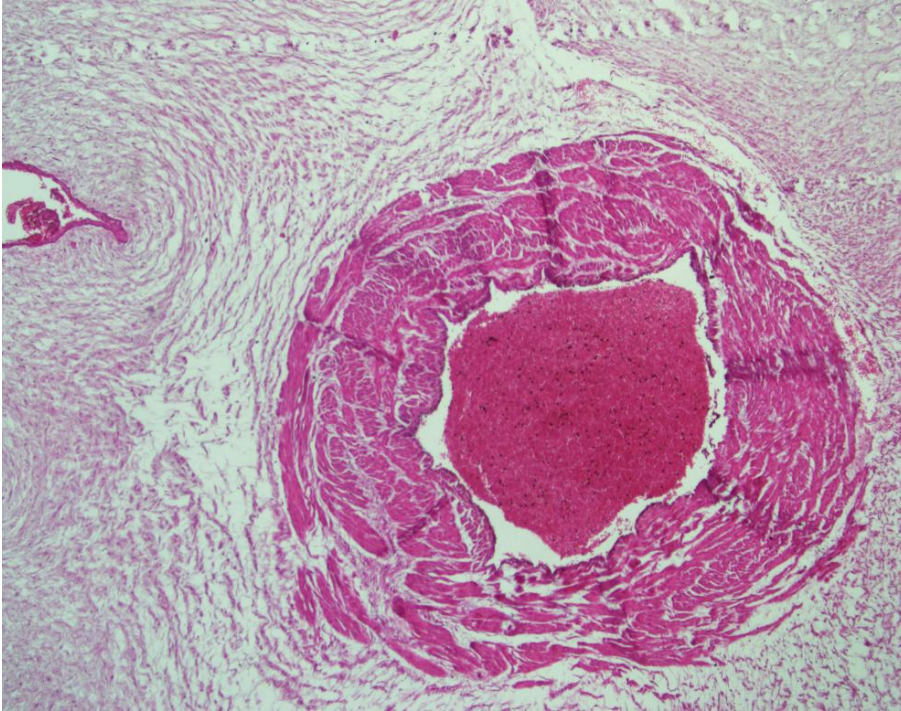
Fetal membranlarda koryonik villüs yapılarında immatürite, dejenerasyon, ayrıca villuslarda sayıca azalma gözlemlendi. Amniyon ve koryon zarı yapısında anormallik izlenmedi (Resim 23).

PGDM grubu: Diyabeti olup vasküler komplikasyonu bulunan gebelerin göbek kordonlarının incelenmesinde; amnion zarı ve damarların endoteli normal histolojik yapıda izlendi. GK çapında diğer gruplara göre azalma olduğu görülmüş, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,123$). A1 çapında artma ($p=0,027$) bulunurken, diğer duvar kalınlıklarında istatistiksel olarak fark saptanmadı ($p=0,090$, $p=0,715$, $p=0,704$).

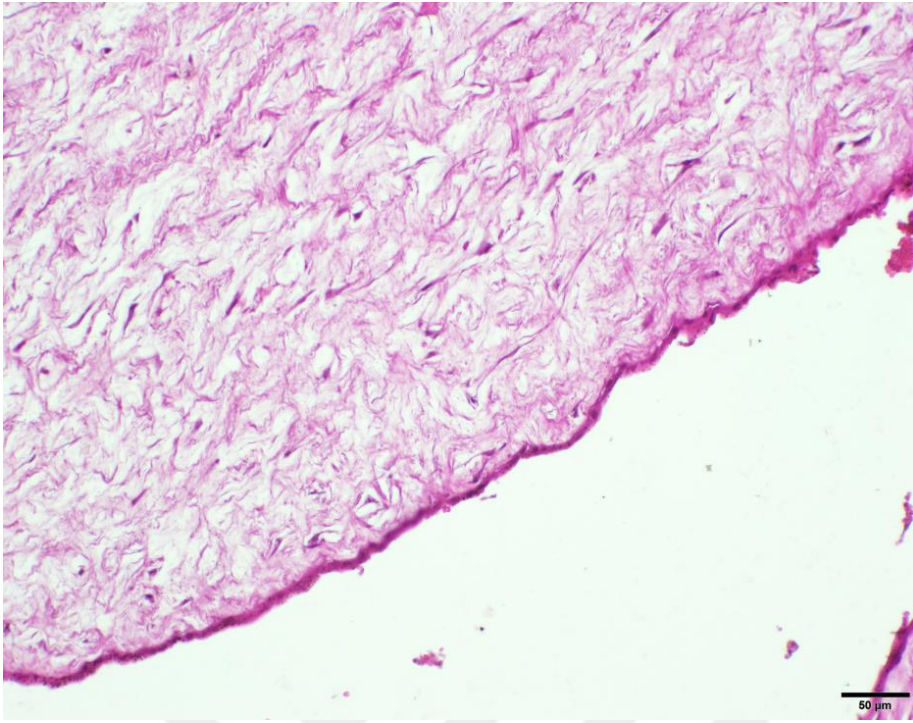
Fetal membranlarda ise GDM grubunda olduğu gibi koryonik villüs yapılarında immatürite, dejenerasyon, ayrıca villuslarda sayıca azalma gözlemlendi. Amniyon ve koryon zarı yapısında anormallik izlenmedi (Resim 28).



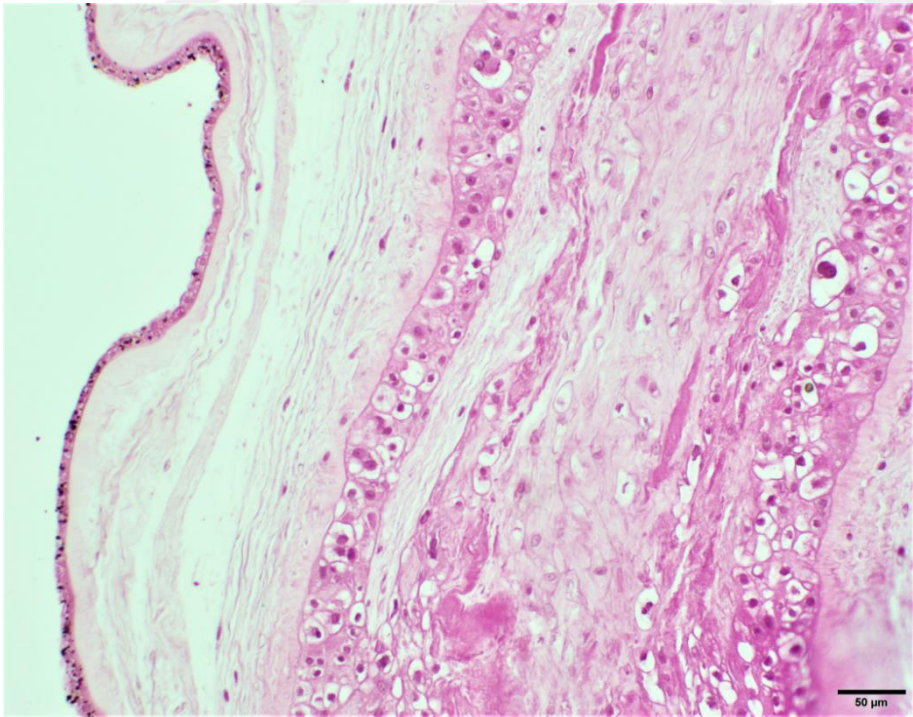
Resim 16: Kontrol grubu göbek kordonu arter (H-E 4x)



Resim 17: Kontrol grubu göbek kordonu ven (H-E 4x)



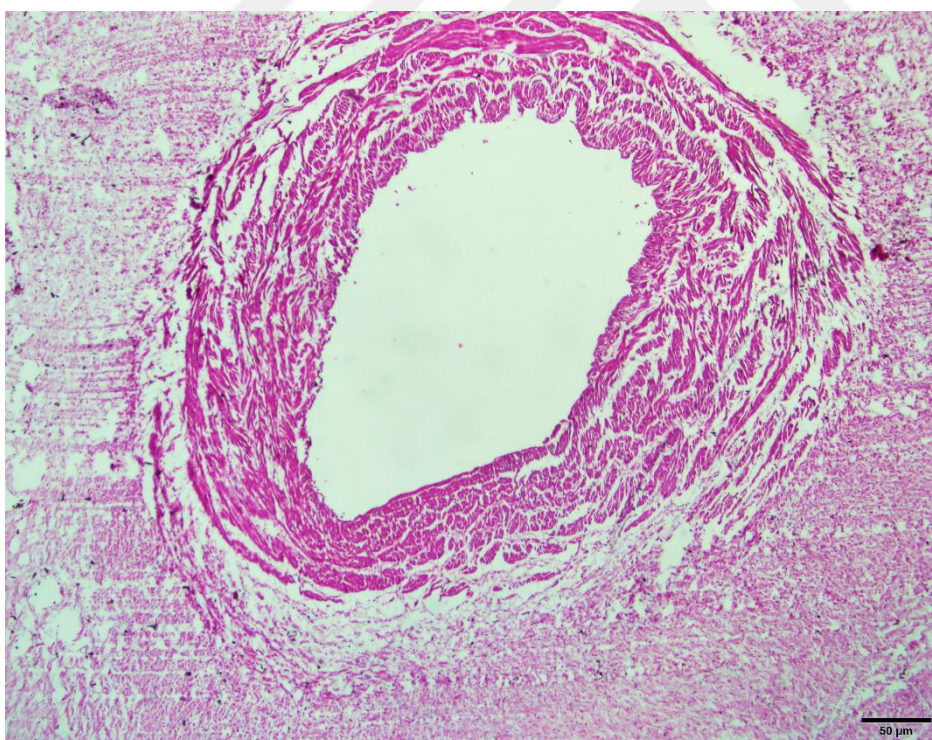
Resim 18: Kontrol grubu göbek kordonu amniyon zarı (H-E 20x)



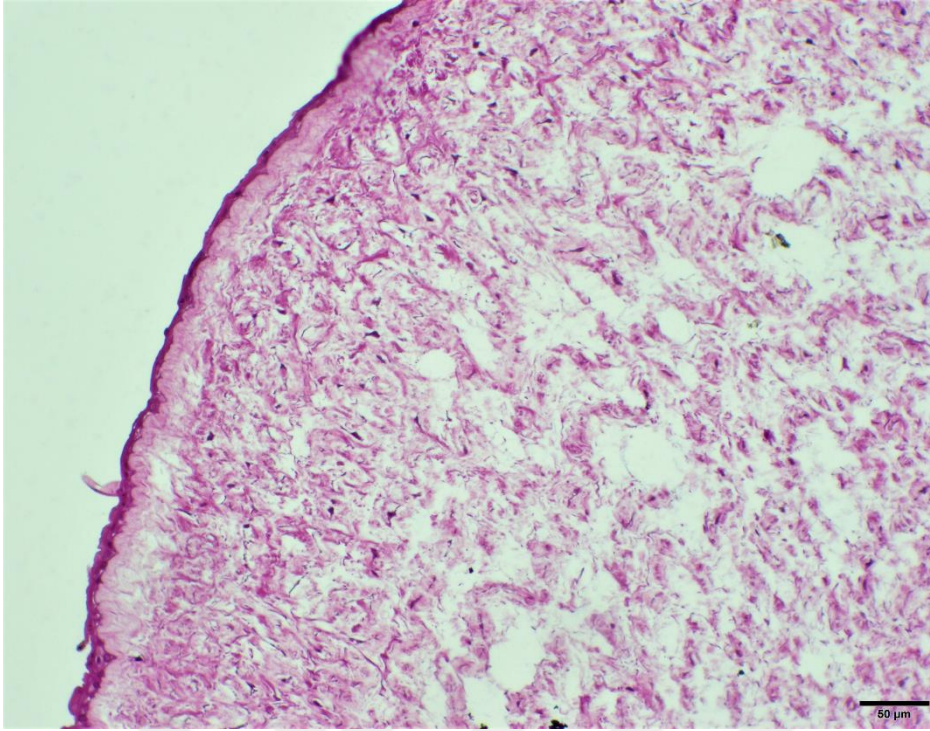
Resim 19: Kontrol grubu fetal membran (H-E 20x)



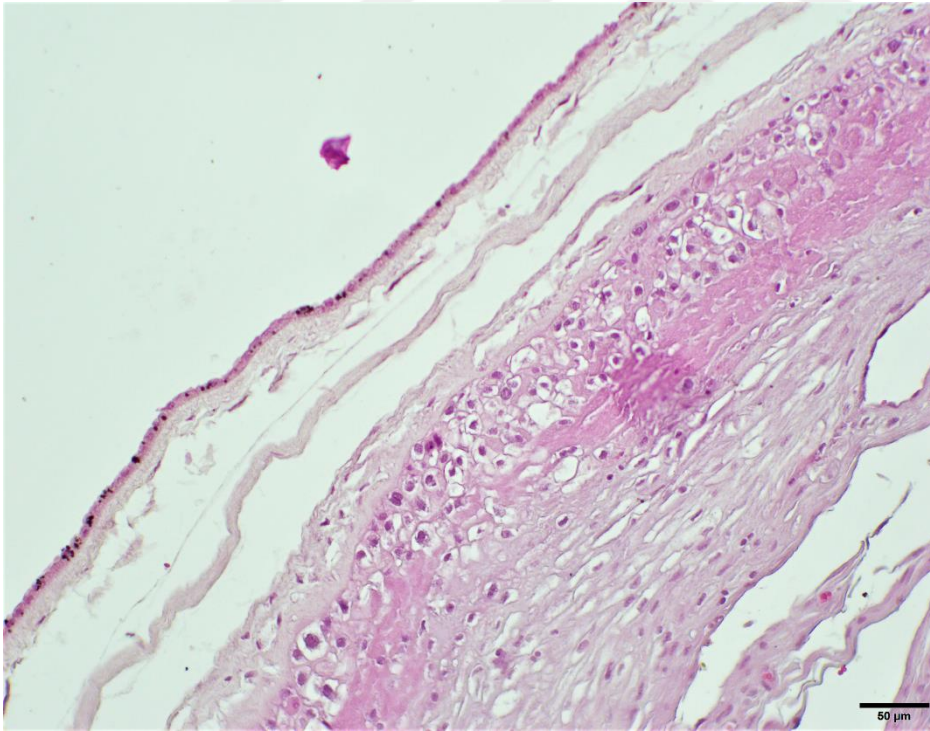
Resim 20: GDM arter (H-E 4x)



Resim 21: GDM ven (H-E 4x)



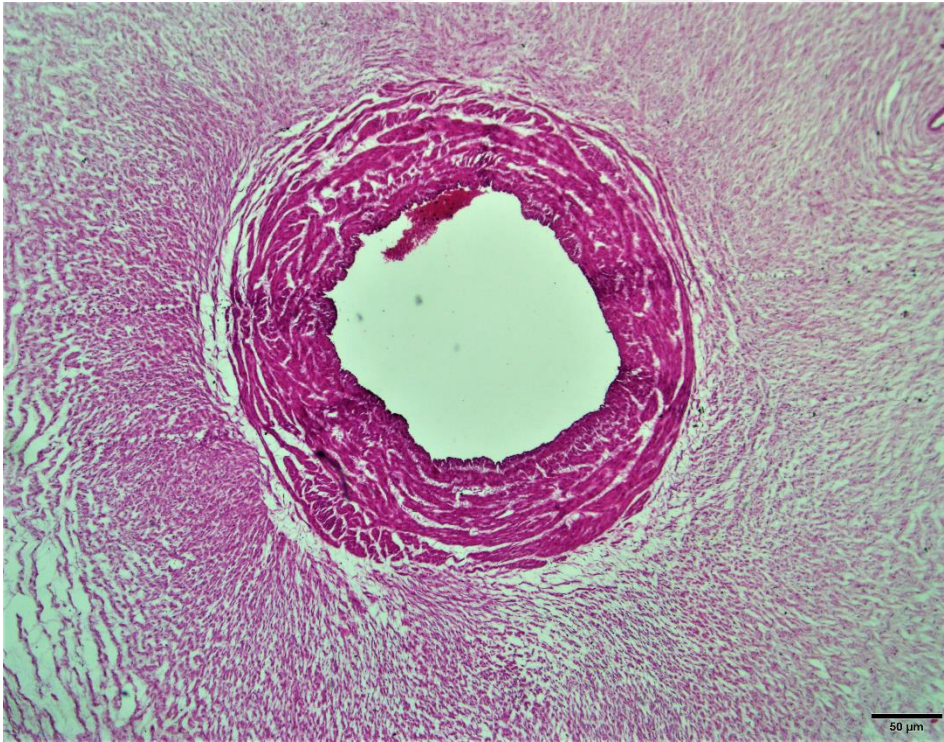
Resim 22: GDM göbek kordonu amniyon zarı ve wharton jölesi (H-E 20x)



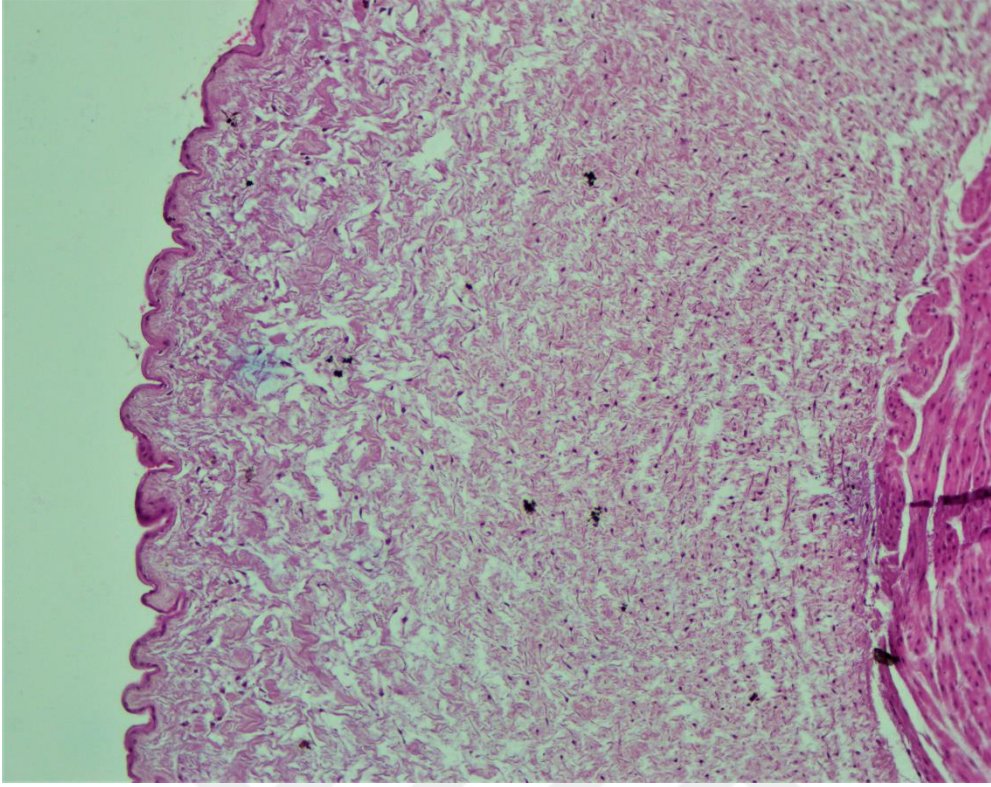
Resim 23: GDM fetal membran (H-E 20x)



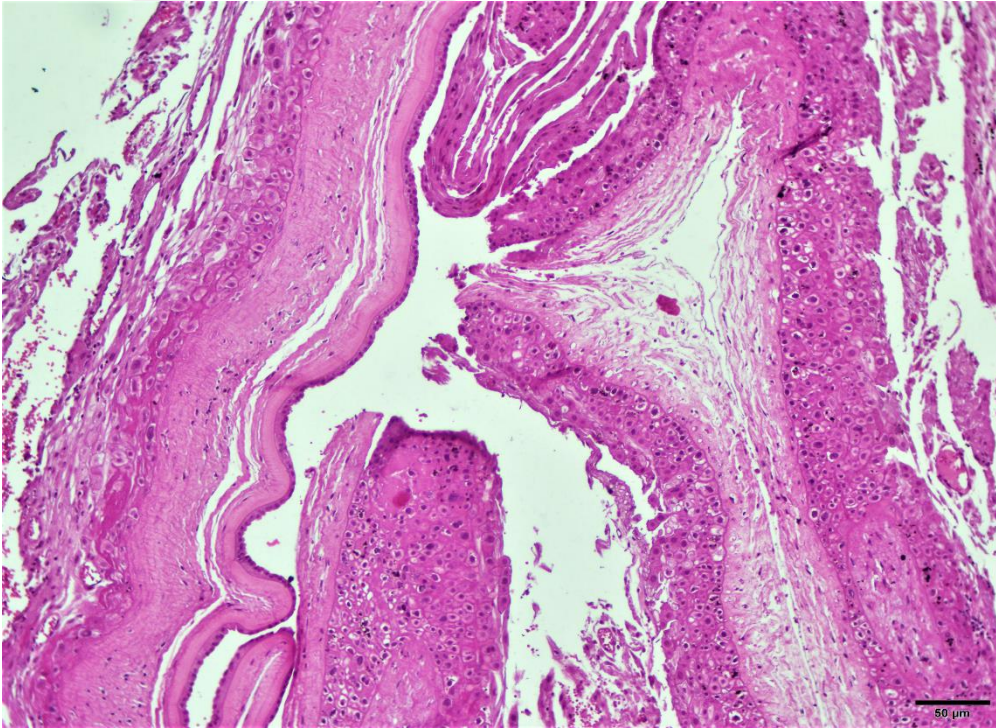
Resim 24: PGDM göbek kordonu arter (H-E 4x)



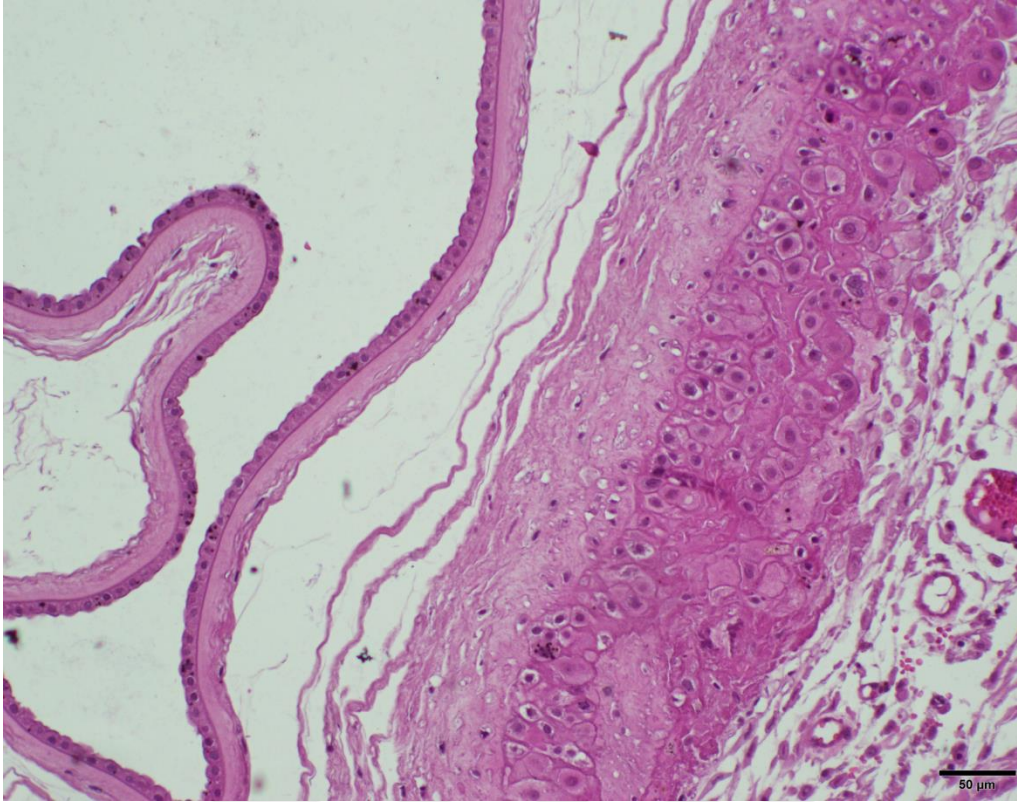
Resim 25: PGDM göbek kordonu ven (H-E 4x)



Resim 26: PGDM göbek kordonu amniyon zarı ve wharton jölesi (H-E 10x)



Resim 27: PGDM fetal membran (H-E 10x)



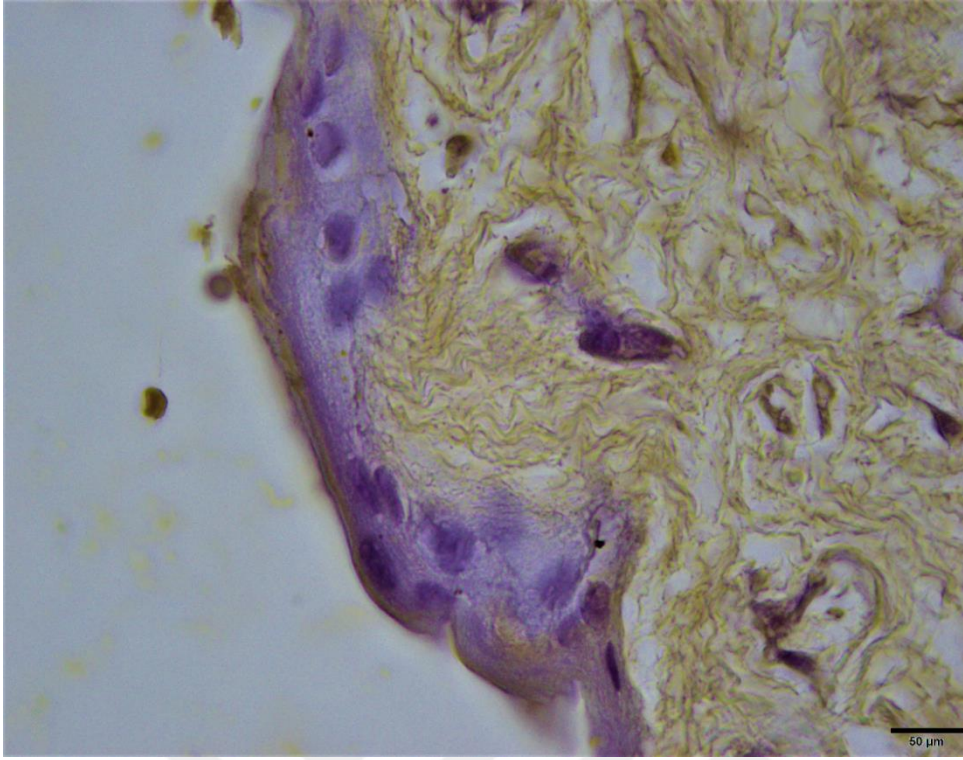
Resim 28: PGDM fetal membran (H-E 20x)

4.3. İmmünohistokimya Bulguları

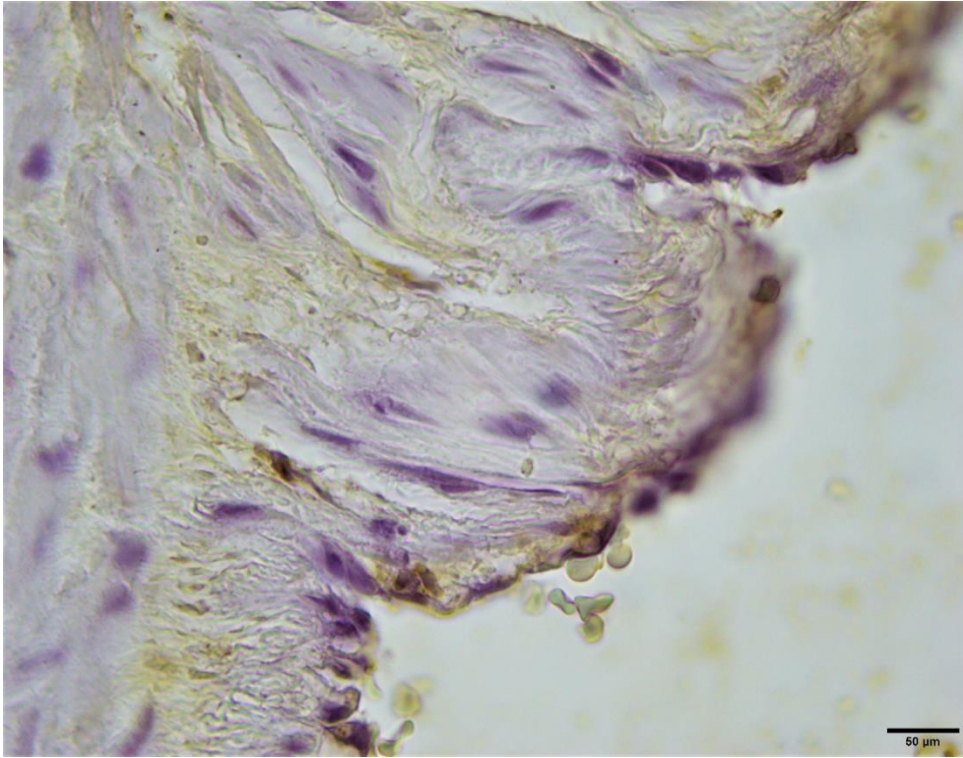
İmmün boyamada Kontrol, GDM ve PGDM gruplarının göbek kordonu ve fetal membranlarında AQP9 varlığını görsel olarak değerlendirmek için göbek kordonu ve membranlarda bulunduğu bilinen anti – AQP9 antikoru kullanıldı.

Göbek kordonu dokularında immünreaktivite beklediğimiz damar endotelleri ve amniyon zarı epitel hücreleri her üç grupta değerlendirildi. Daha önceki çalışmalarda göbek kordonunda amniyon zarının apikal bölgesinde farklı akuaporinlerin immünreaktivitesi değerlendirilmiş. Bizim çalışmamızda ise her üç grubun amniyon zarı apikal membranlarında AQP-9 immünreaktivitesi gözlemlendi ancak gruplar arasında immünreaktivite açısından bir fark saptanmadı. Ayrıca göbek kordonlarında damar endoteli de incelendiğinde tüm gruplarımızda belirgin bir immünreaktivitenin olduğu gösterildi(Resim30, Resim 34, Resim 37).

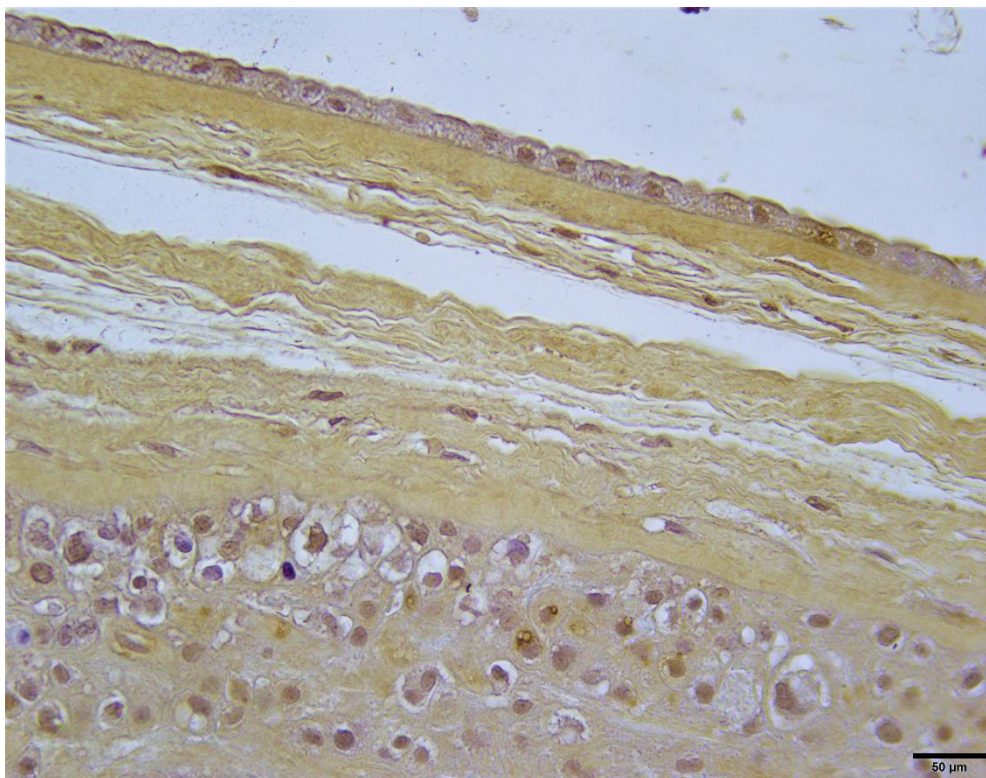
Fetal membranlarda ise gruplar arasında amniyon zarı, koryon zarı ve trofoblastları arasında immünohistokimyasal olarak bir fark gözlenmedi.



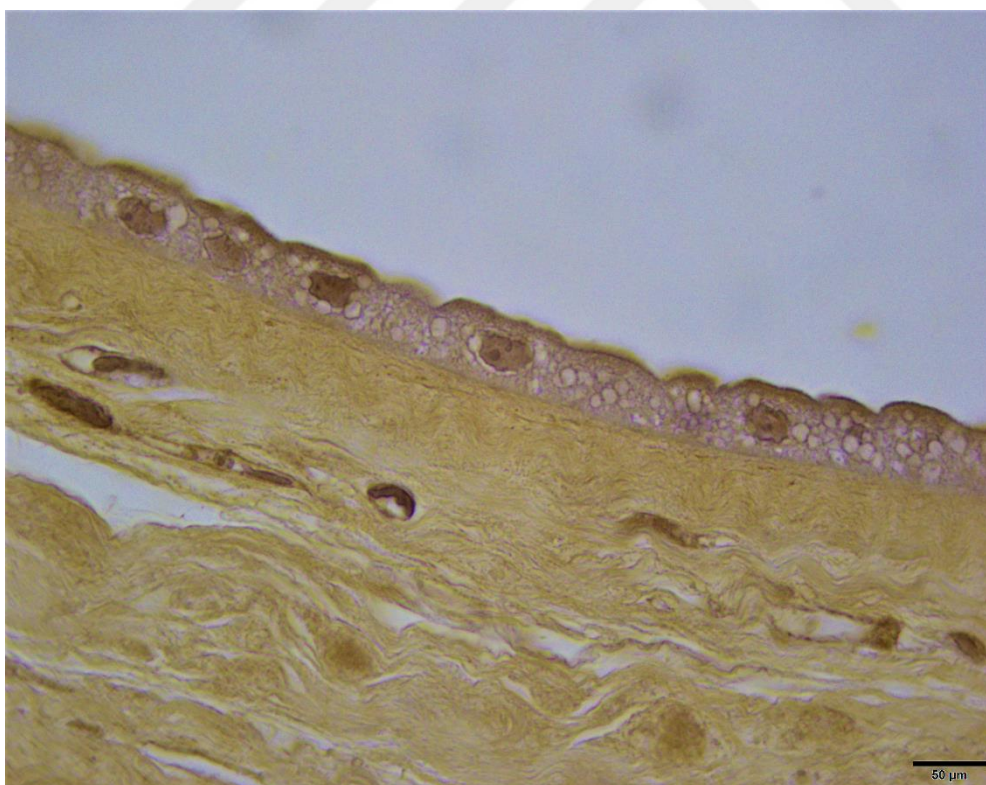
Resim 29: Kontrol grubu göbek kordonu amnion (Anti-AQP-9 100x)



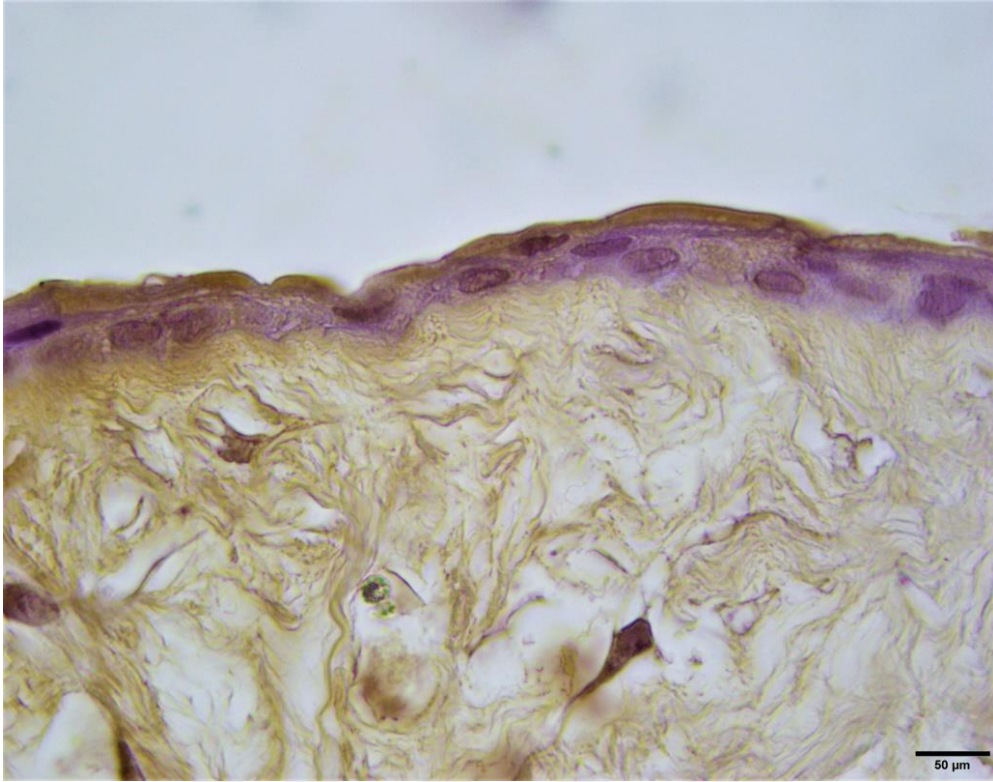
Resim 30: Kontrol grubu göbek kordonu endotel (Anti-AQP-9 100x)



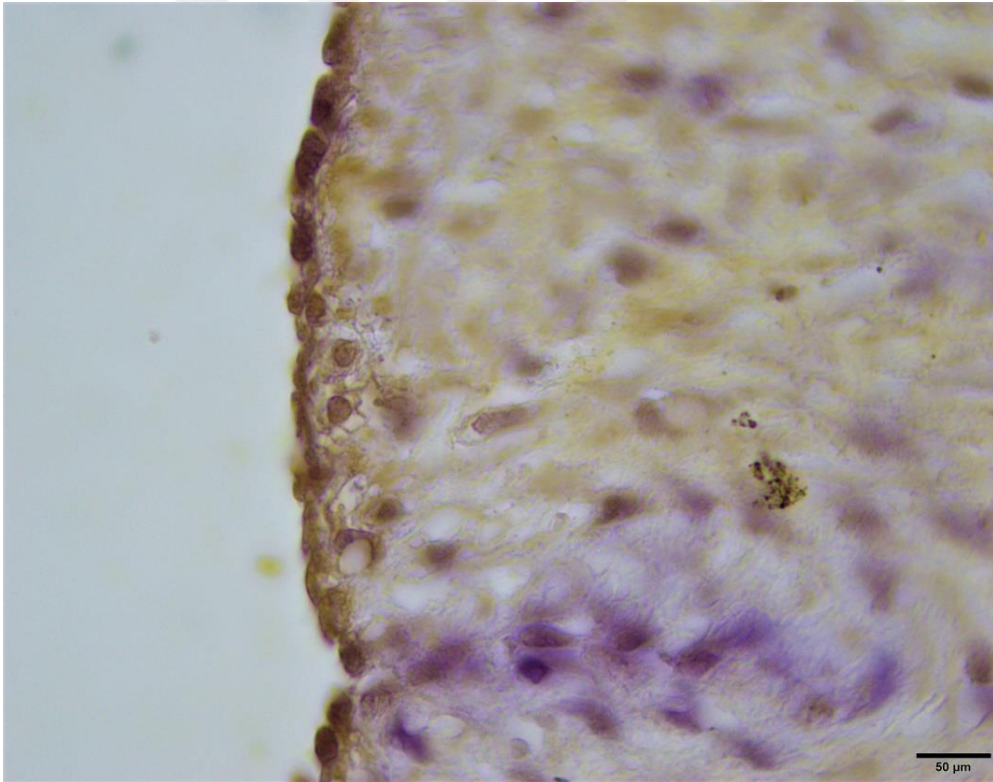
Resim 31: Kontrol grubu fetal membran (Anti-AQP-9 40x)



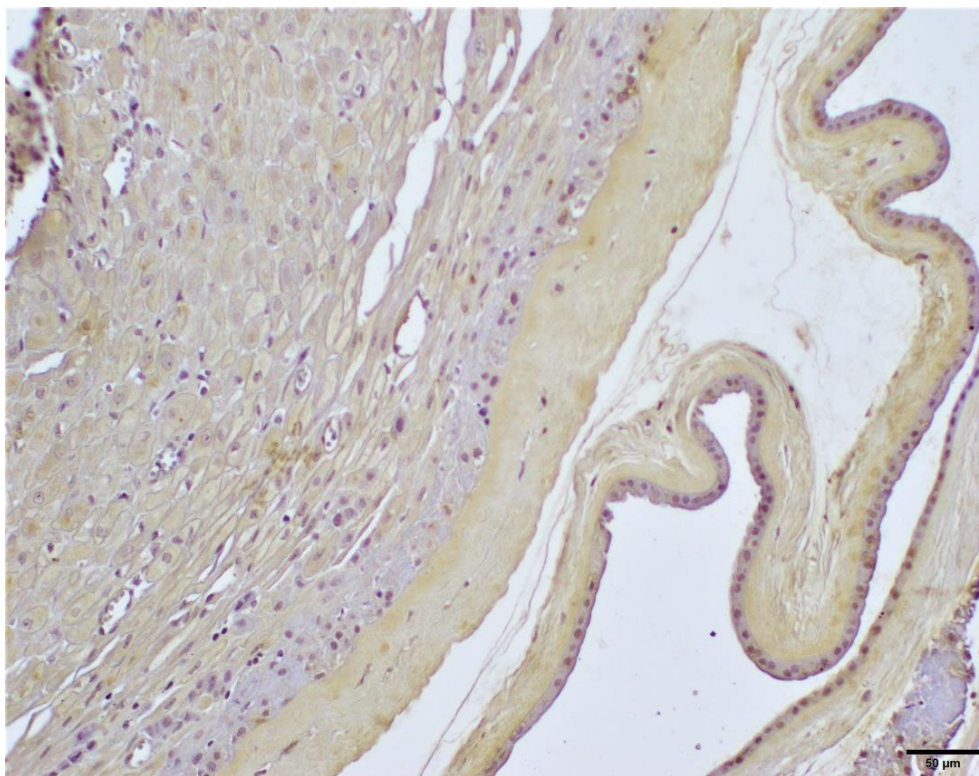
Resim 32: Kontrol grubu fetal membran (Anti-AQP-9 100x)



Resim 33: GDM göbek kordonu amniyon (Anti-AQP-9 100x)



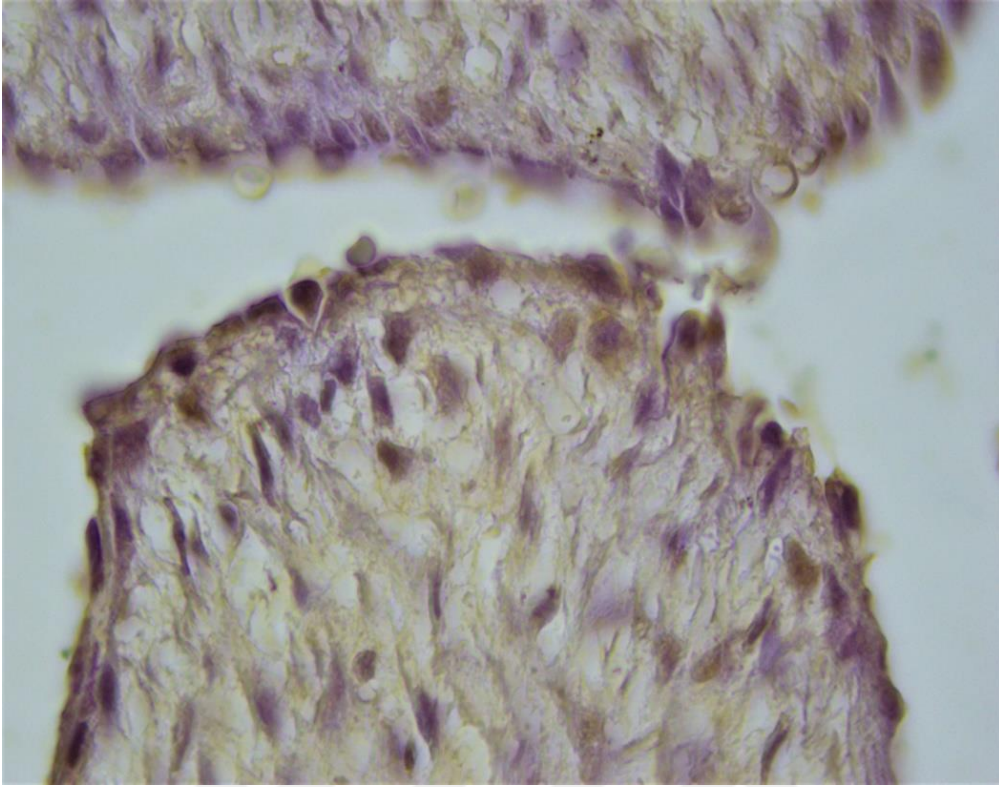
Resim 34: GDM göbek kordonu arter endotel (Anti-AQP-9 100x)



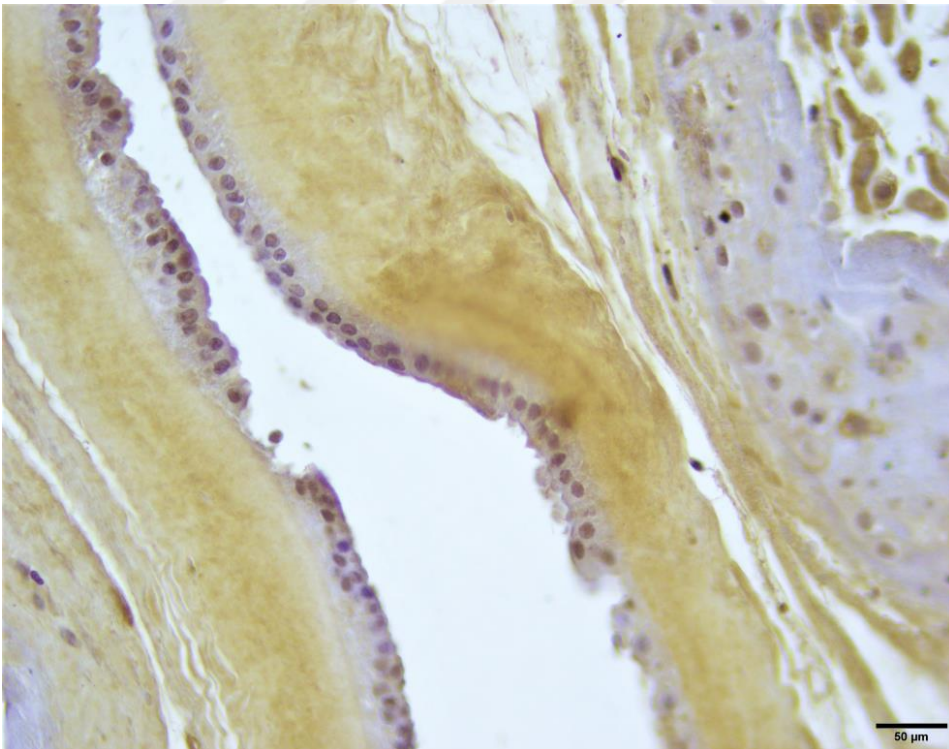
Resim 35: GDM fetal membran (Anti-AQP-9 20x)



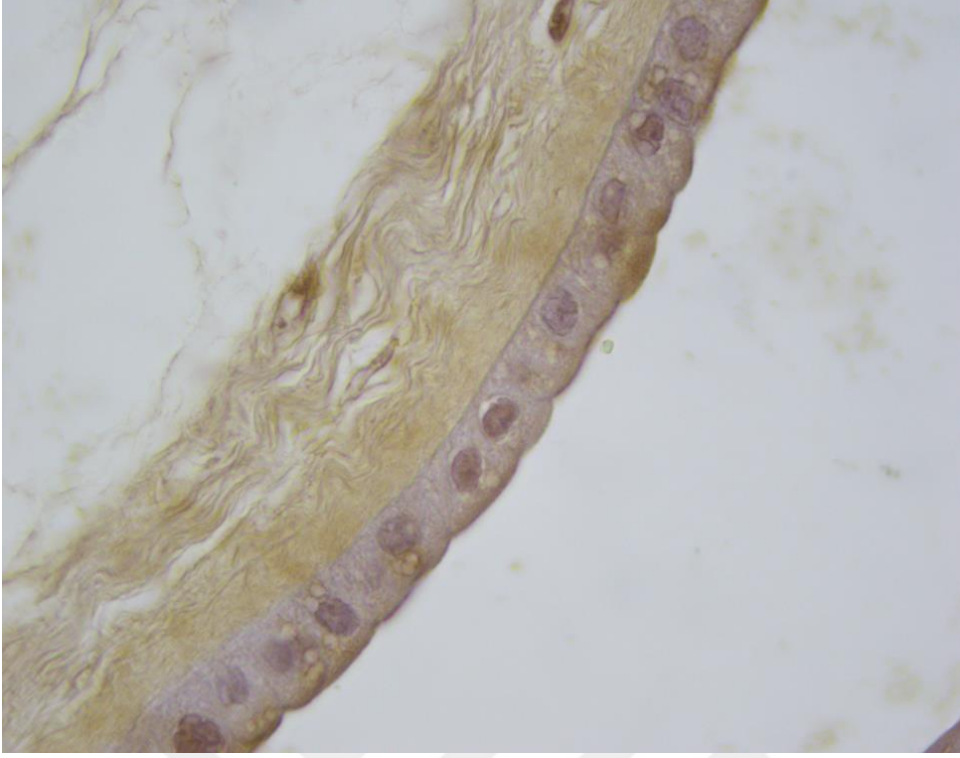
Resim 36: GDM fetal membran (Anti-AQP-9 100x)



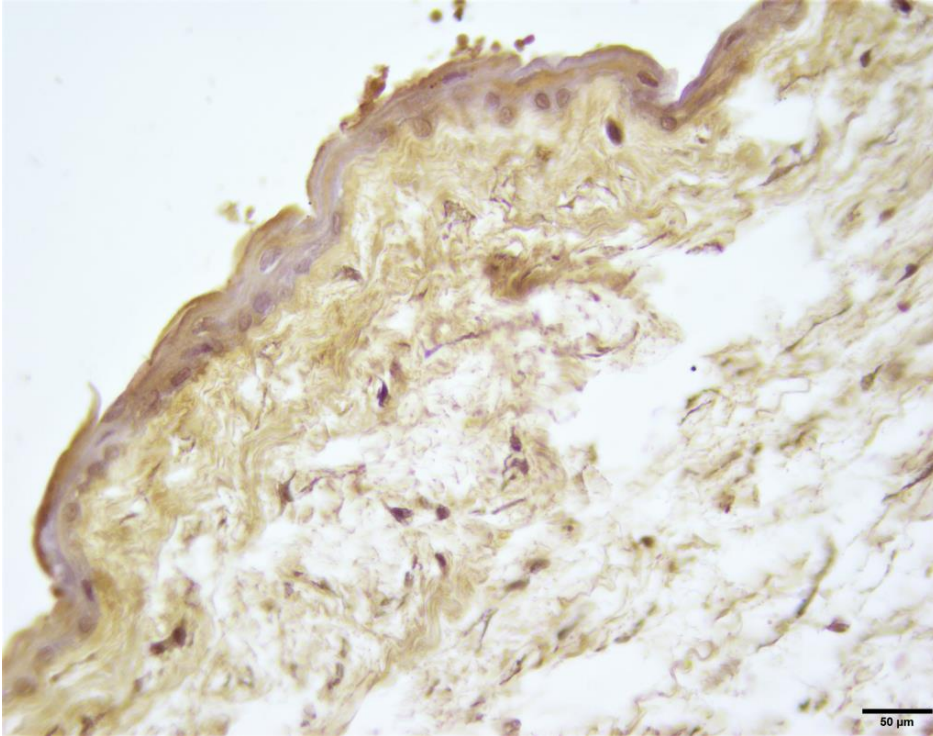
Resim 37: PGDM göbek kordonu endotel (Anti-AQP-9 100x)



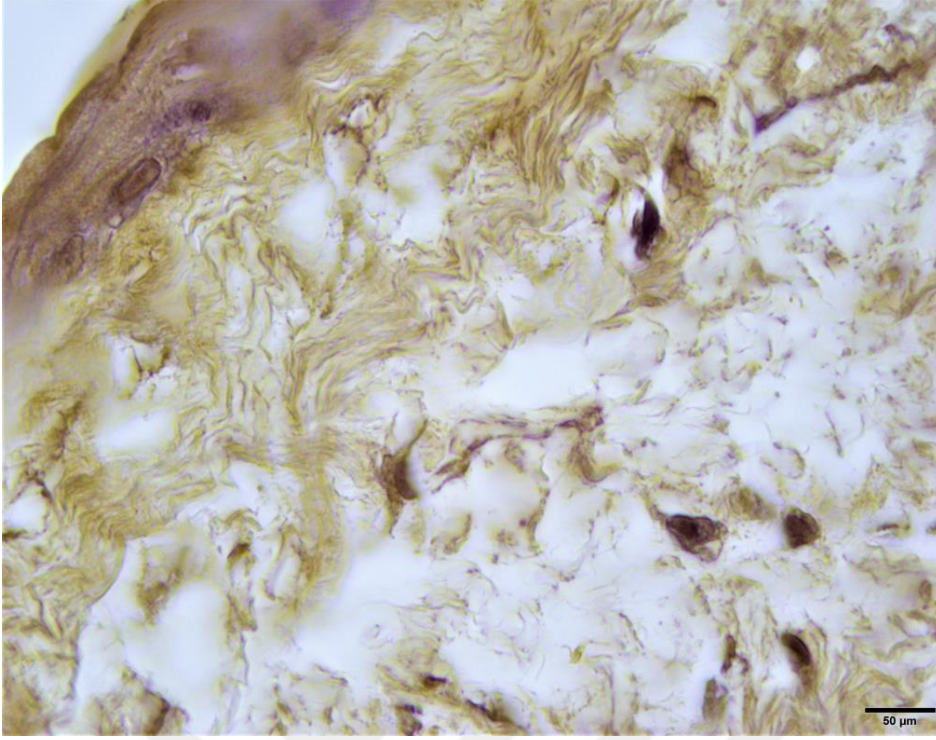
Resim 38: PGDM fetal membran amniyon (Anti AQP-9 40x)



Resim 39: PGDM fetal membran (Anti-AQP-9 100x)



Resim 40: PGDM göbek kordonu amniyon (Anti-AQP-9 40x)

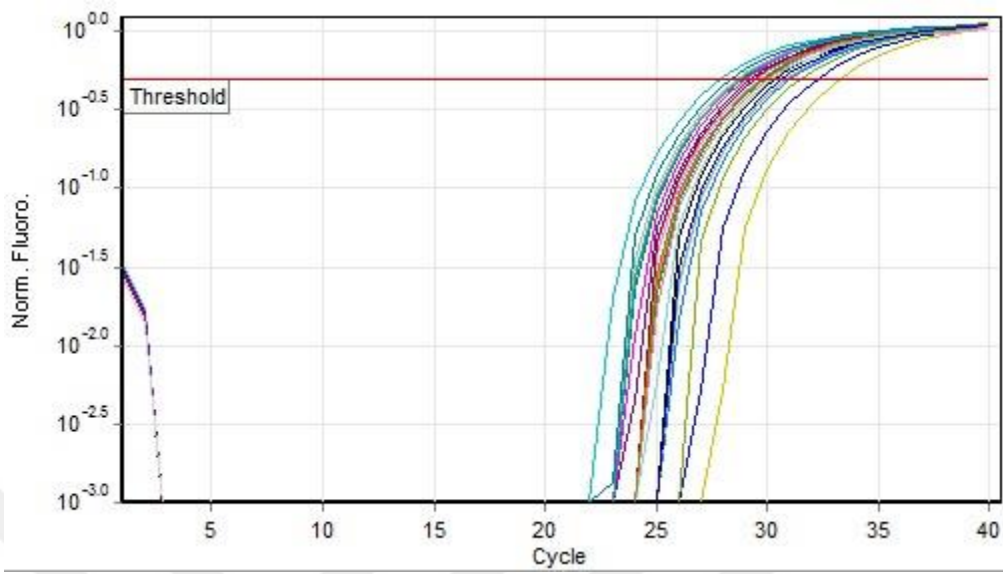


Resim 41: PGDM göbek kordonu amniyon (Anti-AQP-9 100x)

4.4. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu bulguları

qPCR çalışmasında her 3 gruptaki 6'şar hastanın göbek kordonu ve amniyokoryonik membranları 36 ayrı örnek oluşturacak şekilde AQP gen ekspresyon düzeyleri ölçülmüş ve bu ekspresyonun değerlendirilmesi için referans gen olarak beta aktin (ACTB) geni kullanılmıştır.

Quantitation data for Cycling A.Green



qPCR sonuçlarından yola çıkarak göbek kordonu AQP-9 değerleri çalışma gruplarına göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Buna göre kontrol grubunun AQP-9 değeri diğer çalışma gruplarından daha yüksektir.

Tablo 15: Göbek kordonu AQP-9 ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırması

	N	Ortalama	Standart Sapma	p
Kontrol	6	30,09	±1,12	0,026*
GDM	6	28,58	±,67	
PGDM	6	28,78	±,93	
Toplam	18	29,15	±1,11	

* p<0,05

Fetal membranlarda ise AQP-9 değerleri çalışma gruplarına göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir (p>0,05).

Tablo 16: Fetal membranlarda AQP-9 ekspresyonlarının gruplar arası karşılaştırması

	N	Ortalama	Standart Sapma	p
Kontrol	6	30,29	$\pm 1,63$	0,980
GDM	6	30,29	$\pm 1,64$	
PGDM	6	30,40	$\pm 1,67$	
Total	18	30,32	$\pm 1,02$	

qPCR sonuçlarında elde edilen AQP-9 değerleri göbek kordonu ve fetal membranlarda gruplardan bağımsız olarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$). Göbek kordonundan elde edilen AQP-9 değerleri fetal membrandan elde edilen değerlere göre daha düşüktür.

Tablo 17: Göbek kordonu ve fetal membranlarda AQP-9 ekspresyon değerlerinin gruplardan bağımsız olarak karşılaştırması

	Doku	N	Ortalama	Standart Sapma	p
qPCR	Göbek Kordonu	18	29,15	$\pm 1,11$	0,002*
	Fetal Membran	18	30,32	$\pm 1,02$	

* $p < 0,05$

5.TARTIŞMA

DM, insülin hormon eksikliği veya insülin etkisindeki defektler sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır. Gebelikte ise artan insülin rezistansını tolere edemeyen gebelerde GDM tablosu ortaya çıkar. Gestasyonel Diyabetes Mellitus kısa ve uzun vadede önemli maternal ve fetal komplikasyonlarla ilişkilendirilmiştir. Diyabetik gebelerin bebeklerinde makrozomi, polisitemi, hipoglisemi, hiperbilirubinemi, hipokalsemi, Respiratuvar Distress Sendromu (RDS) gibi neonatal morbiditeler, normal gebelere göre daha sık rastlanır. Bu risk artışı gebelik öncesinde diyabeti olan gebelerde (Pregestasyonel diyabet, PGDM) ise daha fazladır. (29-32).

Akuaporinler; vücudun çeşitli bölgelerinde suyun hızlı ve spesifik geçişi için özelleşmiş plazma membran proteinleridir. Akuaporinlerin fetal gelişim sürecinde de önemli görevleri vardır. Plasenta ve fetal membranlar arasında sıvı alışverişi, deri keratinizasyonundan önce amniyotik sıvı oluşumu, normal beyin gelişiminde serebrospinal sıvı oluşumu ve akciğer gelişimi esnasında sıvı sekresyonu bunlardan bazılarıdır. İnsan plasenta ve fetal membranlarında bu güne kadar 5 AQP (AQP 1, 3, 4, 8 ve 9) tespit edilmiştir(55,59,60).

Çalışmamızda GDM’li, VK-PGDM’li (White F Grubu) ve herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan normal gebelerin göbek kordonları ve fetal membranları ışık mikroskopik, immünohistokimyasal ve qPCR yöntemiyle incelendi.

Vasküler komplikasyon gelişmiş gebelerde, bebek doğum ağırlığı ve plasenta ağırlığının azalması, GK çapının azalması ile uyumlu olarak; bebeğe yeterince besin gelemediği, aynı zamanda yüksek HbA1c başta olmak üzere dokulara oksijen taşınma mekanizmasındaki ileri düzey yetersizliği gösterir.

Tip 1 DM’li gebelerin plasentalarında en sık gözlenen anomali villöz immatüritedir. Villöz immatürite dışında koranjyozis (villöz hipervaskülerite), artmış n-RBC (nücleated–red blood cell) varlığı, villöz ödem, villöz fibrinoid nekroz, fetal ve plasental

damarlarda tromboz gibi anormallikler de bildirilmektedir. Evers ve arkadaşlarının 58 tip 1 diyabet ve 38 kontrol olgusunu içeren çalışmalarında, diyabetik gebelerin plasentalarında villöz immatürite başta olmak üzere histolojik anormalliklerin kontrol grubuna kıyasla daha sık gözlemlendiği bildirilmiştir(64,65). Benzer bir çalışmada GDM grubunda plasental trofoblastlarda villuslarda immatürite, ödem, fibrinoid nekroz, trombotik alanlar gibi histopatolojik değişiklikler gözlenmiştir(64). Bizim çalışmamızda da koryonik trofoblastların H-E ile yapılan ışık mikroskopik incelemelerinde benzer histopatolojik bulgulara rastlanmıştır. GDM grubunun sadece villus yapılarında immatürite, GDM ve PGDM grubunun ise koryonik villuslarında ödematöz yapı gözlenmiştir.

Akuaporinler placentada ve fetal membranlarda eksprese edilirler ve amniyotik sıvı volümü regülasyonunda önemli bir rol oynarlar.

Önceki çalışmalarda AQP-9'un fetal membranlarda ve plasentada su ve üre gibi nötral solütlerin transportu için major bir membran proteini olmaya aday olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada gestasyonel diyabetik gebelerin trofoblastlarında yüksek miktarda AQP-9 eksprese edildiği kantitatif PCR, immüno blot ve immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiş ve bu artmış miktarlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur(63) Damiano ve Ark. Preeklampitik plasentalarda AQP-9 ekspresyonunun sadece apikal ve bazal membranlarda değil, sitoplazmada da normal term plasentalarla karşılaştırıldığında 2,5 kat arttığını göstermiştir. Preeklampitik plasentalarda, hCG düzeyinin ve AQP-9 ekspresyonunun yüksek olmasına rağmen beklenen su transportunun artışı saptanmamıştır, bunun da diğer nedenlerden dolayı AQP'lerin fonksiyonlarının azalmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Başka bir çalışmada amnion, koryon ve plasentada AQP-9 bulunduğu, göbek kordonunda ise olmadığı bulunmuş, Northern analiz yoluyla da AQP-9 mRNA ekspresyonu olmadığı kantitatif olarak gösterilmiştir(56). Başka bir çalışmada fetal membranlarda spontan doğum yapan term gebelerle elektif sezaryenle doğum yapan gebelerin AQP-9 düzeyi karşılaştırıldığında, spontan doğum yapan gebelerde daha yüksek bulunmuştur. Yine aynı çalışmada koryoamniyonit olgularında fetal membranlarda AQP-9 düzeyinin artmış ekspresyonu gösterilmiştir(66).

Çalışmamızda göbek kordonu ve fetal membranlarda AQP-9 proteinin ekspresyonunda farklılık olup olmadığını kantitatif olarak göstermek için Real time PCR

yöntemi kullanıldı. Literatürde GDM ve PGDM grubunda göbek kordonunda daha önce AQP-9 değerleri arasında karşılaştırma yapan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan nadir sayıda çalışmada ise göbek kordonunda AQP-9 ve diğer AQP'lerin ekspresyonu gösterilememiştir. Bizim çalışmamızda ise beklenildiği şekilde göbek kordonunda AQP ekspresyonu gösterildi, AQP-9 düzeyi gruplar arası karşılaştırıldığı zaman GDM ve PGDM grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı($p<0,05$). Fetal membranlarda da yine aynı yöntemle her üç grupta da AQP ekspresyonu gösterildi, GDM ve PGDM grubunda minimal bir azalma tespit edildi ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu bizim için beklenenin ve GDM üzerinden yapılan çalışmalara göre literatürün tersi bir sonuç olup önemli ve yol gösterici bir bulgudur. Ayrıca, literatürde insülinin AQP-9'a olan etkisinin araştırıldığı çalışmalara da rastlandı. Daha önce bildirilen, beyin ve karaciğer üzerinde yapılan çalışmalara göre, insülin konsantrasyonunun artması, AQP-9'un RNA ve proteinin düzeyinin azalmasına neden olmaktadır. İnsülin ile muamele edilmiş normal plasentalarda AQP-9 ekspresyonunun azaldığı, AQP-3'ün ise etkilenmediği gözlenmiştir. Suyun transplasental geçişi insülin etkisi ile değişmemekte olup, AQP-9'un plasentada su transportundan başka fonksiyonları da olduğunu göstermektedir(52,67). Göbek kordonundaki AQP-9 miktarlarının istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmasını insülin konsantrasyonunun da etkilemiş olabileceği düşünülebilir. Tip 1 diyabette vücutta insülin konsantrasyonu düşer ve insülin bağımlı DM olarak bilinir. Tip 2 Diyabette ise insülin konsantrasyonu yüksektir ancak insüline periferik direnç söz konusudur. Bizim hasta grubumuz Tip 1 ve Tip 2 DM ayrımı yapılmaksızın vasküler komplikasyon gelişimi göz önüne alınarak seçilmiştir. Dolayısıyla insülin konsantrasyonlarının birbirinden farklı olması ve bunun AQP-9 ekspresyonlarını etkilemesi literatürün aksi sonuç elde etmemizin sebebi olabilir.

Göbek kordonu ve fetal membranlarda gruplardan bağımsız olarak AQP-9 ekspresyonu karşılaştırıldığında; AQP-9'un göbek kordonunda fetal membranlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir miktarda düşük olduğu bulunmuştur($p<0,05$). Bu bizim için yine beklenen bir bulgudur ve bizi bundan sonrasında AQP çalışmaları için göbek kordonundan çok fetal membranlara ve koryonik trofoblast yapıları üzerine yoğunlaşmaya sevk etmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda uzun süreli diyabeti olup vasküler komplikasyon olarak nefropati tespit edilen gebelerin, gestasyonel diyabeti olan gebelerin ve sağlıklı gebelerin göbek kordonu ve fetal membranlarını; histomorfolojik, immünohistokimyasal ve qPCR yöntemiyle inceledik.

GDM grubunda makrozomik fetüs ve artmış enerji gereksinimi dolayısıyla fetüse gliserol taşınmasında artış olacağı ve buna bağlı olarak AQP-9 ekspresyonunda artış görmeyi bekliyorduk. Ancak GDM grubundaki fetal membranlarda AQP artışı saptamadık, PGDM grubunda ise görülen minimal artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonuç bizi fetal membranlarda eksprese edildiği gösterilen diğer akuagliseroporinler üzerinde de çalışılması gerektiği sonucuna sevk etti.

Plasental yapı, amniyon, koryon, villuslar ve göbek kordonu yapısı maternal diyabetten hem yapısal, hem de fonksiyonel olarak etkilenir. Bu etkilenme GDM ve PGDM gruplarında farklıdır. Fetal membranlarda gruplar arasında fark çıkmamasının nedeni etkilenmenin daha çok koryonik villuslar üzerinden olması ve bizim preparatlarımızda villus yapılarının sınırlı miktarda kalması olabilir. Çünkü göbek kordonlarında istatistiksel olarak anlamlı bulgu elde edilmesine rağmen fetal membranlarda farklılık çıkmamıştır.

İnsülinin AQP-9 ekspresyonunu azalttığı bilgisiyle sonraki çalışmalarda hasta seçimi aynı DM grubu üzerinde yapılabilir. Ayrıca amniyon sıvı miktarının da takibini çalışmalara dahil ederek AQP-9'un sadece sayısal olarak değil fonksiyonel olarak da değerlendirilmesi düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1. Lingala SM, Ghany MGMMhs. Assessing White's Classification of Pregestational Diabetes in a Contemporary Diabetic Population. 2016;25(3):289–313.
2. Barrios-Arpi LM, Rodríguez Gutiérrez JL, Lopez-Torres B. Histological characterization of umbilical cord in alpaca (*Vicugna pacos*). J Vet Med Ser C Anat Histol Embryol. 2017;46(6):533–8.
3. Hasegawa J. Ultrasound screening of umbilical cord abnormalities and delivery management. Placenta. 2018;62:66–78.
4. Chitra T, Sushanth YS, Raghavan S. Umbilical Coiling Index as a Marker of Perinatal Outcome: An Analytical Study. Obstet Gynecol Int. 2012;2012(4):1–6.
5. Moshiri M, Zaidi SF, Robinson TJ, Bhargava P, Siebert JR, Dubinsky TJ, et al. Comprehensive Imaging Review of Abnormalities of the Umbilical Cord. RadioGraphics. 2014;34(1):179–96.
6. Nanaev AK, Kohnen G, Milovanov AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. Placenta. 1997;18(1):53–64.
7. Benirschke K, Kaufmann P, Benirschke K, Kaufmann P. Anatomy and Pathology of the Umbilical Cord and Major Fetal Vessels. Pathol Hum Placenta. 2000;335–98.
8. Cord U. HISTOLOGIC AL STUDY OF UM BILIC AL CORD AT DIFFERENT STAGES OF GEST AT ION. 2013;9(1):75–8.
9. Whittle WL, Gibb W, Challis JRG. The characterization of human amnion epithelial and mesenchymal cells: The cellular expression, activity and glucocorticoid regulation of prostaglandin output. Placenta. 2000;21(4):394–401.

10. Menon R, Moore JJ. Fetal Membranes, Not a Mere Appendage of the Placenta, but a Critical Part of the Fetal-Maternal Interface Controlling Parturition. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2020;47(1):147–62.
11. Bourne GL. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *Am J Obstet Gynecol.* 1960;79(6):1070–3.
12. Grémare A, Jean-Gilles S, Musqui P, Magnan L, Torres Y, Fénelon M, et al. Cartography of the mechanical properties of the human amniotic membrane. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2019;99(March):18–26.
13. Scott GBD. *Functional Histology - a Text and Colour Atlas.* Vol. 64, Postgraduate Medical Journal. 1988. 93–93 p.
14. Elizabeth J. Herrick; Bruno Bordoni. 2019 Embryology, Placenta - StatPearls - NCBI Bookshelf.
15. Spurway J, Logan P, Pak S. The development, structure and blood flow within the umbilical cord with particular reference to the venous system. *Australas J Ultrasound Med.* 2012;15(3):97–102.
16. Kluth D, Jaeschke-Melli S, Fiegel H. The Embryology of Gut Rotation. *Semin Pediatr Surg.* 2003;12(4):275–9.
17. Langman's Medical Embryology (12th Ed.). 2012
18. Caruso M, Evangelista M, Parolini O. Human term placental cells: phenotype, properties and new avenues in regenerative medicine. *Int J Mol Cell Med* [Internet]. 2012;1(2):64–74.
19. Care D, Suppl SS. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: *Standards of Medical Care in Diabetes—2018.* *Diabetes Care.* 2018;41(Supplement 1):S13–27.
20. Canivell S, Gomis R. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4–5):403–7.

21. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes*. 2017;66(2):241–55.
22. TEMD Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu. Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği İZLEM KILAVUZU-2019 [Internet]. 2019. 15 p. Available from: 6. BASKI
23. Aastha Chawla, Rajeev Chawla, and Shalini Jaggi Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab*. 2016 Jul-Aug; 20(4): 546–551.
24. Hod M, Yorgev Y. Goals of metabolic management of gestational diabetes: Is it all about the sugar? *Diabetes Care*. 2007;30(SUPPL. 2).
25. Karam JH. Endocrinology and metabolism clinics of north america, diabetes mellitus. *Perspect Ther*. 1992;21(Tablo 2):433–56.
26. Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Del Prato S. Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2003;19(4):259–70.
27. Law KP, Zhang H. The pathogenesis and pathophysiology of gestational diabetes mellitus: Deductions from a three-part longitudinal metabolomics study in China. *Clin Chim Acta*. 2017;468:60–70.
28. Ashwal E, Hod M. Gestational diabetes mellitus: Where are we now? *Clin Chim Acta*. 2015;451:14–20.
29. Kad ZK, Klinik H, Dayicio V. PREGESTASYONEL ve GESTASYONEL DİABETES MELLİTUSDA TAKİP-TEDAVİ PROTOKOLLERİMİZ ve MATERNAL-PERİNATAL SONUÇLARI. 2006;
30. Alam MR, Momen MA, Sultana AA, Hassan SN. Gross and Histomorphologic Study of the Umbilical Cord in Pre-gestational Diabetes Mellitus and Gestational Diabetes Mellitus. *Bangladesh J Anat*. 2015;12(1):25–9.

31. Sindhu Kumari S, Gupta N, Shiels A, Fitzgerald PG, Menon AG, Mathias RT, et al. Role of Aquaporin 0 in lens biomechanics. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;462(4):339–45.
32. Roberto Vargas, John T Repke, MD, FACOG, and Serdar H Ural, MD, FACOG. Pregnancy and diabetes mellitus type 1 and 2. *Diabetol Metab Endokrinol Vyziv*. 2007;10(3):137–42.
33. El Sawy NA, Iqbal MS, Alkushi AG. Histomorphological study of placenta in gestational diabetes mellitus. *Int J Morphol*. 2018;36(2):687–92.
34. Ryan EA. Diagnosing gestational diabetes. *Diabetologia*. 2011;54(3):480–6.
35. Enquobahrie DA, Williams MA, Qiu C, Luthy DA. Early pregnancy lipid concentrations and the risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;70(2):134–42.
36. White P. Classification of obstetric diabetes. *Am J Obstet Gynecol*. 1978;130(2):228–30.
37. Binbir B, Yeniel AO, Ergenoglu AM, Kazandi M, Akercan F, Sagol S. The role of umbilical cord thickness and HbA1c levels for the prediction of fetal macrosomia in patients with gestational diabetes mellitus. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;285(3):635–9.
38. Large cross-sectional area of the umbilical cord as a predictor of fetal macrosomia - Cromi - 2007 - *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* - Wiley Online Library_5183.
39. Michael F Greene, MDRhonda Bentley-Lewis, MD, MBA Mms. Pregestational diabetes mellitus: Glycemic control during pregnancy - UpToDate. *Www.Uptodate.Com*. 2018.
40. Mahmoud EA, Al-Bakri NA, Qasim BJ. Histopathological changes of placenta in pregnant women complicated with pregestational diabetes. *J Pharm Sci Res*.

2018;10(11):2952–9.

41. Toker A. Aquaporinler; su geçişinde hidrofilik transmembran kanalları. Tıp Araştırmaları Derg. 2006;4(2):39–44.
42. Bhattacharjee H, Carbrey J, Rosen B, et al. Drug Uptake and Pharmacological Modulation of Drug Sensitivity in Leukemia by AQP9. BBRC. 2004; 322:836841
43. L Smith Barbara, Agre Peter. Multisubunit Oligomer Similar to Channel Proteins. J Biol Chem. 1991;266(10).
44. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Oocytes Expressing. Science (80-). 1992;256:26–8.
45. Agre P. Noble Lecture - Aquaporin water channels. 2003;184–207.
46. Aarseth SJ. Structure and function of aquaporin water channels. Pasp. 1999;111:1333–46.
47. Gonen T, Walz T. The structure of aquaporins. Q Rev Biophys. 2006;39(4):361–96.
48. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin water channels in the nervous system. Nat Rev Neurosci. 2013;14(4):265–77.
49. Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine. J Clin Invest. 2002;109(11):1395–9.
50. Nagelhus EA, Ottersen OP. Physiological roles of Aquaporin-4 in brain. Physiol Rev. 2013;93(4):1543–62.
51. De Falco M, Sellitti A, Laforgia V, Varano L, Cobellis L, Torella M, et al. Down-

- regulation of aquaporin 4 in human placenta throughout pregnancy. *In Vivo* (Brooklyn). 2007;21(5):813–8.
52. Badaut J, Regli L. Distribution and possible roles of aquaporin 9 in the brain. *Neuroscience*. 2004;129(4):969–79.
 53. Warth A, Mittelbronn M, Hu P, Erdlenbruch B. Expression of the Water Channel Protein Aquaporin-9 in Malignant Brain Tumors. 2007;15(2):193–8.
 54. Castro-Parodi M, Levi L, Dietrich V, Zotta E, Damiano AE. CFTR May Modulate AQP9 Functionality in Preeclamptic Placentas. *Placenta*. 2009;30(7):642–8.
 55. Water channel proteins AQP3 and AQP9 are present in syncytiotrophoblast of human term placenta. *Placenta*. 2001;22(8–9):776–81.
 56. Wang S, Chen J, Beall M, Zhou W, Ross MG. Expression of aquaporin 9 in human chorioamniotic membranes and placenta. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(6):2160–7.
 57. Elkjar ML, Vajda Z, Nejsum LN, Kwon TH, Jensen UB, Amiry-Moghaddam M, et al. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276(3):1118–28.
 58. Damiano AE, Zotta E, Ibarra C. Functional and Molecular Expression of AQP9 Channel and UT-A Transporter in Normal and Preeclamptic Human Placentas. 2006;27.
 59. Damiano AE. Review: Water channel proteins in the human placenta and fetal membranes. *Placenta* [Internet]. 2011;32(SUPPL. 2):S207–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2010.12.012>
 60. Beall MH, Wang S, Yang B, Chaudhri N, Amidi F, Ross MG. Placental and Membrane Aquaporin Water Channels: Correlation with Amniotic Fluid Volume and Composition. *Placenta*. 2007;28(5–6):421–8.
 61. Liu H, Zheng Z, Wintour EM. Aquaporins and Fetal Fluid Balance. *Placenta*.

2008;29(10):840–7.

62. Zhu X, Jiang S, Hu Y, Zheng X, Zou S, Wang Y, et al. The expression of aquaporin 8 and aquaporin 9 in fetal membranes and placenta in term pregnancies complicated by idiopathic polyhydramnios. *Early Hum Dev.* 2010;86(10):657–63.
63. Vilariño-García T, Pérez-Pérez A, Dietrich V, Fernández-Sánchez M, Guadix P, Dueñas JL, et al. Increased Expression of Aquaporin 9 in Trophoblast from Gestational Diabetic Patients. *Horm Metab Res.* 2016;48(8):535–9.
64. Edu A, Teodorescu C, Dobjanschi CG, Socol ZZ, Teodorescu V, Matei A, et al. Placenta changes in pregnancy with gestational diabetes. *Rom J Morphol Embryol.* 2016;57(2):507–12.
65. Of E, In P, With P, Mellitus D. Gestasyonel Diyabetik Gebeliklerde Plasentaların De ğ erlendirilmesi. 2007;
66. Mittal P, Romero R, Mazaki-Tovi S, Tromp G, Tarca AL, Kim YM, et al. Fetal membranes as an interface between inflammation and metabolism: Increased Aquaporin 9 expression in the presence of spontaneous labor at term and chorioamnionitis. *J Matern Neonatal Med.* 2009;22(12):1167–75
67. Kuriyama H, Shimomura I, Kishida K, Kondo H, Furuyama N, Nishizawa H, et al. Liver-Specific Glycerol Channels , Aquaporin Adipose. *Diabetes.* 2002;51(10):2915–21.