



**T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK  
LİSANS  
TEZİ**

**TİP-2 VE GESTASYONEL DİYABETLİ GEBE  
PLASENTALARININ TROFOBlast GELİŞİMİ,  
ANJİYOGENEZ YÖNÜNDEN KARŞILAŞTIRILMALI  
OLARAK İNCELENMESİ**

**MÜŞERREF ŞEYMA CEYHAN**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HAZİRAN 2018**



**TİP-2 VE GESTASYONEL DİYABETLİ GEBE PLASENTALARININ  
TROFOBlast GELİŞİMİ, ANJİYOGENEZ YÖNÜNDEN  
KARŞILAŞTIRILMALI OLARAK İNCELENMESİ**

**Müşerref Şeyma CEYHAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2018**

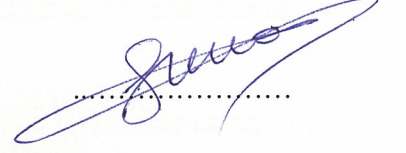


Müşerref Şeyma CEYHAN tarafından hazırlanan “Tip-2 Ve Gestasyonel Diyabetli Gebe Plasentalarının Trofoblast Gelişimi, Anjiyogenez Yönünden Karşılaştırılmalı Olarak İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



**Başkan :** Prof. Dr. Engin ÇALGÜNER

Anatomi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

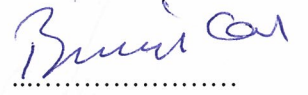
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



**Üye :** Prof. Dr. Belgin CAN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 21/06/2018

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Müşerref Şeyma CEYHAN

(21/06/2018)

**TİP-2 VE GESTASYONEL DİYABETLİ GEBE PLASENTALARININ TROFOBlast  
GELİŞİMİ, ANJİYOGENEZ YÖNÜNDEN KARŞILAŞTIRILMALI OLARAK  
İNCELENMESİ  
(Yüksek Lisans Tezi)**

Müşerref Şeyma CEYHAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2018

**ÖZET**

Plasenta, fetusun sağlıklı gelişimi için gerekli olan besin ve oksijen sağlanması, hormon salınımı, fiziksel koruma gibi temel fonksiyonlara sahip bir organdır. Plasentanın bu görevlerini etkin bir şekilde yerine getirmesi fetal gelişimin sağlıklı bir süreçte devam etmesini sağlar. Bazı patolojik durumlardan kaynaklanan plasentanın yapısal ve işlevsel bozuklukları ise fetal gelişimi olumsuz yönde etkiler. Diabetes mellitus, plasentanın fonksiyonunu ve gelişimini etkileyen bu patolojik durumlardan biridir. Hiperglisemik ortamın plasentada morfolojik ve işlevsel farklılıklar ortaya çıkararak preeklampsi, makrozomi ve intrauterin gelişme geriliği gibi sorunlara sebep olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda, pregestasyonel dönemde tanı konulmuş insülin ile regüle edilen tip-2 diyabetli gebeler, diyetle regüle edilen gestasyonel diyabetli gebeler ve sağlıklı gebelerden alınan plasenta örnekleri incelendi. Amacımız tip-2 ve gestasyonel diyabetli gebe plasentalarında ortaya çıkan değişimleri trofoblast gelişimi ve anjiyogenez açısından araştırmaktır. Bu amaçla diyabetli ve sağlıklı gebelerden alınan plasenta doku örnekleri karşılaştırmalı olarak anjiyogenez, Hofbauer hücre varlığı ve trofoblast farklılaşmasını incelemek için; CD31, CD68 ve ETS-1 ile değerlendirildi. Elde edilen verilerde tip-2 ve gestasyonel diyabetli gebe plasentalarında sağlıklı gebelere göre villuslarda ödem, endovillöz kapillerlerde konjesyon, perivillöz aralıkta ekstrasvazasyon, sinsityal düğümlerde artış gibi morfolojik farklılıklar görüldü. Endotel belirteci CD31, Hofbauer belirteci CD68 ve villus matürasyonunda rol alan ETS-1 ifadelerinde artış olduğu immünohistokimyasal boyama ve Western Blot yöntemleri ile saptandı.

Bilim Kodu : 1033

Anahtar Kelimeler : Anjiyogenez, Gestasyonel Diabetes Mellitus, Plasenta, Tip-2 Diabetes Mellitus

Sayfa Adedi : 82

Danışman : Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

COMPARATIVE INVESTIGATION OF TROPHOBLAST DEVELOPMENT,  
ANGIOGENESIS IN PLACENTA OF TYPE-2 AND GESTATIONAL DIABETES  
MELLITUS DIAGNOSED PREGNANTS  
(M. Sc. Thesis)

Müşerref Şeyma CEYHAN

GAZI UNIVERSITY  
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

June 2018

ABSTRACT

Placenta is an organ that has fundamental functions such as delivery of oxygen, hormon secretion and physical protection. Placenta carrying out its functions effectively provides development of fetus in healthy period. Placental dysfunction affects fetal development negatively due to arising from pathologic situations. Diabetes mellitus is one of the pathological situations impressing development and function of placenta. It is known that hyperglycemic environment causes problems by revealing structural and developmental differences in placenta like preeclampsia, macrosomia and intrauterine growth restriction. In our study, placental tissue samples from insulin regulated Type-2 diabetes mellitus, gestational diabetes mellitus and normal pregnant women were investigated. Our aim is to investigate alterations in placenta from Type-2 and gestational diabetes mellitus patients in respect to presence of Hofbauer cells, angiogenesis, and trophoblast differentiation. For this purpose, sample of placental tissues from diabetic and normal pregnant women evaluated to investigate Hofbauer cells, angiogenesis, and trophoblast differentiation with CD31, CD68 and ETS-1. Obtained these results show that Type-2 and GDM groups have edematous villus, congestion in endovillous capillary, extravasation in perivillous space, increased syncytiotrophoblast knotting. Increased expression of endothelial marker, CD31; Hofbauer cell marker, CD68 and having role in villus maturity, ETS-1 were showed by immunohistochemistry staining and Western Blot method.

Science Code :1033

Key Words : Angiogenesis, Gestational Diabetes Mellitus, Placenta, Type-2, Diabetes Mellitus

Page Number :82

Advisor :Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU



## TEŞEKKÜR

Engin bilgisiyle bana yol gösteren, önderlik eden ve desteğini esirgemeyen, hoşgörü ve sabrı ile her zaman yanımda olan sevgili hocam, danışmanım sayın Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na, Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL başta olmak üzere yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel birikimleri ve destekleri ile katkıları olan, çok değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a ve sayın Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU'na, yüksek lisans tezimdeki katkılarından dolayı Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan sayın Prof. Dr. Deniz KARÇAALTINCABA'ya, Anatomi Anabilim Dalı'ndan sayın Prof. Dr. Tuncay Veysel PEKER'e ve ODTÜ Biyolojik Bilimler Bölümü'nden sayın Prof. Dr. Sreeparna BANERJEE'ye

Tez çalışmam boyunca, birlikte çalışmaktan keyif aldığım, her zaman her koşulda bana göstermiş oldukları yardım, destek ve güler yüzleri ile yanımda olan değerli arkadaşlarım Dr. Saadet Özen AKARCA DİZAKAR' a, Arş. Gör. İsmail TÜRKOĞLU'na ve anabilim dalımızda görev alan tüm çalışma arkadaşlarıma ve personelimize,

Üniversitenin ilk yıllarından itibaren arkadaşlığıyla yanımda olan, zor zamanlarımda desteğini hissettiren ve yüksek lisans sürecimde yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Arş. Gör. Merve ÖYKEN'e

Tüm yaşamım boyunca beni sevgi ile büyüten, akademik hayatımın iniş ve çıkışlarını benimle birlikte yaşayan, bana olan inançları ve hiç bitmeyen sevgileriyle tüm kararlarımı destekleyen sevgili annem ve babama, varlığını daima yanımda hissettiren abime, iyi dilekleri ile beni her zaman destekleyip sabrı ve ilgisi ile hep yanımda olan kız kardeşime sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (GÜBAP) tarafından 01/2017-16 kodu ile desteklenmiştir. “TİP-2 VE GESTASYONEL DİYABETLİ GEBE PLASENTALARININ TROFOBLAST GELİŞİMİ, ANJİYOGENEZİS YÖNÜNDEN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ” isimli yüksek lisans tezi araştırma projesi kapsamında sağlanan maddi destekler için kuruma teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                      | Sayfa |
|------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET.....                                            | iv    |
| ABSTRACT.....                                        | v     |
| TEŞEKKÜR.....                                        | vi    |
| İÇİNDEKİLER.....                                     | vii   |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....                            | ix    |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....                              | x     |
| RESİMLERİN LİSTESİ.....                              | xi    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                         | xiii  |
| 1. GİRİŞ.....                                        | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                               | 3     |
| 2.1. Plasenta Gelişimi.....                          | 3     |
| 2.2. Plasenta Anatomisi.....                         | 6     |
| 2.3. Plasenta Histolojisi.....                       | 7     |
| 2.3.1. Villus yapısı.....                            | 7     |
| 2.3.2. Villus çeşitleri.....                         | 10    |
| 2.4. Trofoblast Farklılaşması.....                   | 13    |
| 2.5. Vaskülogenez ve Anjiyogenez.....                | 14    |
| 2.6. Diabetes Mellitus.....                          | 16    |
| 2.6.5 Maternal diyabet ve plasenta.....              | 19    |
| 2.7. Hipotez.....                                    | 19    |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                              | 21    |
| 3.1 Histolojik Boyama Yöntemleri.....                | 22    |
| 3.1.1 Hematoksilen-Eozin (HE) boyama yöntemi.....    | 22    |
| 3.1.2 Periyodik asit shiff (PAS) boyama yöntemi..... | 23    |

|                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.3 Masson'nun üçlü boyama yöntemi.....                                 | 23        |
| 3.1.4 İmmünohistokimyasal boyama yöntemi.....                             | 24        |
| 3.2 Western Blot Yöntemi.....                                             | 26        |
| 3.3 İstatistiksel Yöntem.....                                             | 26        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                   | <b>29</b> |
| 4.1 Hastaların Klinik Özellikleri.....                                    | 29        |
| 4.2.1 Hematoksilen-Eozin bulguları.....                                   | 29        |
| 4.2.2 Periyodik asit schiff (PAS) bulguları.....                          | 33        |
| 4.2.3 Masson'un üçlü boyama bulguları.....                                | 34        |
| 4.3 İmmünohistokimyasal Bulgular.....                                     | 35        |
| 4.3.1 CD68 bulgusu.....                                                   | 35        |
| 4.3.2 Platelet Endotel Hücre Adezyon Molekülü-1 (PECAM/CD31) bulgusu..... | 39        |
| 4.3.3 ETS-1 bulgusu.....                                                  | 43        |
| 4.4 Western blot bulgusu.....                                             | 47        |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                                                   | <b>51</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>                                          | <b>67</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                                     | <b>69</b> |
| <b>EKLER.....</b>                                                         | <b>77</b> |
| EK-1. Etik Kurul Onayı.....                                               | 78        |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                      | <b>80</b> |



**ÇİZELGELERİN LİSTESİ**

| <b>Çizelge</b>                                                                                            | <b>Sayfa</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Çizelge 4.1. Klinik Özellikler .....                                                                      | 29           |
| Çizelge 4.2. CD68 immünpozitif Hofbauer hücre değerlendirmesi .....                                       | 36           |
| Çizelge 4.3. CD31 ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda elde edilen morfolometrik veriler..... | 40           |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                                                                                            | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 4.1. CD68 immünpozitif Hofbauer hücre sayısı.....                                                                                          | 36    |
| Şekil 4.2. Villus stromasında bulunan kapiller sayısı.....                                                                                       | 40    |
| Şekil 4.3. ETS-1 immünohistokimyasal boyamasının semikantitatif olarak değerlendirilmesi.....                                                    | 44    |
| Şekil 4.4. Western Blot yönteminin farklı örneklerle yapılan 3'lü tekrarı ve GAPDH ile normalize edilmiş CD68 ifadesi görülmekte .....           | 48    |
| Şekil 4.5. Western Blot yönteminin farklı örneklerle yapılan 3'lü tekrarı ve GAPDH ile normalize edilmiş CD31 ifadesi görülmekte .....           | 49    |
| Şekil 4.6. Western Blot yönteminin farklı örneklerle yapılan 3'lü tekrarı ve $\beta$ -aktin ile normalize edilmiş ETS-1 ifadesi görülmekte ..... | 50    |

## RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim                                                                                                                                                                                         | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resim 4.1. Kontrol grubuna ait plasenta dokusunun HE ile boyanmış enine kesiti .....                                                                                                          | 30    |
| Resim 4.2. Kontrol grubuna ait plasenta dokusunun HE ile boyanmış büyük büyütmede enine kesiti .....                                                                                          | 30    |
| Resim 4.3. Tip-2 diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusunun HE ile boyanmış enine kesiti .....                                                                                          | 31    |
| Resim 4.4. Tip-2 diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusunun HE ile boyanmış büyük büyütmede enine kesiti .....                                                                          | 31    |
| Resim 4.5. Gestasyonel diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusunun HE ile boyanmış enine kesiti.. .....                                                                                  | 32    |
| Resim 4.6. Gestasyonel diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusunun HE ile boyanmış büyük büyütmede enine kesiti .....                                                                    | 32    |
| Resim 4.7. Kontrol grubu, Tip-2 diabetes mellitus grubu ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusunun PAS ile boyanmış enine kesiti.....                                    | 33    |
| Resim 4.8. Kontrol grubu, Tip-2 diabetes mellitus grubu ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusunun Masson'un üçlü boyası ile boyanmış enine kesiti. ....                 | 34    |
| Resim 4.9. Kontrol grubu, Tip-2 diabetes mellitus grubu ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusundaki Hofbauer hücrelerinde CD68 immünreaktivitesi. ....                  | 37    |
| Resim 4.10. Kontrol grubu, Tip-2 diabetes mellitus grubu ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusunun büyük büyütmedeki Hofbauer hücrelerinde CD68 immünreaktivitesi ..... | 38    |
| Resim 4.11. Kontrol grubu Tip-2 diabetes mellitus grubu ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusunda endotel hücrelerindeki CD31 immünreaktivitesi .....                   | 41    |
| Resim 4.12. Kontrol grubu, Tip-2 diabetes mellitus grubu ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusunun büyük büyütmedeki endotel hücrelerinde CD31 immünreaktivitesi. ....  | 42    |
| Resim 4.13. Kontrol grubu, Tip-2 diabetes mellitus grubu ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusundaki sinsityotrofoblastlarda ETS-1 immünreaktivitesi.....               | 45    |

| <b>Resim</b>                                                                                                                                                                                            | <b>Sayfa</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Resim 4.14. Kontrol grubu, Tip-2 diabetes mellitus grubu ve Gestasyonel diabetes mellitus grubun ait plasenta dokusunun büyük büyütmedeki sinsityotrofoblast hücrelerinde ETS-1 immünreaktivitesi. .... | 46           |
| Resim 4.15. Western Blot analizi sonucunda Gestasyonel diabetes mellitus ve Tip-2 diabetes mellitus gruplarında kontrol grubuna göre artmış CD68 ifadesi görülmekte .....                               | 48           |
| Resim 4.16. Western Blot analizi sonucunda Gestasyonel diabetes mellitus ve Tip-2 diabetes mellitus gruplarında kontrol grubuna göre artmış CD31 ifadesi görülmekte.....                                | 49           |
| Resim 4.17. Western Blot analizi sonucunda Gestasyonel diabetes mellitus ve Tip-2 diabetes mellitus gruplarında kontrol grubuna göre artmış ETS-1 ifadesi görülmekte .....                              | 50           |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| <b>Simgeler</b>    | <b>Açıklamalar</b> |
|--------------------|--------------------|
| $\mu\text{L}$      | Mikrolitre         |
| $\mu\text{m}$      | Mikrometre         |
| $\text{cm}$        | Santimetre         |
| $\text{dk}$        | Dakika             |
| $\text{dl}$        | Desilitre          |
| $\text{g}$         | Gün                |
| $\text{gr}$        | Gram               |
| $\text{h}$         | Hafta              |
| $\text{kDa}$       | Kilodalton         |
| $\text{kg}$        | Kilogram           |
| $\text{m}^2$       | Metrekare          |
| $\text{mg}$        | Miligram           |
| $\text{ml}$        | Mililitre          |
| $\text{mm}$        | Milimetre          |
| $\text{mM}$        | Milimolar          |
| $\text{nm}$        | Nanometre          |
| $^{\circ}\text{C}$ | Santigrat          |
| $\text{sn}$        | Saniye             |
| $\beta$            | Beta               |
| $\gamma$           | Gama               |



**Kısaltmalar****Açıklamalar**

|                                 |                                                            |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>CAM</b>                      | Hücre Adezyon Molekülü                                     |
| <b>cAMP</b>                     | Siklik Adenozin Monofosfat                                 |
| <b>CX 43</b>                    | Konneksin 43                                               |
| <b>DAB</b>                      | Diaminobenzedin                                            |
| <b>DM</b>                       | Diabetes Mellitus                                          |
| <b>ECM</b>                      | Hücrelerarası Matriks                                      |
| <b>EGF</b>                      | Epidermal Büyüme Faktörü                                   |
| <b>EGF-R</b>                    | Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü                          |
| <b>ETS-1</b>                    | v-ets Avian Erythroblastokist Virüs E26 Onkogen Homoloğu 1 |
| <b>EVT</b>                      | Ekstravillöz Trofoblast                                    |
| <b>FGF</b>                      | Fibroblast Büyüme Faktörü                                  |
| <b>GCM1</b>                     | Glial Cells Missing-1                                      |
| <b>GDM</b>                      | Gestasyonel Diabetes Mellitus                              |
| <b>GM-CSF</b>                   | Granülosit Makrofaj Koloni-tetikleyici Faktör              |
| <b>HB-EGF</b>                   | Heparin Bağlanan EGF Benzeri Büyüme Faktörü                |
| <b>hCG</b>                      | İnsan Koryonik Gonadotropin                                |
| <b>HE</b>                       | Hematoksilen Eozin                                         |
| <b>HIF-1<math>\alpha</math></b> | Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1 $\alpha$                   |
| <b>HLA</b>                      | İnsan Lökosit Antijeni                                     |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b>  | Interferon Gamma                                           |
| <b>IGF</b>                      | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü                             |
| <b>IgG</b>                      | İmmunoglobulin G                                           |
| <b>IL</b>                       | İnterlökin                                                 |
| <b>IUGR</b>                     | İntrauterin Gelişme Geriliği                               |
| <b>Ka</b>                       | Kapiller                                                   |
| <b>KV</b>                       | Kök Villus                                                 |
| <b>LH</b>                       | Luteinizan Hormon                                          |
| <b>LPS</b>                      | Lipopolisakkarit                                           |
| <b>MAPK</b>                     | Mitogen-activated protein kinase                           |
| <b>MHC</b>                      | Major Histokompatibilite Kompleks                          |
| <b>MMP</b>                      | Matriks Metalloproteinaz                                   |
| <b>mRNA</b>                     | Mesajcı Ribonükleik Asit                                   |

| <b>Simgeler</b>                | <b>Açıklamalar</b>                          |
|--------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>NO</b>                      | Nitrik oksit                                |
| <b>OGTT</b>                    | Oral Glukoz Tolerans Testi                  |
| <b>PAS</b>                     | Periyodik Asit Shiff                        |
| <b>PBS</b>                     | Phosphate Buffer Saline                     |
| <b>PECAM/CD31</b>              | Platelet Endotel Hücre Adezyon Molekülü-1   |
| <b>pH</b>                      | Power of hydrogen                           |
| <b>PRL</b>                     | Prolaktin                                   |
| <b>ROS</b>                     | Reaktif Oksijen Türleri                     |
| <b>SD</b>                      | Sinsityal Düğüm                             |
| <b>SST</b>                     | Sinsityotrofoblast                          |
| <b>SV</b>                      | Serbest Villus                              |
| <b>T2DM</b>                    | Tip-2 Diabetes Mellitus                     |
| <b>TGF</b>                     | Dönüştürücü Büyüme Faktörü                  |
| <b>TIMP</b>                    | MMP Doku İnhibitörü                         |
| <b>TLR-4</b>                   | Toll Benzeri Reseptör 4                     |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Tümör Nekrozis Faktör-A                     |
| <b>VEGF</b>                    | Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü          |
| <b>VEGFR</b>                   | Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü |
| <b>VS</b>                      | Villus Stroması                             |

## 1. GİRİŞ

Plasenta, fetal gelişimde anne ile fetus arasındaki fiziksel ve işlevsel ilişkiyi sağlamada etkin rol oynayan ve gebelik dönemine ait olan özelleşmiş bir organdır. Plasentadaki değişimler, fetusun gelişimi için gerekli olan; besin ve oksijen geçişini sağlamak, metabolik atıkları fetustan uzaklaştırmak, hormon salgılamak ve fetusu fiziksel olarak korumak gibi işlevler ile uyumludur [1].

Villus yapısı plasentanın işlevini gerçekleştiren önemli yapılardan biridir. Fetal gelişim sürecinde villuslar da fetusun ihtiyacı ile orantılı olarak gelişim gösterir. Gelişimin 4. ayından sonra iki yönlü madde geçişlerini sağlayan ve anne ile fetal kanın karışmasını engelleyen, plasental bariyer sadece sinsityum ve fetal kan damarlarının endotellerinden oluşur [2].

Fetusun sağlıklı gelişebilmesi ve hayatta kalabilmesi plasentaya bağlıdır. Bu yüzden plasentada oluşan patolojiler direkt olarak fetusu etkiler. Preeklamps, maternal diyabet gibi patolojilerde plasentanın normal yapısının bozulduğu ve intrauterin gelişme geriliği, makrosomia veya konjenital anomalilere sebep olduğu bilinmektedir [3, 4]

Günümüzde artan hareketsiz yaşam tarzı ve değişen diyet alışkanlıkları sebebiyle diyabetin toplumda görülme sıklığının arttığı bilinmektedir [5]. Maternal pregestasyonel ve gestasyonel diyabet, hiperglisemik bir ortamın oluşması ile ilişkilidir. Maternal kaynaklı hiperglisemik ortam plasentada villus immaturitesi, villuslarda fibrinoid nekroz, koranjyozis ve artan anjiyogenez gibi histolojik bulgulara neden olmaktadır. Diyabet kaynaklı görülen bu abnormaliteler, etkin kalınan glukoz seviyesine ve süresine bağlı olarak farklılık göstermektedir [6].

Plasenta, farklı görev ve işlevleri olan birçok hücreden oluşmaktadır ve bu hücrelerin birbirleri ile olan etkileşimi fetal gelişim için çok önemlidir. Villus stromasına ait hücrelerden biri olan Hofbauer hücreleri, plasental makrofaj olarak bilinmektedir. Plasentada sıvı dengesinin kurulmasında, villus maturasyonunda, immunolojik ve inflamatuvar süreçlerde görev almaktadır [7, 8]. Hofbauer hücrelerinin plasentada meydana gelen vaskülogenez ve anjiyogenez olaylarında yer aldığı düşünülmektedir. Araştırmacılar, Hofbauer hücreleri ile endotel hücrelerinin birbiri ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir [9].

Ayrıca yapılan çalışmalarda GDM plasentalarında makrofaj yoğunluğunun ve sitokin (IL-6/TNF- $\alpha$ ) miktarının kontrol gruplarına göre daha fazla olduğunu belirlenmesi, bu hücrelerin inflamasyon ile ilişkili olduğunu göstermektedir [10]. Bununla birlikte yapılan başka bir çalışma, Tip-1 diabetes mellituslu ve GDM'li plasentalarda anjiyogenezde etkin olan VEGF ifadesinin normal plasentalara göre arttığını göstermiştir [11].

Trofoblast farklılaşması sağlıklı plasenta gelişimi için önemli bir süreçtir. İmplantasyondan sonra başlayan vaskülogenez olaylanımında trofoblast hücrelerinin sitotrofoblast ve sinsityotrofoblastlara farkedildiği, bununla beraber proliferatif karakterli hücrelerin yerini invazyon yeteneği yüksek hücrelerin aldığı bilinmektedir [12]. Plasentanın gelişim sürecinde maternal kanın taşınımını kolayca sağlamak amacıyla meydana gelen doku organizasyonunda birçok hücrelerarası matriks proteininin ifadesi trofoblast hücrelerinin farklılaşmasına bağlı olarak regüle edilmektedir [13].

Gebeliğin ilerlemesiyle birlikte yeterli madde ve oksijen geçişini temin etmek amacıyla plasentada yeniden modelleme meydana gelmektedir. Twist1, Zeb1 ve Ets gibi moleküllerin trofoblast farklılaşması sürecinde yer aldığı gösterilmiştir [14, 15]. Ayrıca tip-1, tip-2 ve gestasyonel diyabetli gebe plasentalarında yapılan araştırmada villus immaturitesinin tip-1 ve tip-2 diyabetli gruplara göre gestasyonel diyabetli grupta daha fazla olduğu belirlenmiştir. Farklı diyabet tiplerinin plasenta patolojisini farklı şekillerde etkilemesinin, farklı patofizyolojilere sahip olmalarından kaynaklanabileceği belirtilmiştir [16].

Plasenta, gebelikte önemli bir endokrin işleve sahiptir. Ayrıca fetal gelişim plasentanın kontrolü altındadır. Bu yüzden çeşitli sistemik hastalıkların ve patolojilerin plasenta gelişimine etki ederek fetal gelişimi etkileyebileceği düşünülmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında, tip-2 ve gestasyonel diyabet olgularındaki plasenta doku organizasyonunu trofoblast gelişimi ve anjiyogenez ile plasental makrofaj özelliğindeki Hofbauer hücrelerinin yoğunluğunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle histolojik değişikliklerle beraber endotel belirteci olan CD31, Hofbauer hücre belirteci olan CD68 ve villus gelişiminde yer alan ETS-1 değerlendirmeleri ile elde edilen bulgular doğum ağırlığı, plasental ağırlık ve gebelik süresi gibi kriterlerle beraber, sağlıklı gebelerle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu çalışmada sağlıklı, tip-2 ve gestasyonel diabetes mellitus tanısı konulmuş gebelere ait plasentalarda ortaya çıkan değişimleri inceleyerek, değerlendirmelerin gelecekteki klinik çalışmalara katkı sağlaması hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Placenta Gelişimi

Placentasyon, embriyonun sağlıklı gelişebilmesi için yaşamsal önem taşıyan karmaşık ve sürekliliği olan bir süreçtir. Fertilizasyon, spermin sırasıyla korona radiata ve zona pellusida yapılarını geçmesi ve oosit pronükleusu ile sperm pronükleusunun birleşmesi ile gerçekleşir [17]. Fertilizasyonun ardından oluşan zigot ard arda mitoz bölünmeler geçirerek blastomer halini alır. Gevşek bir şekilde bulunan hücreler üçüncü yarıklanmanın ardından birbirleriyle olan bağlantılarını arttırarak kompaksiyon sürecine girerler. 16-hücrelik morula olarak isimlendirilen bu hücre grubu, uterus boşluğuna geldiğinde buradaki sıvı zona pellusidayı geçerek ortada blastosel olarak ifade edilen bir boşluk oluşmasına sebep olur. Böylece gebeliğin 4. gününde blastokist yapısı ortaya çıkar [18]. İç tarafta bulunan iç hücre kitlesi ilerleyen zamanlarda embriyoyu oluşturmak üzere blastokistin bir kutbuna yerleşmiş şekilde bulunurken dış tarafta bulunan dış hücre kütlesi trofoblastlar gelecekte plasentayı oluşturacaktır [17].

Fertilizasyon gerçekleştikten sonra 6-7. günlerde zona pellusidanın kaybolması ile embriyoblast tarafında yer alan trofoblast hücreleri tarafından endometriuma doğru implantasyon süreci başlar. Fertilizasyondan sonra 6. günde başlayarak 10. günde sona eren implantasyon penceresi sürecinde uterus blastokist implantasyonuna uygun halde bulunur [19]. İmplantasyon, trofoblastların sitoplazmik uzantıları ile uterus epitel hücre apikalindeki kısa uzantıların etkileşime girdikten sonra trofoblastların, endometriyal hücrelerin hücreler arası boşluklarına nüfuz etmesi ile başlar. Trofoektoderm hücrelerinin yüzeyinde bulunan epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR), uterus endometriyal hücrelerinde ifade edilen heparin bağlanan EGF benzeri büyüme faktörü (HB-EGF)' ne bağlanarak apoptozis mekanizmasını başlatır. Adezyon molekülü olan ve trofoblast membranında bulunan L-selektin, uterus luminal epiteli ile etkileşime girerek blastokistin uterus duvarına tutunmasını sağlar [18, 20]. Uterusa olan migrasyon ve invazyon sürecinde hücre adezyon molekülleri (CAM), hücrelerarası matriks proteinleri (ECM) ve matriks metalloproteinazlar (MMP) önemli rol oynar. Trofoblastlarda bulunan integrin molekülü desidual hücrelerdeki laminin, fibronektin gibi moleküller ile etkileşime girerek blastokistin uterusu invaze olmasını sağlar [21]. Bu süreçte endometriumdaki stromal hücreler glikojen ve lipid içeriğini arttırarak büyük, yuvarlak desidual hücrelere farklılaşırlar. Uterus bezleri büyür, genişler ve erken dönemde daha sarmal bir şekilde bulunur. Ayrıca endometriumdaki vaskülarizasyon artar

[19]. Matriks metalloproteinaz, MMP doku inhibitörü (TIMP) ve plasminogen aktivator ve inhibitör molekülleri endometriumun yeniden modellemesini regüle eder. Endometriuma penetre olan blastokistte trofoblastlar hızlı bir şekilde çoğalarak sitotrofoblast ve sinsityotrofoblastlara farklılaşır [18].

Sitotrofoblast hücreleri iç kısımda bulunur, tek nükleusludur ve mitotik aktiviteye sahiptirler. Sinsityotrofoblast hücreleri dış kısımda bulunur ve multinükleusludur [18]. Sinsityotrofoblastların mitotik aktiviteleri yoktur, ancak sitotrofoblastlar bölünür ve nükleusları kaynaşarak hücre membranlarını kaybedip sinsityotrofoblastlara farklılaşırlar. Gelişimin 9. gününde blastokist endometriuma gömülmüş halde bulunurken, embriyonik kutuptaki sitotrofoblastlar hızlı bir şekilde çoğalır ve sinsityotrofoblastlar endometriuma doğru invazyona devam ederler. Bu süreçte gelişimine devam eden embriyonik kutuptaki sinsityotrofoblastlar arasında vakuoller oluşmaya başlar. Vakuoller büyüyerek lakünaları oluşturur ve bu süreç laküner evre olarak isimlendirilir [17].

Abembriyonik kutupta bulunan sitotrofoblast hücreleri ise ilerleyen zamanda sinsityotrofoblastlara farklılaşarak bu alanda da lakünalar tüm blastokisti kapsayacak şekilde gelişir [17]. Sinsityotrofoblast hücreleri endometrium ve miyometriumun bir kısmını invaze ederken, aynı zamanda prolitik enzimler salgılayarak maternal spiral arter dallarını aşındırır. Lakünalara dolan maternal kan primitif uteroplasental dolaşımı başlatmış olur. Bu olay aynı zamanda gelecekteki intervillöz boşluğun öncüsüdür. Sinsityotrofoblastlar, insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonunu salgılamaya başlar ve hCG lakünalara ulaşarak korpus luteumdan salgılanan östrojen ve progesteronun regülasyonunu sağlar. Sinsityotrofoblast tabakasının yakınında bulunan desidual hücrelerden lakünaların içine, maternal kana geçen glikojen ve lipidler başlangıç aşamasında embriyonik gelişim için gerekli olan besin ihtiyacını karşılar [18].

Hızla çoğalan sitotrofoblast hücreleri, sinsityotrofoblastların aralarında yer alan lakünalara doğru yerleşim göstermeye başlar. Böylece gelişimin 13. gününde sinsityotrofoblastlarla çevrili ve merkezinde sitotrofoblastların bulunduğu primer villus yapıları oluşur. Lakünalar ilerleyen zamanda intervillöz boşluğu oluşturur. Gelişimin yaklaşık 16. gününde ekstraembriyonik mezoderm hücreleri primer villus yapısının merkezine yerleşerek iç tarafta sitotrofoblastlar ve onların dış tarafında bulunan sinsityotrofoblastlar tarafından çevrelenirler. Oluşan bu yapı sekonder villustur. Gelişimin üçüncü haftasının sonlarına doğru sekonder villusların merkezindeki embriyonik mezoderm, vaskülarize olarak kan

damarlarına ve hücrelerine farklılaşarak tersiyer villusu meydana getirir. Villusların işlevsel olarak olgunlaşmış ve fetal dolaşımı sağlayan hali tersiyer villus yapısıdır. Genel olarak gelişimin bundan sonraki sürecinde tüm villuslar tersiyer villus yapısında olur [19, 22]. Villuslarda oluşan kapillerler koryon plağı ve bağlantı sapında gelişen kapillerler ile ilişki kurarak arteriol ağı oluşturur. Böylece gelişimin 4. haftasında başlayan kalp atımıyla beraber embriyonun besin ve oksijen ihtiyacını sağlayacak olan embriyo ile plasenta arasındaki intraembriyonik dolaşım sistemi oluşmuş olur. Tersiyer villusların oluşma sürecinde sitotrofoblastlar sinsityotrofoblastlara doğru büyüme göstererek endometriuma kadar uzanırlar ve trofoblastik kabuğu oluşturarak endometriuma tutulmayı sağlarlar [17-19].

Gelişimin 19. ve 20. gününde embriyo, trofoblastik kabuğa ilerleyen dönemlerde umbilikal korda dönüşecek olan bağlantı sapı ile bağlı durumda bulunur. Bu sayede embriyo ile plasenta arasında fiziksel bağ kurulmuş olur [17].

Embriyo gelişmesini sürdürürken ikinci ayın başında büyüyen plasenta ile birlikte artan villus yapıları ışınsal bir görünümün ortaya çıkmasına sebep olur. Gelişimin dördüncü ayının başında plasentada maternal ve fetal dolaşımı ayıran yapılarda değişiklikler olur. Plasental bariyer olarak adlandırılan ve fetal dolaşımı maternal dolaşımdan ayıran bu yapı şu kısımlardan oluşur:

- Sinsityotrofoblast
- Kesintili iç sitotrofoblast
- Trofoblast bazal laminası
- Villuslarda bulunan bağ doku (mezenşimal)
- Endotel bazal laminası
- Tersiyer villuslarda bulunan fetal plasental kapiller endoteli

Akciğerde bulunan kan-hava bariyeri yapısına benzeyen bu bariyer fetal ve maternal kanın karışmasını engellerken oksijen, karbondioksit ve besin geçişine izin verir [19].

İlerleyen dönemlerde iyice incelen sinsityum tabakasının birçok nükleus barındıran parçaları intervillöz alanda görülebilir. Bu yapılara sinsitiyal düğüm adı verilir ve normal süreçte herhangi bir etki göstermeden yok olurlar [17]. Embriyonik kutupta yer alan villuslar hızla çoğalıp büyüyerek koryon frondozumu oluştururken, abembriyonik kutupta bulunan az sayıdaki villus yapısı dejenere olarak düzleşir ve koryon leve kısmı oluşur [2].

Uterusun embriyoya yakın tarafındaki hücreler desidualizasyon geçirerek içerdikleri



glikojen ve lipid miktarını arttırarak desidua plağı oluşturur. Abembriyonik tarafta bulunan hücreler ise desidua kapsülaris olarak isimlendirilen yapıyı meydana getirir. Gelişmeyle beraber büyüyen koryon boşluğunun uyguladığı basıncın etkisiyle desidua kapsülaris yok olur. Koryon leve desidua parietalis olarak isimlendirilen uterus duvarı ile birleşir ve uterusun lümenini kapatır. Koryon frondozum ile desidua bazalis plasentayı oluştururken, amniyon ve koryon yapılarının birleşmesi ile doğumda yırtılan amniyokoryonik membran oluşur [17].

## 2.2. Placenta Anatomisi

Hemokoriyal placenta, sadece gebelik süresince var olan geçici bir organdır. Fetusun gelişimi için yaşamsal öneme sahip olan placenta, fetal gelişim arttıkça gelişerek farklılaşır [23].

Miadında placenta disk şeklinde olup, 15-25 cm çapında ve yaklaşık 3 cm kalınlıktadır. Genellikle sağlıklı bir placenta 500-600 gr ağırlığındadır. Plasentanın uterus duvarından ayrılması bebeğin doğumundan sonra 30 dakika içinde gerçekleşir [17]. Desidua bazalis ile kaplı olan maternal taraf plasental septa ile 30-35 loba ayrılarak birçok kotiledondan oluşur. Kotiledonlarda ana kök villuslar ve ondan dallanan diğer villuslar yer alır. Koryon plağı ile kaplı olan fetal tarafta bulunan büyük arter ve venler, eksantrik veya marjinal yerleşim gösteren umbilikal kordda birleşir. Koryonik plağa bağlı olan umbilikal kord yaklaşık olarak 50-60 cm uzunluğunda olup, 2 (iki) umbilikal arter ve 1 (bir) umbilikal ven içermektedir [18].

Plasentanın maternal tarafı desidua yapısı ile ifade edilir. Bu yapı; desidua bazalis, desidua kapsülaris ve desidua parietalis kısımlarından oluşur. Desidua bazalise yakın olan koryonik villuslar oldukça iyi bir şekilde gelişerek koryon frondozumu oluşturur. Desidua kapsülaris gelişen embriyoyu yüzeysel olarak kaplar. Desidua parietalis ise embriyo dışında kalan alana verilen isimdir. Placenta maternal taraftan desidua bazalis ile sınırlanır. Plasentanın fetal tarafı ise koryonik plak ve villuslardan meydana gelen koryon frondozum yapısı ile ifade edilir. Abembriyonik kutuptaki villusların düzleşerek oluşturduğu alana koryon leve denilir. Fetal gelişimle birlikte placenta da genişler ve doğuma kadar yaklaşık olarak uterusun %15-30 unu kaplar [17, 18].

Fetal plasental dolaşımında, fetustan gelen oksijen miktarı düşük kan, umbilikal arterlerden geçerek plasentaya gelir. Bu arterler koryon plağında radial olarak yayılım gösteren koryon arterlerine dallanır. Daha ince dallara ayrılan kapillerler, intervillöz boşlukla yakın mesafe

olacak şekilde villuslarda yoğun bir kapiller ağı meydana getirir. Bu alanda birbirine çok yaklaşan fetal ve maternal kan, birbirine karışmadan gaz ve metabolit geçişi sağlanır. Ayrıca yoğun kapiller ağı gelişen fetusun artan ihtiyacını karşılamak için geniş bir yüzey alanı oluşturur. Villuslarda bulunan kapillerlerdeki oksijen miktarı yüksek kan, koryon arterleri yakınında bulunan venler aracılığı ile umbilikal vene geçerek fetuse aktarılır [24].

Plasenta, bazal plağı geçen 80-100 kadar endometrial spiral arter tarafından kanlanır. Bu arterlerdeki kan yaklaşık 150 ml hacminde kan içerebilen intervillöz boşluklara boşalır ve bu kan dakikada 3-4 defa değişir. Intervillöz boşluktaki kan basıncı spiral arterdeki kan basıncından çok daha düşüktür [19]. Yüksek basınçla gelen kan, intervillöz boşlukların derin kısımlarına, koryon plağına doğru akar. Basıncı düşen kanın akışı yavaşlar, böylece yavaş akım ile villusları geçen maternal kan ile fetal kan arasında metabolit ve gaz geçişi sağlanır. Maternal kanın plasentadaki bu dolaşımı endometriyal venler aracılığı ile sonlanarak maternal dolaşıma geri döner [24].

### **2.3. Plasenta Histolojisi**

Plasenta maternal ve fetal kısımlardan meydana gelen, maternofetal ve fetomaternal değişimin olduğu geçici fakat fetal gelişim için önemli olan bir organdır. Bu değişim sürecinde fetal kan ile maternal kan karışmaz. Plasentadaki koryonik villuslar, madde geçişini sağlayan temel yapılardır. Farklı villus çeşitleri bulunmasına rağmen sinsityotrofoblast, sitotrofoblast (Langhans hücreleri), trofoblast bazal membranı, villus stroması ve fetal damar yapıları tüm koryonik villus çeşitlerinde bulunan temel unsurlardır [25].

#### **2.3.1. Villus Yapısı**

##### Sinsityotrofoblast

Villus yüzeylerini kaplayan ve maternal kan ile doğrudan ilişkide olan, özelleşmiş epitel hücreleridir. Bu hücreler, villus yapılarında devamlılık gösterir ve trofoblastlardan farklılaşırlar. Gestasyonun 28. haftasında kapladıkları alan 5 m<sup>2</sup> iken termdeki plasentada 11-12 m<sup>2</sup>'ye ulaşır [26]. Sinsityum maternofetal geçiş sürecinde katabolik reaksiyonlar, protein ve lipid sentezi, gaz ve su geçişi, kolaylaştırılmış glukoz taşınımı, aktif aminoasit taşınımı gibi önemli aktivitelerde yer alır. Ayrıca hCG, insan koryonik somatotropin (hCS), insan plasental laktojen (hPL) ve insan büyüme hormonu (hGH) bu hücre grubundan salgılanır. Sinsityotrofoblastta çok sayıda maternofetal temas yüzeyini arttıran apikal

mikrovillus yapısı bulunur [25]. Sinsityotrofoblast, mitotik aktivite göstermeyen, hücre sınırları belirli olmayan çok nükleuslu bir yapıdır. İyi derecede gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondriyon, granüllü ve düz endoplazma retikulumu, yağ damlacıkları bulunur [19]. Gebelik süresince kalınlığı giderek inceler ve bazı alanlarda tek sıralı bir yapı halini alır. Plasental villus kesitlerinde sinsityal nükleusların birikim gösterdiği trofoblastik alanlar mevcuttur. Bu alanlara sinsityal düğüm adı verilir [25].

#### Sitotrofoblast (Langhans hücreleri)

Mitotik aktivitesi olan farklılaşmamış trofoblast hücreleridir. Bu hücreler kaynaşır ve biyokimyasal farklılaşma göstererek multinükleuslu sinsityotrofoblast tabakasını oluşturur. Sitotrofoblast hücreleri invazyon yetenekleri ile uterusu invaze ederek maternal dokunun ve spiral arterlerin yeniden modellenmesinde görev alır [25, 27].

Gebeliğin erken dönemlerinde sayıca fazla olan ve devamlılık gösteren bir tabaka iken ilerleyen zamanla birlikte inceler ve bir kısmı yok olur [24]. Işık mikroskopunda hücre sınırları belirli küboidal, polihedral veya oval şekilli olarak görülürler. Açık renkli boyanan ökromatik nükleusa sahip bu hücre tabakasında iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda ribozom ve endoplazma retikulumu bulunur [25, 28]. Sitotrofoblastlar birbirleri ile kaynaşarak sinsityotrofoblastlara farklılaşma sürecinde hücre döngüsünden çıkma, hücre membran ayrışması, nükleus, sitoplazma ve organellerin kaynaşması aşamalarından geçerek sinsityum tabakasını meydana getirir. Bu süreci tetikleyen neden bilinmemekle birlikte düzenli regüle olan bir sinyal yolağı, stres kaynaklı bir aktivasyon veya sinsityum tabakasının yenilenmesi ihtiyacının farklılaşmaya sebep olabileceği düşünülmektedir [29].

#### Villus stroması

Trofoblast bazal membranı tarafından trofoblast epitel hücrelerinden ayrılır. 20-50 nm kalınlığındaki bazal membran, tip-4 kollagen, heparan sülfat, laminin ve fibronektin içerir. Bağ doku lifleri, bağ doku hücreleri ve fetal damarlar villus stromasında bulunan yapılardır. Villus stroması, sitotrofoblastlara desteklik sağlar ve maternal-fetal dolaşım arasında filtrasyon bariyeri olarak görev yapar. Stromada bulunan farklılaşmamış mezenşimal stroma hücreleri gebeliğin ilk 2 ayı içerisinde yoğun şekilde bulunurken ilerleyen zamanlarda kök villuslarda ve bazı immatür intermediyer villuslarda bulunur. İkinci ayın sonunda mezenşimal stroma hücreleri farklılaşarak uzantıları olan fibroblastlara dönüşür. Gebeliğin son dönemlerinde mezenşimal hücreler miyofibroblastlara farklılaşırlar. Bu hücreler

villuslarda perivasküler kontraktıl kılıflar oluşturarak, villus turgorunu regüle eder ve intervillöz boşluğun boyutlarını etkileyerek maternal intervillöz kan basıncını ayarlar. Bu hücrelerin yanı sıra villus stromasında mast hücreleri, plazma hücreleri ve retiküler hücreler de bulunur [25].

### Hofbauer hücreleri

Villus stromasında bulunan plasental antijen sunan hücrelerdir. Gebeliğin 18. gününde ortaya çıkan bu hücreler fetal kökenli olup villus spesifik makrofajlardır [29]. Plasental immün reaksiyonlarında görev alan Hofbauer hücreleri, antijen ile karşılaştığında patojenleri fark eden spesifik yüzey reseptörlerinin ifadesini artırır [19]. Membran yüzeyinde bulunan immunoglobulin reseptörleri ve major histokompatibilite kompleks (MHC) ifadeleri diğer makrofaj hücreleri ile ortaktır. 10-30 µm çapında villus stromasında izole olarak bulunan, büyük, yuvarlak, oval, böbrek şeklinde veya yıldız şeklinde görülen, eksantrik yerleşimli nükleusa sahip hücrelerdir. Gebeliğin erken dönemlerinde vakuollü bir sitoplazmaya sahipken, geç dönemlerde granüler bir yapıya sahiptir [25, 30].

1903 yılında tanımlanan Hofbauer hücreleri, aktif olarak fagositoz yapar ve sitoplazmalarında çok sayıda asit fosfataz ve birçok granül içeren lizozom yapıları vardır. Mitokondriyon, Golgi kompleksi, granüllü ve düz endoplazma retikulumu yoğun olarak bulunan organellerdir. Hofbauer hücresi, plasentanın yaşına veya plasentada bulunan patolojilere göre gebelik boyunca değişen heterojen bir popölasyona sahiptir. Gebeliğin erken dönemlerinde villus stroması sıvı içerik yönünden zengin olduğu için bu hücrelerin ayırt edilebilmesi kolaydır. İlerleyen dönemlerde stroma yapısı daha yoğun bir hal aldığından morfolojik olarak ayırt edilmesi zorlaşır. Ancak yapılan çalışmalar, termdeki villuslarda bulunan stroma hücrelerinin % 40'ını Hofbauer hücrelerinin oluşturduğunu göstermiştir [29].

Hofbauer hücrelerinin plasentadaki en önemli işlevi fetusun immunolojik savunmasını sağlamak ve vertikal patojen geçişini engellemektir. Toll benzeri reseptör 4 (TLR-4) patojenlerdeki lipopolisakkarit (LPS) varlığını tanıyan ve doğal immün yanıtın oluşmasını sağlayan TLR ailesine ait bir moleküldür. Bu reseptör ailesi proinflamatuvar sitokinlerin ifade edilmesinde görev alan transkripsiyon aktivasyonunu sağlar. Hofbauer hücrelerinin TLR-4 ifade ettiği gösterilmiş ve bu hücrelerin plasental bariyer kapsamında doğal immün yanıtın oluşmasında yer aldığı düşünölmektedir [31, 32]. Ayrıca Hofbauer hücreleri ile yapılan immunohistokimyasal çalışmalar interferon  $\alpha$ 'nın varlığını göstererek bu hücrelerin

enfeksiyonlara karşı plasentayı korumada rol alabileceğini düşündürmüştür [29]. Hofbauer hücrelerinin Fc reseptörlerine sahip olduğu gösterilmiştir. Maternal immunoglobulin geçişi, humoral bağışıklık ve yenidoğanı enfeksiyonlardan korumak için önemlidir. Hofbauer hücrelerinde ifade edilen, IgG seçilimi ve transferinde rol oynayan IgG Fc kısmına spesifik reseptörlerin (FcγRs) varlığı bu hücrelerin immun komplekslere karşı koruma sağladığını düşündürmektedir [29, 33].

Hofbauer hücrelerinin yerleşim gösterdikleri alanlara bakıldığında trofoblast farklılaşması ve anjiyogeneze regülasyonunda yer aldığı düşünülmektedir. Tam olarak mekanizması bilinmemekle beraber yapılan araştırmalar Hofbauer hücrelerinin vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), vaskülotropin gibi anjiyogenik faktörler salgıladıklarını göstermiştir. Endotelial mitojen özellikte bir molekül olan VEGF, anjiyogeneze katkı sağlamanın yanı sıra endotel proliferasyonu, hücre migrasyonu ve apoptozis inhibisyonu gibi yollarda da görev alan önemli bir faktördür. Hofbauer hücrelerinin varlığı CD14 ve CD68 antikorları kullanılarak immunohistokimyasal olarak saptanır. CD68 ve CD31 antikorları ile aynı anda yapılan immunohistokimyasal boyamalarda villus merkezinde Hofbauer hücreleri ile anjiyogenik hücre kordonları ve primitif vasküler tüplerin birbirlerine yakın yerleşimlerde olduğu gösterilmiştir [9, 29, 34].

### **2.3.2. Villus çeşitleri**

Plasentanın temel yapısı olan villuslar sahip oldukları bazı değişkenlere göre alt gruplara ayrılmışlardır. Geçmişte birçok farklı sınıflandırma yapılmış olsa da; günümüzde Kaufmann ve arkadaşlarının villus ağacındaki yerleşimine, çapına, işlevine, stromal ve vasküler yapısına göre yaptığı sınıflandırma kullanılmaktadır [25, 29].

#### Mezenşimal villus

Villus çeşitleri arasındaki en primitif villus çeşidi olan mezenşimal villus tersiyer villuslardan oluşur. Diğer tüm villusların öncülü olan bu yapılar genel olarak gebeliğin erken dönemlerinde yaygın olarak bulunur. Gelişimin ilk 8 haftası yüksek oranda bulunan mezenşimal villuslar termdeki plasentada bulunan toplam villus alanının % 1'ini oluşturur. Gebeliğin erken döneminde bulunan mezenşimal villusların çapı 120-250 µm iken villus ağacının büyümesiyle beraber termde doğru sayısı azalan bu villusların çapı 60-100 µm'dir [25].

Kalın bir trofoblast tabakasına sahip olan mezenşimal villuslarda sitotrofoblast hücreleri

yoğun olarak bulunur. Gevşek bir yapıda olan villus stroması kollagen lif, fibroblast ve birkaç Hofbauer hücresi içerir. Gebeliğin ilk dönemlerinde villus proliferasyonunda görev alır. Ayrıca maternofetal geçiş ve endokrin aktivitesi işlevlerine de dâhil olur. Diğer villus çeşitlerinin gelişmesiyle beraber mezenşimal villusların sayısı azalırken işlevsel önemi de azalır [25, 29].

#### İmmatür intermediyer villus

İntermediyer villus yapıları, kök villuslar ile periferde bulunan villus dalları arasında bulunur. Gebeliğin 8. haftasından sonra mezenşimal villusların gelişmesi ile oluşur ve gebeliğin sonuna kadar bu villus çeşidine rastlanır. Genel olarak immatür plasentalarda 14 ile 20. haftalar arasında daha yaygın olarak görülür. Termdeki bir plasentada % 5-10 oranında görülen villus çeşididir. Villus çapı çoğunlukla 100-200 µm'dir fakat büyük villuslarda 400 µm çapa kadar bu değer çıkabilir. İmmatür intermediyer villus zamanla kök villus çeşidine farklanır [25].

Kalın bir trofoblast tabakası ile çevrelenen bu villus çeşidinde retiküler bir stroma bulunur. Sıvı içeren stromada stromal kanallar yer alır. Bu alanda Hofbauer hücreleri ile Langhans hücreleri yaygın olarak görülür. Villus yapılarının gelişmesi sürecinde immatür intermediyer villuslar yeni villus oluşumlarının meydana gelmesi için merkezi bir rol oynar. Plasentanın büyümesi ve gelişmesiyle birlikte oluşan yeni villuslar ya kök villuslardan ya da immatür intermediyer villuslardan farklanır. Terminal villusların olgunlaşma süreci tamamlanana kadar olan süreçte gaz ve besin geçişini bu villus çeşidi sağlar [25, 34].

#### Matür intermediyer villus

Terminal villus öncülü olan matür intermediyer villus, üçüncü trimestirde mezenşimal villus yapısından gelişir. Genel olarak uzun ve silindirik şeklinde olan matür intermediyer villus yapısı gebeliğin 32-34. haftalarında daha yuvarlak bir şekil alır. Gebelik süresince üçüncü trimestirde yaygın olarak görülür ve term plasentanın % 25 ini oluşturur. Çapı 80-150 µm arasında değişir. Villus merkezi düzenli yerleşim göstermeyen bağ doku lif demetlerinden ve bağ doku hücrelerinden oluşur. Matür intermediyer villus çeşidinde yaklaşık % 50 oranında bir vaskülarizasyon vardır. Yüksek oranda var olan vaskülarizasyon maternofetal geçişi sağlıklı bir şekilde sağlar [25].

Villus stromasında küçük terminal arteriyoller, birçok kapiller ve venül toplama kanalları

bulunmaktadır. Işık mikroskopunda damarların tunika media veya adventisya tabakası ayırt edilemez [25, 29].

### Terminal villus

Plasental gelişimin son aşamasında varlığını arttıran terminal villus, termde plasentanın % 40-50' sini meydana getirir. İntermediyer villuslar aracılığı ile kök villuslara bağlanan üzüm benzeri, villus ağacındaki son dallanmalardır. Olgun bir terminal villus çapı 60 µm'dir. Az oranda bağ doku lifleri ve nadir sayıda Hofbauer hücreleri bulunduran bu villus çeşidinde vasküler yapılar yaygın olarak görülür [25].

Villus stromasında pek çok kapiller oluşum ve oldukça dilate sinüzoidler bulunur. Ancak bu sinüzoidler kesintisiz endotel ve bazal laminaya sahip olduğu için karaciğer, dalak ve kemik iliğindeki sinüzoid yapılarından farklıdır [25].

İnce bir bazal membran tarafından ayrılan villus fetal kapillerler ile sinsityotrofoblastların arasındaki maternal fetal diffüzyon mesafesi yaklaşık olarak 3,7 µm'dir. Bu mesafe maternal ve fetal geçişler için plasentada bulunan yapılar arasında en uygun yerdir. Bu yüzden terminal villus gelişiminde meydana gelen sayısal ve morfolojik bir yetersizlik intraplasental oksijen miktarını etkileyerek fetal gelişimde görülebilecek olumsuzluklarla ilişkilidir [25, 34, 35].

### Kök Villuslar

İmmatür intermediyer villuslardan gelişen bu villuslar gelişimin 8. haftasından sonra görülmeye başlanır. Gebelik süresince en yoğun olarak rastlanılan dönem % 20-25 oranında bulunduğu termdir. Kök villuslar genel olarak 150-300 µm çapında bulunurlar [25]. Yoğun bir fibröz stroma ve bulundukları konuma göre arter ve ven yapıları veya arteriol ve venül yapılarına sahiptirler. Ayrıca stromasında fibroblast ve az sayıda Hofbauer hücreleri de vardır. Kök villuslar kalın bir trofoblast tabakası ile kaplıdır. Stromada bulunan vasküler yapılarda tunika adventisya tabakası ayırt edilebilir. Villus merkezinde bulunan miyofibroblastlar damar çevresinde bir perivasküler kılıf oluşturur [29].

Kök villusların plasentadaki görevi villus ağacına desteklik sağlamaktır. Plasentanın fetal maternal madde geçişi veya hormon üretme görevlerindeki rolü çok azdır. Kök villuslar yapılarındaki farklılığa göre 4' e ayrılır:

Truncus chorii (ana kök villus); koryonik plak ile bağlantılıdır.

Rami chorii; koryonik plak yakınlarında bulunan 4 nesile kadar gelişen kısa, kalın dallardır.

Ramuli chorii; villus ağacının periferine doğru uzanan, daha silindirik bir yapıya sahip, 2 - 30 nesil çoğalabilen çatal şekilli dallardır.

Tutucu (anchoring) villus; sitotrofoblast hücre grupları ile bazal plağa tutunur [29].

## 2.4. Trofoblast Farklılaşması

İmplantasyon ile başlayan plasentasyon süreci, fetal gelişim için gerekli olan iyon, metabolit, oksijen ve atık transferini sağlamak amacı ile hem morfolojik hem de işlevsel olarak gelişen bir durumdur. Plasentasyon boyunca trofoblastlar ve maternal hücreler proliferasyon, invazyon ve farklılaşma aşamalarının bulunduğu karmaşık bir süreçten geçer [36].

Gebeliğin ikinci trimestrinde fetusun artan gereksinimlerini sağlamak için plasenta hızla genişler. Bu süreçte villus ağacı meydana gelir ve farklı tiplerde villuslar oluşur. Plasentasyon sürecinde trofoblastlar iki yolak üzerinden farklılaşırlar. Villus trofoblastlar, mononükleer yapıda olan ve mitotik yeteneğe sahip sitotrofoblastlardan multinükleer yapıda ve mitoz aktivitesi olmayan sinsityum tabakasını oluşturan sinsityotrofoblastlara farklılaşırlar. Oluşan sinsityotrofoblastlar, maternal fetal madde geçişinde görev alır ve plasentanın endokrin işlevini yerine getirmesine katkı sağlar. Sinsityotrofoblastlar, sitotrofoblastların çoğalması ve farklılaşması ile yenilenir ve sinsityum tabakası büyür. Ekstravillöz trofoblastlar, sitotrofoblastların çoğalması ve desiduaya göç etmesiyle endometriyumun yeniden modellenmesi ve vaskülarize olmasını sağlar [36, 37].

Sitotrofoblast farklılaşması ortamda bulunan oksijen, hücrelerarası matriks, sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar tarafından düzenlenir. Özellikle hücre membran füzyonu ve hücrelerin işlevsel olarak farklılaşması estradiol, glukokortikoidler ve insan koryonik gonadotropin tarafından tetiklenir [36, 38].

Farklılaşma sürecinde, membran füzyonu morfolojik farklılaşmanın gerçekleşmesi için önemli bir aşamadır. Sitotrofoblastların birleşmesinde ve sinsityumu oluşturmada yer alan faktörler tam olarak bilinmemekle birlikte bazı moleküllerin bu süreçte arttığı gösterilmiştir. Siklik adenozin monofosfat (cAMP), fosfatidilserin dönüşümü, kaspaz-8, Konneksin 43 (CX 43) ve kadherin 11 trofoblast hücre füzyonunu etkileyen faktörlerdendir



[39]. Ayrıca EGF, granülosit makrofaj koloni-tetikleyici faktör (GM-CSF), makrofaj varlığı ve VEGF farklılaşmayı tetikleyen moleküllerdir. Dönüştürücü büyüme faktörü 1 (TGF-1), endothelin, LIF, ve hipoksik ortam farklılaşma sürecini baskılar [36]. Ayrıca Twist1, Zeb1, Claudin 1 ve 4 plasenta gelişiminde etkin olan diğer moleküllerdir [15]. Yapılan çalışmalar Twist1'in E-kaderin ve glial cells missing-1 (GCM1)'in hücre içindeki protein ifadelerini regüle ederek sitotrofoblast füzyonunda rol aldığını göstermiştir [40, 41]. Ayrıca Ets-1 molekülünün de trofoblast invazyonunda ve farklılaşmasında yer aldığı gösterilmiştir [14, 42].

### Ets-1

Plasentanın gelişim sürecinde trofoblast farklılaşması büyük önem taşır. Sitotrofoblastlar sinsityotrofoblastlara farklılaşırken birçok molekülün ifadesinde çeşitli regülasyonlar meydana gelir. Bu süreçte ifadesi artan transkripsiyon faktörlerden biri de v-ets avian erythroblastokist virüs E26 onkogen homologu (ETS) transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesi olan ve ayrıca lenfoid seri, miyeloid seri, merkezi sinir sistemi ve kemik gelişiminde etkin ETS-1'dir [43]. Proto onkogen olarak da bilinen ETS-1, matriks metalloproteinaz ve kollagenaz gibi hücrelerarası matriksin düzenleniminde rol alan proteinlerin kodlanmasında yer alan transkripsiyon faktörüdür [44]. Araştırmacılar gebeliğin ilerleyen aylarında sağlıklı plasentalarda ETS-1 protein ifadesinin azaldığını göstermişlerdir [42]. Ayrıca ETS-1 transkripsiyon faktörünün insan trofoblast hücre farklılaşmasını indüklediği primer hücre kültürü kullanılarak hem mRNA hem de protein düzeyinde yapılan çalışmalarla ifade edilmiştir [14].

## **2.5. Vaskülogenez ve Anjiyogenez**

Vaskülogenez ve anjiyogenez damar oluşumunda yer alan iki farklı yoldur. Bu yolların mekanizmaları ve regülasyonları birbirinden farklıdır.

Vaskülogenez, gelişimin erken dönemlerinde fibroblast büyüme faktörü 2'nin (FGF2) etkisi ile pluripotent mezenşimal hücrelerin hemanjiyoblastlara farklılaşması ile başlar. Kök hücre özelliği taşıyan hemanjiyoblastlar anjiyoblastlara ve hematopoietik hücre öncüllerine farklılaşır. VEGF varlığında bu hücreler primitif endotel yapılarını oluşturur. Böylece plasentada yer alan damarlar de novo olarak ortaya çıkar. İlk endotel tüplerinin oluşması ve VEGF, FGF reseptörlerinin aktive olmasıyla birlikte damar oluşum süreci vaskülogenezden

anjyogeneze geçer. Vaskülogenez yaklaşık olarak gelişimin 15-32. günlerinde gerçekleşir [17, 30].

Anjiyogeneze var olan damarlardan yeni damarların gelişmesi ile meydana gelen bir süreçtir. Bu gelişme damarların yeni dallar oluşturması veya longitudinal olarak uzaması şeklinde olur. Anjiyogeneze süreci gelişimin 32. gününden başlayıp termine kadar devam eder. Placentel vasküler ağ yapılanması gelişim ilerledikçe doğuma kadar genişlemesini ve yeniden modellenmesini devam ettirir. İlk trimestir ve ikinci trimestirin başlarında yavaş olan damar gelişimi 25. haftadan sonra hızla artar ve termine ulaştığında yaklaşık 550 km uzunluğunda olduğu görülür. Bu süreçte meydana gelen olaylar üç süreçte ele alınabilir. Gelişimin 15. ve 32. günleri arasında periferel kapiller oluşumu geriler ve merkezi kök damarlar gelişir. Gelişimin 32. günü ile 25. haftası arasında dallanma şeklindeki anjiyogeneze artarak kapiller ağını oluşturur. Dallanma olmayan anjiyogeneze terminal kapiller döngüsünü oluşturur [34]. Villus malformasyonları ile anjiyogeneze dallanmaları arasında ilişki vardır. Yüksek oksijen basıncı ve postplasental hipoksi durumunda terminal villuslarda dallanma olmayan anjiyogeneze yaygındır. Düşük oksijen basıncı ile preplasental ve uteroplacentel hipoksi varlığında dallanan anjiyogeneze yaygın olarak meydana gelir. Normal basınca etkin kalan sağlıklı plasentada ise dallanan ve uzayan şekilde meydana gelen anjiyogeneze olayları dengelidir [29, 45]. Yapılan çalışmalarda, düşük oksijen seviyesinin olduğu hipoksi durumlarında trofoblastların farklılaşma sürecinde durma meydana geldiği görülmüştür. Preeklampsi gibi hipoksik durumların ortaya çıktığı patogenezlere trofoblast farklılaşmasının azaldığı, sitotrofoblastların uterusu tam anlamı ile invaze edemediği, vasküler yeniden modellenmenin başarısız olduğu ve bunun sonucunda plasental kanlanmanın azaldığı gösterilmiştir. Sağlıklı fetal gelişimin plasentada gerçekleşen anjiyogeneze regülasyonu ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir [20, 34, 46].

Hem vaskülogenez hem de anjiyogeneze yolları sıkı bir şekilde kontrol edilir. Trofoblastlar, Hofbauer hücreleri, perisitler ve endotel hücreleri anjiyogenik faktörlerin ifade edilmesinde önemlidirler. VEGF, FGF ve Anjiopoetin gibi protein ifadeleri vaskülogenezin ve anjiyogenezin regülatörleridir [34]. VEGF anjiyogenik faktörler arasında en çok araştırılan ve en yaygın olarak bilinen faktörlerden biridir. Mitojenik etkisi ile endotel proliferasyonunu tetikleyerek yeni kapiller filizlenmesine sebep olur. Ayrıca VEGF, nitrik oksit üretimini indükleyerek damar dilatasyonuna sebep olur [47, 48]. VEGF; damar oluşumu, yara iyileşmesi, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi farklı durumlarda aktif olan bir sinyal molekülüdür [49-51]. Kanser hücresi, makrofaj, platelet, keratinosit, renal mezangial hücre

gibi birçok farklı hücre tipinde VEGF üretilir [52].

#### Platelet Endotel Hücre Adezyon Molekülü-1 (PECAM/CD31)

Endotel hücreleri, anjiyogenez durumunda hücre-hücre bağlantıları kurar, sinyal moleküllerinin varlığında göç eder, perivasküler hücrelerarası matrikste çoğalarak yeni kapiller ağları oluşturur. Bu süreçte adezyon molekülleri önemli rol oynar. Endotel hücreleri adezyon molekülü olan, vasküler endotel kaderin ve platelet endotel hücre adezyon molekülü-1 (PECAM/CD31) proteinlerini üretirler. İmmunoglobulin ailesine ait olan membran glikoproteini PECAM/CD31, genellikle lateral plasma membranında bazale yakın olarak konumlanır. Moleküler ağırlığı 130 kDa olan PECAM/CD31, hem homofilik hem de heterofilik adezyona aracılık etme özelliğine sahiptir. Yapılan çalışmalar PECAM/CD31 inhibe edildiğinde in vitro tüp oluşumunun ve sıçan korneal anjiyogenezin bloklandığını göstermiştir [53]. Anjiyogenez belirteci olarak da kullanılan CD31'in kanser dokusu, böbrek, karaciğer, akciğer ve plasenta gibi farklı dokularda ifade edildiği immunohistokimyasal yöntemler ile gösterilmiştir [9, 54, 55].

## **2.6. Diabetes Mellitus**

Günümüzde artan hareketsiz yaşam ve düzensiz beslenmenin etkisi ile toplumumuzda diyabet görülme sıklığı giderek artmaktadır [5]. 2004 yılında yayınlanan bir çalışmada diyabet prevalansı 2000 yılında % 2,8 iken 2030 yılı için öngörülen oran % 4,4'tür. Bu oranlar 2000 yılında 171 milyon kişiyi ifade ederken, 2030 yılında bu rakamın 366 milyona ulaşacağı tahmin ediliyor. Obezite prevalansı sabit kalmasına rağmen diyabet prevalansının artması bu konudaki araştırmalara önem verilmesi gerektiğini gösteriyor [56]

Diyabet metabolik bir hastalık olup, kalıtsal olabilir veya sonradan gelişebilir. İnsulin üretimindeki eksiklik ya da yetersizlik veya üretilen insülinin etkili olmaması sebebi ile kandaki glukoz seviyesi artar. Dolaşımda bulunan yüksek konsantrasyondaki glukoz seviyesi uzun süre devam ederse göz, kalp, böbrek, sinir sistemi ve kan damarlarında işlev bozukluğuna ve ileri dönemde organ kayıplarına sebep olur [57, 58].

Son yayınlanan Amerikan Diyabet Derneği tanı kriterlerine göre açıklanamayan kilo kaybı, yorgunluk, polidipsi ve poliüri varlığında rastgele ölçülen kandaki glukoz konsantrasyonunun  $\geq 200$  mg/dl olması veya açlık (8 saat kalori alınmaması) glukoz değerinin  $\geq 126$  mg/dl olması veya oral glukoz testinde 75 gr şeker verilmesinden 2 saat

sonra glukoz konsantrasyonunun  $\geq 200$  mg/dl olması durumunda diyabet tanısı konulur [58, 59].

Diabetes Mellitus (DM) etiyolojik olarak 4 farklı diyabet tipine ayrılır; tip-1 DM (T1DM), tip-2 DM (T2DM), gestasyonel DM (GDM) ve diğer özgün diyabet tipleri [58].

### **2.6.1 Tip-1 diabetes mellitus**

Pankreasta bulunan  $\beta$ -hücrelerinin yıkılmaları sebebi ile meydana gelen ve yaşamın devamı için insülin alınması gereken diyabet tipidir. Pankreas insülin üretemediği için ketoasidoz veya koma gelişmesini önlemek amacıyla insülin alımı çok önemlidir.

İmmun-aracılı diabetes mellitus (immune-mediated DM) tip-1 diyabetin sık rastlanan, her yaşta ortaya çıkabilen, klasik şeklidir. Hücre-aracılı otoimmün reaksiyon sonucunda pankreatik  $\beta$ -hücrelerinin yıkımı ve insülin üretilmemesi ile açıklanan bir patolojidir. Hücre yıkımı her kişide aynı hızda olmaz, genel olarak çocuklarda hızlı bir yıkım olurken, yetişkinlerde daha yavaş olduğu görülür [60].

Tip-1 DM altında değerlendirilen diğer diyabetik patoloji ise idiyopatik olarak ifade edilen etiyolojisi veya herhangi bir otoimmün belirtisi bulunamayan tip-1 DM formudur. Tip-1 diyabeti olan kişilerin çok azı idiyopatik diyabete sahiptir [58].

### **2.6.2 Tip-2 diabetes mellitus**

Toplumda en yaygın olarak görülen diyabet tipidir. İnsülin bağımsız diyabet olarak da ifade edilir. Geçmişte prevalansı genel olarak yetişkinler arasında iken günümüzde çocuklarda ve gençler arasında da sık rastlanmaya başlamıştır [61]. Bunun sebebi olarak çocukluk çağında hareketsiz yaşamın ve obezitenin artması olarak görülmektedir. Bu yüzden fazla kilolu çocuk ve gençlerin tip-2 diyabet taramasından geçirilmesi tavsiye edilir [62].

Tip-2 diyabet patolojisinde organlarda insülin direnci görülür, insülin üretimi azalır ve son aşamasında  $\beta$ -hücrelerinde yıkım meydana gelir. Bazı hastalarda uzun yıllar hiç bir belirti görülmez. Bazı hastalarda hastalığın başlangıç evresinde insülin kullanımı gerekmeyebilirken, bazı hastalarda mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar gelişebilir. Yaş, fiziksel aktivite azlığı, gestasyonel diyabet geçmişi ve obezite tip-2 diyabet riskini arttıran faktörlerdir. Tip-2 diyabet genetik, çevresel ve davranışsal risk faktörlerinin birbiri ile olan ilişkisine bağlı olarak gelişir [60, 63].

### 2.6.3 Spesifik tip diyabetler

Etyolojik olarak diğer diyabet tipleri altında değerlendirilmeyen özel diyabet tipleri mevcuttur. Pankreas yaralanmaları, pankreatektomi veya pankreatit gibi ekzokrin pankreas hastalıkları sonucunda diyabet ortaya çıkabilir. Genetik kaynaklı  $\beta$ -hücresi işlev bozuklukları ve insülin etki bozuklukları gibi durumlarda diyabet görülebilir.  $\gamma$ -interferon, glukokortikoidler,  $\beta$ -adrenerjik agonistleri ve tiroid hormonları gibi ilaç ve kimyasal maddeler diyabeti indükleyebilir. Konjenital rubella, sitomegalovirüs gibi enfeksiyon hastalıkları diyabeti tetikleyebilir. Akromegali, Cushing sendromu gibi endokrinopatiler diyabete sebep olabilir. Ayrıca Down sendromu, Turner sendromu, miyotonik distrofi gibi genetik anomaliler diyabet ile ilişkili olabilir [58].

### 2.6.4 Gestasyonel diabetes mellitus

Gebeliğin ikinci ve üçüncü trimestirinde ortaya çıkan hiperglisemi durumudur. Artan maternal yaş, obezite prevalansı ile gestasyonel diabetes mellitus (GDM) görülme sıklığı artar. GDM, anne ve bebek için sezeryan, makrosomia ve neonatal hypoglisemia gibi şiddetli komplikasyonlara sebep olur [64].

Gestasyonel diyabeti, gebeliğin tetikleyebileceği gibi gebelik öncesinde tanısı konulmayan tip-2 diyabet de gebelikle birlikte ortaya çıkabilir. Gestasyonel diyabet varlığı gebelikten sonra ortadan kalkıp yüksek olan glukoz seviyesi normal glukoz seviyesine dönebilir veya hiperglisemi varlığı devam edebilir. Gestasyonel diyabet tanısının konulabilmesi için 24-28. haftalarda kandaki glukoz seviyesine bakılır. Tanı kriteri Hiperglisemi ve Olumsuz Gebelik Sonuçları (Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome) çalışmasından elde edilen; FPG  $\geq 92$  mg/dl, 75 gr glukoz yüklemesi yapıldıktan 1 saat sonra plazma glukoz konsantrasyonu  $\geq 180$  mg/dl veya 2 saat sonra plazma glukoz  $\geq 153$  mg/dl olduğu değerlerdir. Hiperglisemik ortam gebelik sona erdikten sonra normal değerlere döner veya tip-2 diyabete dönerek kronik bir hal alır [62].

Gebelik sürecinde gestasyonel diyabetli bazı gebelerin doğan çocuklarında bazen çok kilolu veya obez olma, yüksek kan basıncı, insülin direnci, bozulmuş glukoz toleransı ve dislipidemi gibi patogenepler ortaya çıkmaktadır. GDM tedavisi için gebelere fiziksel aktivite, uygun diyet ve oral antidiyabetik ajanlar verilir. Yapılan egzersizler, GDM riskini azaltır [60].

### 2.6.5 Maternal diyabet ve plasenta

Gebelik süresince kontrol altına alınmayan maternal diyabet durumlarında plasenta genişler, kalınlaşır ve pletorik bir hal alır. Ayrıca Rizzo ve ark. (1995) sonografik olarak incelenen fetal kardiyak aktivite ve kan akışının değiştiğini ve bu değişimin fetal kardiyak hipertrofinin bir sonucu olabileceğini belirtmiştir [29, 65].

Gebelikte var olan diyabette plasental villus yapıları tam olarak olgunlaşmayabilir. Villus yapılarındaki trofoblast sayısında görülen artışın, trofoblast proliferasyon insidansının arttığına dair bir gösterge olabileceği düşünülmektedir [29, 66].

Diyabetik gebeliklerde, doğum ağırlığı normal gebeliklere göre daha fazla olabilir. Bunun sebebi olarak plasentayı geçen glukozun oluşturduğu hiperglisemik ortama yanıt olarak fetusun salgıladığı insülin miktarını arttırması ve Langerhans adacıklarının hiperplaziye uğraması olduğu araştırmacılar tarafından düşünülmektedir [29].

Maternal diyabet, plasenta ve umbilikal damarlarda tromboz oluşumu ile ilişkilidir. Ayrıca GDM'li plasentalarda fazla miktarda enzimatik olmayan glikozilasyon, tip IV kollagen artışı ile bazal membran kalınlaşması görülür [29].

### 2.7. Hipotez

Plasenta, gebelikte önemli bir endokrin işleve sahiptir. Ayrıca fetal gelişim plasentanın kontrolü altındadır. Bu yüzden çeşitli sistemik hastalıkların, patolojilerin plasenta gelişimine etki ederek fetal gelişimi etkileyebileceği düşünülmektedir. Gebelikte kontrol altına alınmayan veya iyi kontrol edilemeyen diyabetik durumlarda preeklampsi, respiratuvar distres sendromu, hipertrofik kardiyomiyopati, abortus ve enfeksiyon riskinde artış gibi durumlar ortaya çıkmaktadır. Hiperglisemik durumda plasentada meydana gelen patolojik değişikliklerin bu gibi fetal endikasyonlara sebep olabileceği düşünülmektedir [67]. Bu bağlamda, amacımız tip-2 ve gestasyonel diyabetli gebe plasentalarında oluşabilecek değişiklikleri değerlendirmek ve bunların fetal gelişim üzerine etkilerini doğum ağırlığı, plasental ağırlık ve gebelik süresi gibi ölçütler ile sağlıklı gebelerden elde edilecek bulgularla karşılaştırmalı olarak yorumlamaktır.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, TC. Sağlık Bakanlığı Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan 11/2017 karar nolu etik kurul onayı alınarak yapıldı. Çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda miadında sonlanmış tekil gebeliklerden elde edilen plasenta örnekleri kullanıldı. Çalışmada kullanılan doku örneklerinin sağlanması için doğum öncesinde gönüllü gebelere, yürütülen çalışma ile ilgili bilgi verilerek bilgilendirilmiş gönüllü olur formu onaylatıldı. GDM tanısı, gebeliğin 24–28. haftaları arasında yapılan 75 gr oral glukoz tolerans testi (OGTT) ile konuldu. Klinik veriler tıbbi kayıtlardan elde edildi.

Çalışma sağlıklı ve gestasyonel diyabetli gebe gruplarında 15'er, tip-2 diyabetli gebe grubunda 8 kişi olacak şekilde üç gruptan oluşmakta ve toplam 38 plasenta örneği içermektedir.

**Grup 1:** (n=15) Kan glukoz düzeyi normal değerlerde olan sağlıklı gebeler.

**Grup 2:** (n=8) Gebelik öncesi Tip-2 Diabetes Mellitus (T2DM) tanısı konulan ve insülin tedavisi alan gebeler.

**Grup 3:** (n=15) Gebelikte Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM) tanısı konulan ve diyetle regüle edilen gebeler.

- Kronik hipertansiyon
- Böbrek hastalığı
- Preeklampsi
- İntrauterin gelişme geriliği
- Fetal anomalisi olan ve
- İntrauterin ölüm olguları çalışma dışı bırakılmıştır.

Doğumdan hemen sonra alınan plasenta örnekleri tartıldıktan sonra histolojik inceleme için maternal tarafta bulunan, normal yapıdaki kotiledonlardan disseksiyon yapılarak % 10'luk nötral formalin solüsyonuna konuldu. Yine aynı bölgeden alınan diğer doku örneği de Western blot yönteminde kullanılmak üzere serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra sıvı azot ile hızlı dondurma yöntemi uygulandı ve protein izolasyonu yapılana kadar -80 °C'de muhafaza edildi.



### 3.1 Histolojik Boyama Yöntemleri

Plasentada meydana gelen morfolojik değişimleri incelemek amacı ile alınan doku örnekleri % 10'luk nötral formalin ile 72 saat tespit edildikten sonra en az 18 saat akan su altında formalinden uzaklaştırıldı. Bu dokular rutin histolojik takip amacı ile % 70, % 80, % 90, % 96 ve % 100 alkol serilerinden geçirilerek sudan uzaklaştırıldı. Şeffaflandırma işlemi için ksilolde bekletildikten sonra uygun sıcaklıktaki parafine gömülerek bloklar elde edildi.

Elde edilen bloklardan Leica RM2245 (Almanya) marka mikrotom kullanılarak 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Belirli sıcaklıktaki su banyosundan histolojik boyamalar için rodajlı lama, immünohistokimyasal boyamalar için poly-L-lizin kaplı lama kesitler alındı.

#### 3.1.1 Hematoksilen-Eozin (HE) boyama yöntemi

Plasentada meydana gelen histolojik değişimleri incelemek amacı ile Hematoksilen-Eozin boyaması yapılmıştır.

- Rodajlı lam üzerindeki kesitler deparafinizasyon yapılması amacı ile 37 °C sıcaklıktaki etüvde gece boyunca kaldıktan sonra etüv ısısı 57 °C'ye yükseltilerek deparafinizasyon işlemini tamamlamak için 1 saat daha bekletildi.
- Bu işlemin devamında kesitler 3 defa 20'şer dakika boyunca ksilolde bekletildi.
- Rehidratasyon amacı ile % 100, % 90, % 80, % 70 ve % 50 etil alkol serilerinde 10 dakika bekletildi.
- Kesitler kurutulduktan sonra 10 dakika boyunca akan musluk suyu altında yıkanarak alkolden uzaklaştırıldı.
- 12 dakika boyunca Harris hematoksilen solüsyonunda bekletildikten sonra akan musluk suyu altında 10 dakika süresince yıkandı.
- Kesitler %3'lük glasiyel asetik asit ile alkol karışımına 2-3 defa batırılıp çıkarılarak akan musluk suyu altında 10 dakika yıkandı.
- 12 dakika boyunca Eozin solüsyonunda bekletildikten sonra 10 dakika boyunca akan musluk suyu ile yıkandı.
- Dehidratasyon amacı ile % 50, % 70, % 80, % 90 ve % 100 olarak hazırlanan etil alkol serilerinden hızlı bir şekilde geçirilerek 45 dakika boyunca ksilolde bekletildi.
- Son aşama olarak lamlar entellan kullanılarak kapatıldı.

### 3.1.2 Periyodik asit shiff (PAS) boyama yöntemi

Tip-2, gestasyonel diyabetli ve sağlıklı gebelerden alınan örneklerden hazırlanan parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alındı.

- Rodajlı lam üzerindeki kesitler deparafinizasyon yapılması amacı ile 37 °C sıcaklıktaki etüvde gece boyunca kaldıktan sonra etüv ısısı 57 °C'ye yükseltilerek deparafinizasyon işlemini tamamlamak için 1 saat daha bekletildi.
- Daha sonra kesitler 2 defa 5'er dakika boyunca ksilolde bekletilerek deparafinizasyon işlemi sonlandırıldı.
- 2 defa 3 dakika boyunca % 100'lük etil alkolde bekletildikten sonra sırası ile % 90, % 80 ve % 70 olarak hazırlanan etil alkol serilerinden geçirildi.
- Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra % 0,5'lik Periyodik asit solüsyonunda 10 dakika boyunca bekletildi.
- Daha sonra distile su ile çalkalandı ve periyodik asit solüsyonu uzaklaştırıldı.
- Schiff reaktifinin bulunduğu solüsyon içinde 20 dakika boyunca bekletildi ve sonra sodyum metabisülfid ile 2 defa 5 dakika boyunca yıkandı.
- Sonrasında 10 dakika boyunca akan musluk suyunda yıkama yapıldı.
- 10-15 saniye süresince Harris Hematoksilen ile boyanan kesitler akan musluk suyu ile yıkandı.
- Lamlar azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra ksilolde bekletilip entellan ile kapatıldı. Hazırlanan kesitler bilgisayar destekli LAS V 4.9 (Almanya) görüntülü analiz programında incelenerek değerlendirildi.

### 3.1.3 Masson'nun üçlü boyama yöntemi

Tip-2, gestasyonel diyabetli ve sağlıklı gebelerden alınan örneklerden hazırlanan parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alındı.

- Rodajlı lam üzerindeki kesitler deparafinizasyon yapılması amacı ile 37 °C sıcaklıktaki etüvde gece boyunca kaldıktan sonra etüv ısısı 57 °C'ye yükseltilerek deparafinizasyon işlemini tamamlamak için 1 saat daha bekletildi.
- Bu işlemin devamında kesitler 2 defa 5'şer dakika boyunca ksilolde bekletildi.

- 2 defa 3 dakika boyunca % 100'lük etil alkolde bekletildikten sonra % 90, % 80 ve % 70 olarak hazırlanan etil alkol serilerinden geçirildi.
- Kesitler kurutulduktan sonra 10 dakika boyunca akan musluk suyu altında yıkanarak alkolden uzaklaştırıldı.
- Kesitler boyamaya hazır hale geldikten sonra Atom Scientific BIOSTAIN Masson Trichrome Stain Kit – Methly Blue (Code: RRSK20-100) kiti önerilen protokole göre uygulandı.
- Weigert Hematoksilen solüsyonu Haematoxylin Weigert's A ve Haematoxylin Weigert's B solüsyonları eşit hacimde karıştırılarak hazırlandı.
- Kesitler suyla yıkandıktan sonra PAP Pen ile sınırları belirlendi ve Weigert's Demirli Hematoksilen ile 25 dakika boyunca çekirdek boyaması yapıldı.
- Ardından dokular % 1'lik asit alkol solüsyonu ile yıkandı.
- Yıkanan kesitler Ponceau Fuchsin solüsyonu ile 5 dakika boyama yapıldı ve deiyonize su ile yıkandı. Kesitler Fosfotungustik asitte 13 dakika tutularak mordantlaştırıldı.
- Yıkama yapılmadan 15 dakika Metil Blue ile boyandı ve sonrasında suda yıkandı.
- Alkol serilerinden geçirilerek ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.
- Deney sonunda nükleuslar mavi-siyah; sitoplazma ve kas kırmızı; kollagen lifler mavi olarak gözlemlendi.

#### **3.1.4 İmmünohistokimyasal boyama yöntemi**

Plasenta örneklerindeki trofoblast gelişimi, Hofbauer hücreleri ve anjiyogenez olaylarının incelenmesi amacıyla ETS-1, CD68 ve CD31 antikorları kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapıldı.

- Poly-L-lizin kaplı lama üzerindeki kesitler deparafinizasyon yapılması amacı ile 37 °C sıcaklıktaki etüvde gece boyunca kaldıktan sonra etüv ısısı 57 °C'ye yükseltilerek deparafinizasyon işlemini tamamlamak için 1 saat daha bekletildi.
- Bu işlemin devamında kesitler 2 defa 20'er dakika boyunca ksilolde bekletildi.
- Rehidratasyon amacı ile % 100, % 90, % 80, % 70 ve % 50 etil alkol serilerinde 10 dakika boyunca bekletildi.
- Dokular içerdikleri alkolden uzaklaştırılmak amacı ile 2 defa 5'er dakika boyunca distile suda bekletildi.

- Dokular EDTA tamponu (pH 8,0) (Cat: AP-9004-500, ThermoScientific, Fremont, USA) kullanılarak ısı ile indüklenmiş epitop retrieval işlemi yapıldı. Retrieval aşamasından sonra kesitler oda sıcaklığında 20 dakika boyunca soğumaya bırakıldı.
- Dokulardaki EDTA'yı uzaklaştırmak amacı ile 2 defa 5'er dakika distile su ile yıkama yapıldı.
- Dokular PAP-pen ile sınırlandırılarak immünohistokimya barına koyuldu ve 3 defa 3'er dakika boyunca PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH:7,4) ile yıkandı.
- Dokular 15 dakika boyunca %3'lük hidrojen peroksit (Cat: TA-125-HP, ThermoScientific, Fremont, USA) ile inkübe edildi ve sonra PBS ile lamalar 3 defa 3'er dakika boyunca yıkandı.
- Yıkamanın ardından 5 dakika UltraV block (Cat: TP-125-HL, Thermo Scientific, Fremont, USA) uygulanarak, antikorlara özgün olmayan bağlanmalar blokladı.
- Bloklamadan sonra dokular yıkanmadan, 1/500 oranında dilüsyon hazırlanan CD68 (ABCAM, ab125212), 1/200 oranında dilüsyon hazırlanan CD31 (ABCAM, ab28364) ve 1/100 oranında dilüsyon hazırlanan ETS-1 (ABCAM, ab26096) primer antikor ile +4 °C derecede 1 gece inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında lamalar 3 defa 3'er dakika boyunca PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından 10 dakika biotinli sekonder antikor (Cat:TP-125-HL, Thermo Scientific) uygulandı.
- PBS ile yıkanan dokular 10 dakika streptavidin peroksidaz enzimi (Cat:TP-125-HL, Thermo Scientific) ile inkübe edildi. Sonrasında 3 defa 3'er dakika boyunca PBS ile yıkama yapıldı.
- Hazırlanan Diaminobenzedin (DAB) (Cat: Tl-125-HD, Thermo Scientific) solüsyonu ile 5-10 dakika inkübe edildi ve immün reaksiyon varlığı görüldükten sonra reaksiyon durduruldu.
- Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksilin'i kullanıldı.
- Lamlar azalan alkol serilerinden geçirildi ve 20 dakika ksilolde bekletildi.
- Dokular entellan ile kapatıldıktan sonra LAS V 4.9 (Almanya) görüntülü analiz programında incelenerek değerlendirildi.

### 3.2 Western Blot Yöntemi

Tip-2 ve gestasyonel diabetes mellitus'un plasentada sebep olduğu değişiklikleri protein düzeyinde gözlemleyebilmek amacı ile Western Blot yöntemi kullanıldı.

- Doğumdan sonra plasenta elde edilir edilmez alınan örnekler serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra sıvı azota atılıp, dondurulup -80 °C 'de saklandı. Daha sonra küçük parçalar halindeki örnekler TPER (Tissue Protein Extraction Reagent) (Cat:78510, ThermoScientific) liziz tamponu kullanılarak prob sonikatör ile (5 sn 40 amplitüt, 4 kez) homojenize edilip 14000 g, 10 dakika +4 °C sentrifüj edilerek supernatant kısmından proteinler elde edildi.
- Elde edilen proteinlerin Bradford yöntemi kullanılarak konsantrasyonları belirlendi. Hazırlanan SDS-PAGE jeline tüm örnekler aynı konsantrasyonda yüklenerek 100 voltta jelde yürütme işlemi yapıldı.
- Daha sonra membrana transfer işlemi yapıldı. Bu işlemten sonra membran 1 saat oda sıcaklığında %5 oranında TBS-T (Tris Buffered Saline-Tween 20) ile hazırlanan yağsız süt içinde bloklama amacı ile sallandı. Bloklama işleminden sonra 3 defa 5'şer dakika boyunca TBS-T ile yıkandı.
- Yağsız sütün içine alınan membran hazırlanan; 1/500 oranında CD68 (ABCAM, ab125212), 1/500 oranında CD31 (ABCAM, ab28364) ve 1/350 oranında ETS-1 (ABCAM, ab26096) primer antikor ile +4 °C derecede 1 gece inkübe edildi.
- Sonrasında 3 defa 5'şer dakika boyunca TBS-T ile yıkanıp uygun sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında sallandı. Membran 3 defa 5'şer dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra ECL Western Blot Substrate kiti ile hazırlanıp BioRad ChemiDoc görüntüleme sistemi ile görüntülemesi ve densitometrik analizi yapıldı.

### 3.3 İstatistiksel Yöntem

Deney sonuçlarından elde edilen veriler GraphPad Prism 5 programı kullanılarak analiz edildi.

Sağlıklı, gestasyonel diyabetli ve tip-2 diyabetli gebelerden oluşan 3 grubun tanımlayıcı istatistikleri ortalama  $\pm$  SD ile sunuldu. Verilere Shapiro-Wilk testi uygulanarak normal dağılıma uygunluğu belirlendi. Parametrik verilerin değerlendirilmesinde One-Way ANOVA ve sonrasında post hoc Tukey testleri uygulandı. Nonparametrik verilerin

değerlendirilmesinde Kruskal Wallis testi ve ardından post hoc Dunn'un çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

Hofbauer hücre değerlendirmesi için her kesitten rastgele seçilen 6 alandaki CD68 immünpozitif hücreler Image J programı kullanılarak sayıldı. Villus stromasındaki pozitif hücreler sayılırken, intervillus boşluk ve damar içindeki pozitif hücreler sayıma dâhil edilmedi [10].

CD31 ile villuslardaki damarlanma değerlendirmesi için her kesitten rastgele seçilen 5 farklı alanda 20 villus stromasındaki damarlar sayıldı ve villus alanı ( $1000 \mu\text{m}^2$ ) ile normalize edilerek Image J programı ile değerlendirildi [68].

ETS-1 değerlendirmesi için her kesitten rastgele seçilen 6 alandaki sinsityotrofoblast hücrelerinin tutulum yoğunluğu semikantitatif olarak 0 (immünreaktivite yok), 1 (zayıf immünreaktivite), 2 (orta düzeyde immünreaktivite), 3 (kuvvetli düzeyde immünreaktivite) şeklinde skorlandırıldı. Değerlendirme sinsityotrofoblastların skorlanması ile yapıldı, villus bağ dokusunda bulunan immünpozitif hücreler dâhil edilmedi [11].



## 4. BULGULAR

### 4.1 Hastaların Klinik Özellikleri

Kontrol, T2DM ve GDM gruplarında ortalama maternal yaş  $28,2 \pm 4$ ;  $31,4 \pm 4$  ve  $34,2 \pm 5$ ; gebelik haftası  $38 \text{ h } 5 \text{ g} \pm 1$ ,  $37 \text{ h } 4 \text{ g} \pm 1$  ve  $38 \text{ h } 4 \text{ g} \pm 1$ ; doğum ağırlığı  $3371 \pm 484$  gr,  $3587 \pm 621$  gr ve  $3497 \pm 347$  gr; plasenta ağırlıkları  $574,5 \pm 94$  gr;  $697 \pm 09$  gr ve  $649,8 \pm 155$  gr (sırası ile) olarak belirlendi. İstatistiksel değerlendirmede; GDM grubunda maternal yaş, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p < 0.01$ ). HbA1C (%) değerlerinin T2DM grubunda GDM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu saptandı ( $p < 0.05$ ).

**Çizelge 4.1** Klinik Özellikler

|                               | <b>Kontrol (n:15)</b>             | <b>Tip-2 DM (n:8)</b>             | <b>GDM (n:15)</b>                 |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Maternal yaş (yıl)</b>     | $28,2 \pm 4$                      | $31,4 \pm 4$                      | $34,2 \pm 5^{**}$                 |
| <b>Gebelik Haftası</b>        | $38 \text{ h } 5 \text{ g} \pm 1$ | $37 \text{ h } 4 \text{ g} \pm 1$ | $38 \text{ h } 4 \text{ g} \pm 1$ |
| <b>Doğum ağırlığı (gr)</b>    | $3371 \pm 484$                    | $3587 \pm 621$                    | $3497 \pm 347$                    |
| <b>Plasenta ağırlığı (gr)</b> | $574,5 \pm 94$                    | $697,4 \pm 117$                   | $649,8 \pm 155$                   |
| <b>HbA1C (%)</b>              | -                                 | $6,1 \pm 0,9^*$                   | $5,17 \pm 0,5$                    |

### 4.2 Işık Mikroskopik Bulgular

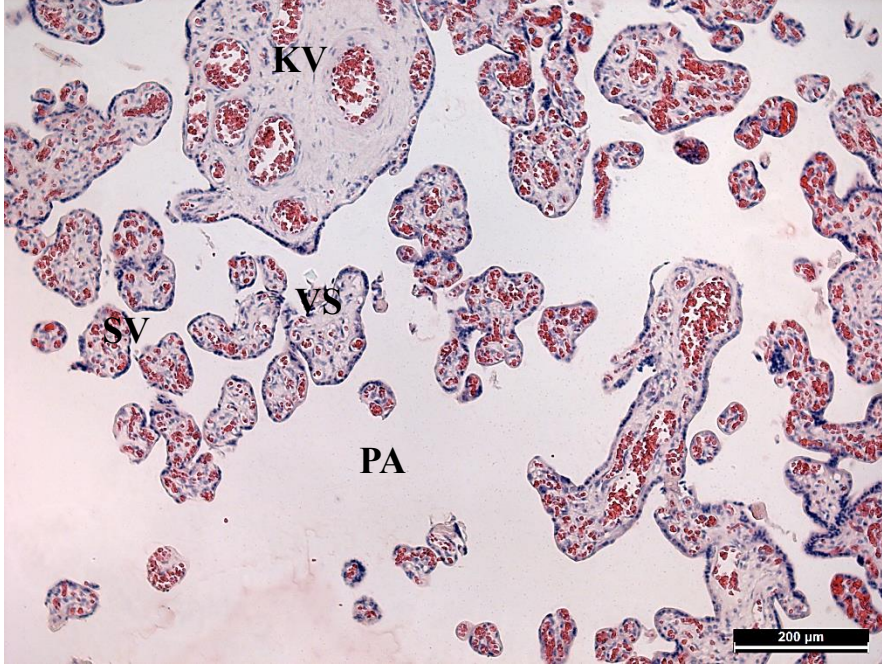
#### 4.2.1 Hematoksilen-Eozin bulguları

Kontrol grubuna ait plasentaların Hematoksilen-Eozin ile boyanmış kesitlerinde, kök villuslar, serbest villuslar, villus stroması, stroma içindeki kapillerler, villus stromal hücre çekirdekleri ve perivillöz aralık normal yapı ve düzenlenimde görüldü (Resim 4.1-4.2).

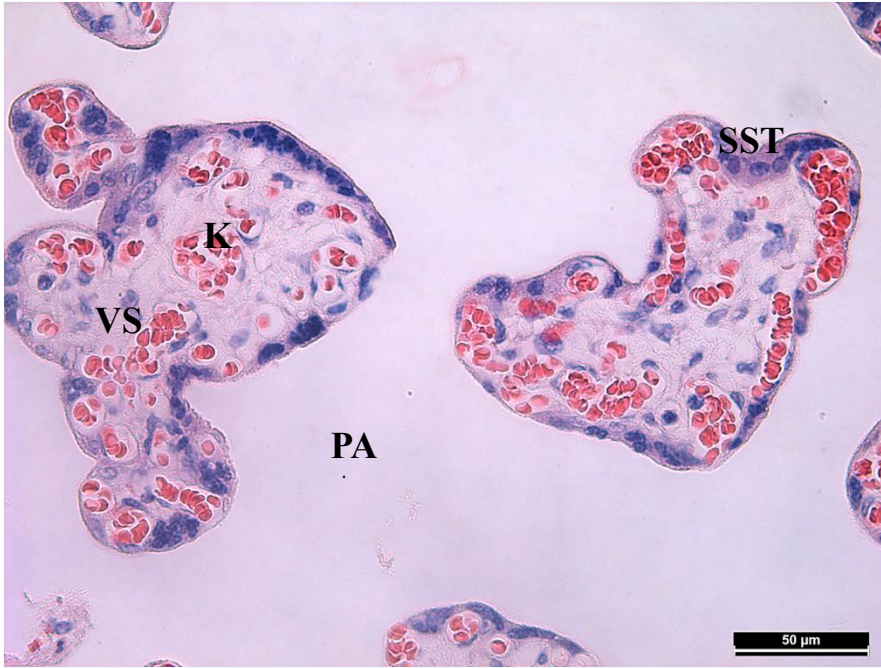
T2DM grubuna ait plasentaların Hematoksilen-Eozin ile boyanmış kesitlerinde villus kapiller varlığında artış, endovillöz kapillerlerde konjesyon ve dilatasyon, sinsityal düğümlerde ve fibrinoid yapısında artış ve perivillöz aralıkta ekstrasvazasyon saptandı (Resim 4.3-4.4).

GDM grubuna ait plasentaların Hematoksilen-Eozin ile boyanmış kesitlerinde villuslarda ödem, hiperkapillarizasyon, endovillöz kapillerlerde konjesyon ve dilatasyon, sinsityal düğümlerde ve fibrinoid yapısında artış ve perivillöz aralıkta ekstrasvazasyon saptandı (Resim 4.5-4.6). GDM grubu ile T2DM grubu birbirleri ile karşılaştırıldığında, GDM grubunda biraz daha yoğun bir kapillarizasyon olduğu görülürken T2DM grubunda daha yoğun fibrinoid yapısı ile sinsityal düğüm varlığı dikkat çekti.



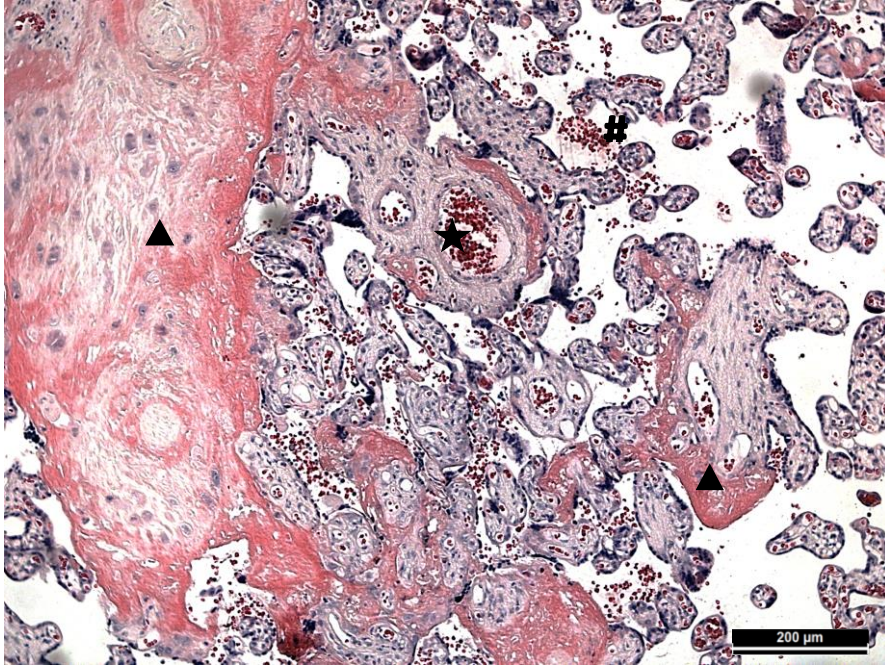


**Resim 4.1** Kontrol grubuna ait plasenta dokusunun HE ile boyanmış enine kesiti. Kök villus (KV), serbest villus (SV), villus stroması (VS), perivillöz aralık (PA) görülmekte (Hematoksilen-Eozin, x100)

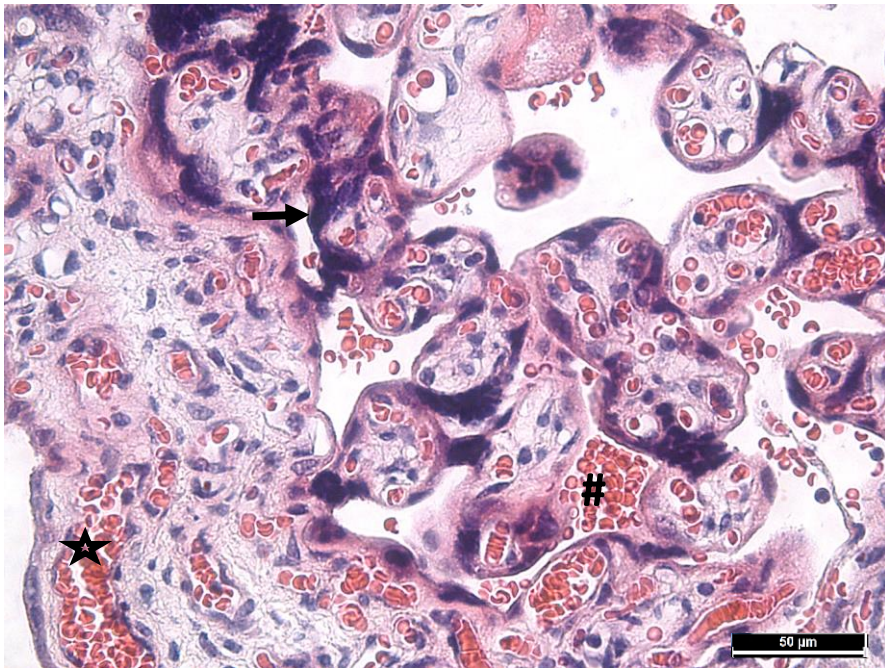


**Resim 4.2** Kontrol grubuna ait plasenta dokusunun büyük büyütmede HE ile boyanmış enine kesiti. Villus stroması (VS), kapiller (K), perivillöz aralık (PA), stromal hücre çekirdekleri, sinsityotrofoblastlar (SST) görülmekte (Hematoksilen-Eozin, x400)



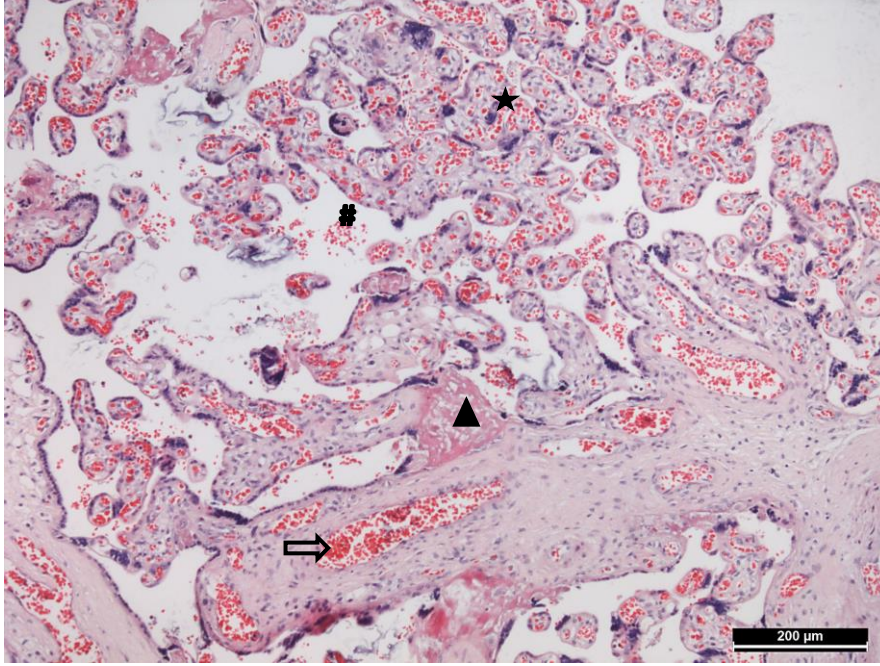


**Resim 4.3** Tip-2 diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusunun HE ile boyanmış enine kesiti. Endovillöz kapillerlerde konjesyon ve dilatasyon (★), fibrinoid yapısında (▲) artış, perivillöz aralıkta ekstravazasyon (#) görülmekte (Hematoksilen-Eozin, x100)

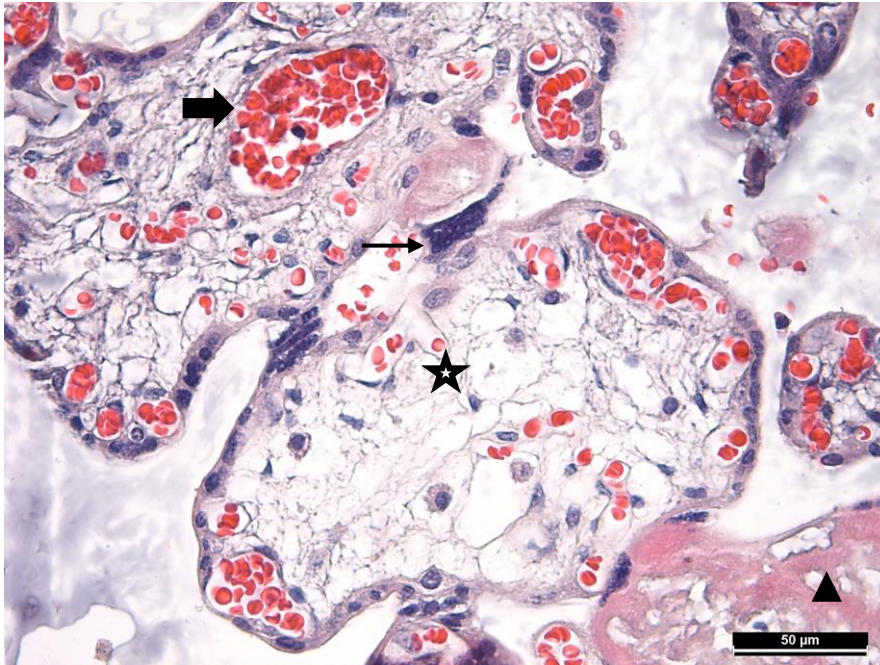


**Resim 4.4** Tip-2 diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusunun HE ile boyanmış büyük büyütmede enine kesiti. Sinsityal düğümlerde artış (→), endovillöz kapillerlerde konjesyon (★), perivillöz aralıkta ekstravazasyon (#) görülmekte (Hematoksilen-Eozin, x400)





**Resim 4.5** Gestasyonel diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusunun HE ile boyanmış enine kesiti. Endovillöz kapillerlerde konjesyon ve dilatasyon (⇨), fibrinoid yapısında (▲) artış, perivillöz aralıkta ekstrasvazyon (#) ve hiperkapillerizasyon (★) görülmekte (Hematoksilen-Eozin, x100)



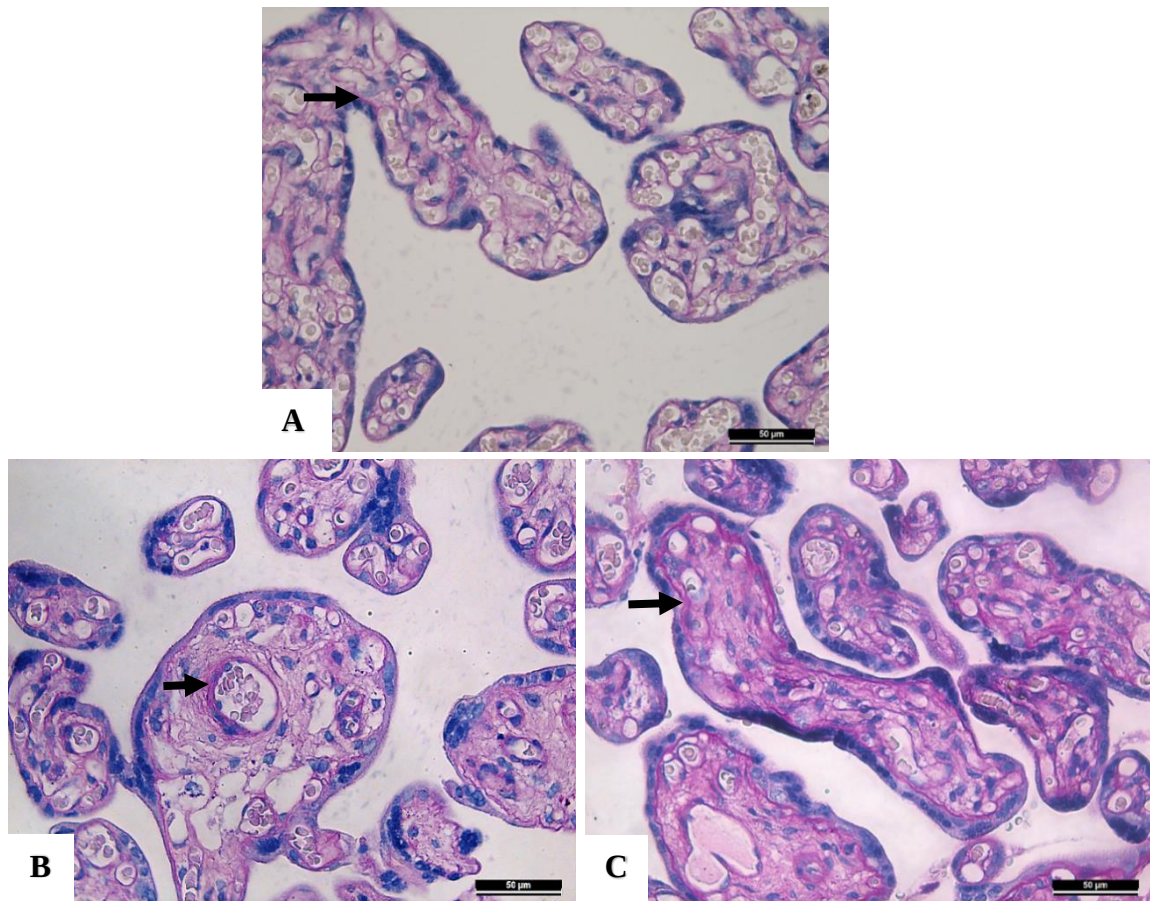
**Resim 4.6** Gestasyonel diabetes mellitus grubuna ait plasenta dokusunun HE ile boyanmış büyük büyütmede enine kesiti. Villuslarda ödem (★), endovillöz kapillerlerde konjesyon (⇨), sinsityal düğümlerde (→) ve fibrinoid yapısında (▲) artış görülmekte (Hematoksilen-Eozin, x400)

#### 4.2.2 Periyodik asit schiff (PAS) bulguları

Kontrol grubuna ait plasentaların PAS ile boyanmış kesitlerinde villus bazal membranının normal kalınlıkta olduğu izlendi (Resim 4.7-A).

T2DM grubuna ait plasentaların PAS ile boyanmış kesitlerinde büyük büyütmede kontrol grubuna göre villus kapiller ve sinsityotrofoblast bazal membranın kontrol grubuna göre daha belirgin olduğu görüldü (Resim 4.7-B).

GDM grubuna ait plasentaların PAS ile boyanmış kesitlerinde büyük büyütmede kontrol grubuna göre daha kalın sinsityotrofoblast bazal membran varlığı tespit edildi. Ayrıca villus stromasında PAS pozitif alanların kontrol grubuna göre daha belirgin olduğu görüldü. GDM ve T2DM grubu karşılaştırıldığında GDM grubunda sinsityotrofoblast bazal membran kalınlaşmasının T2DM grubuna göre daha belirgin olduğu dikkat çekti (Resim 4.7-C).



**Resim 4.7** Kontrol grubu (A), Tip-2 diabetes mellitus grubu (B) ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna (C) ait placenta dokusunun PAS ile boyanmış enine kesiti. Kontrol grubuna göre T2DM ve GDM gruplarında belirgin bir şekilde artmış kapiller ve trofoblast bazal membran (→) kalınlığı görülmekte (PAS, x400)

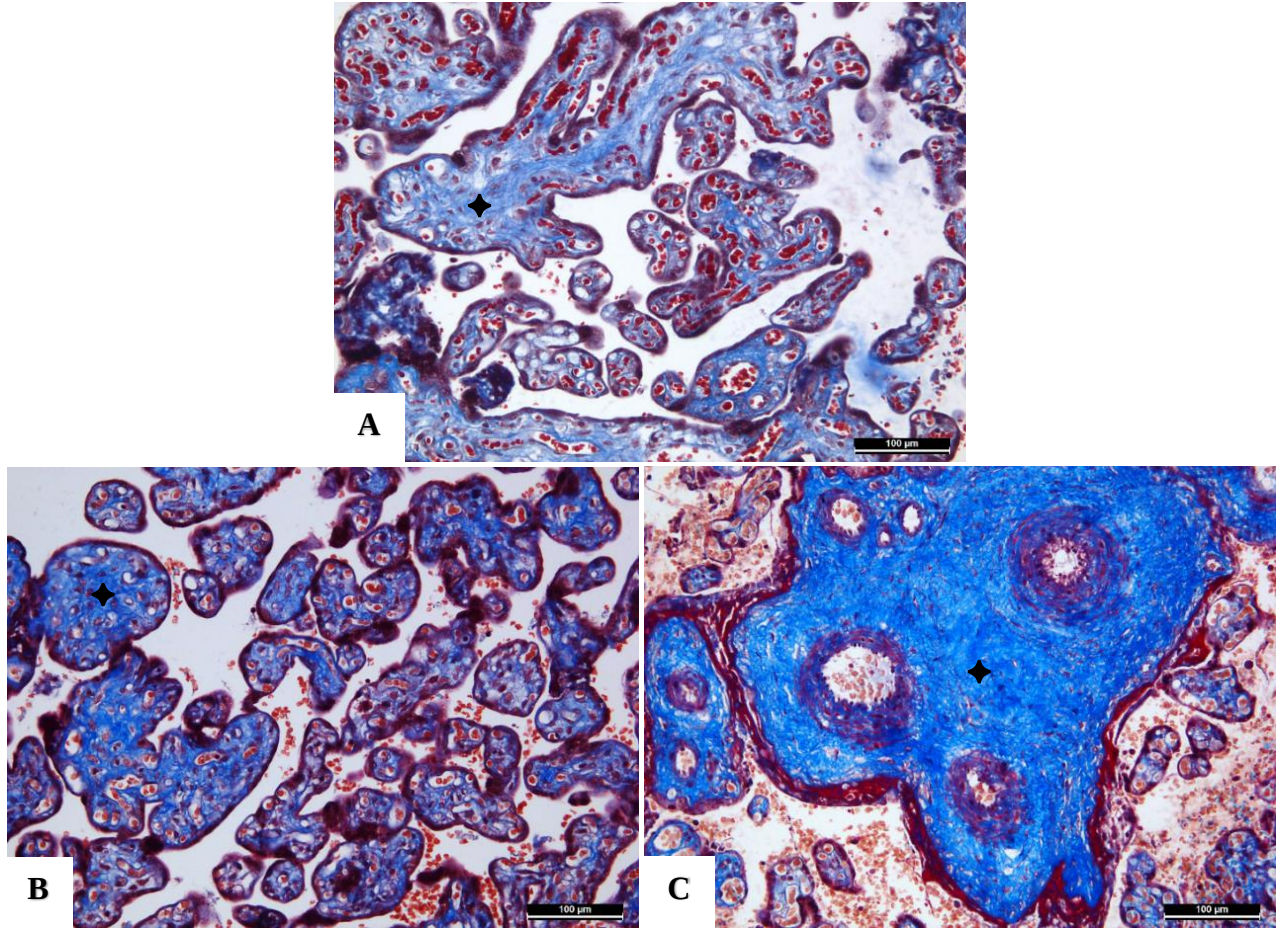


#### 4.2.3 Masson'un üçlü boyama bulguları

Kontrol grubuna ait plasenta dokusunun büyük büyütmede görülen Masson'un üçlü boyama yöntemi ile boyanmış kesitlerinde villus bağ dokusu ve kollagen lif dağılımının normal yapıda olduğu görüldü (Resim 4.8-A).

T2DM grubuna ait plasenta dokusunun Masson'un üçlü boyama yöntemi ile boyanmış kesitlerinde kontrol grubuna göre kollagen lif yoğunluğunun arttığı görüldü (Resim 4.8-B).

GDM grubuna ait plasenta dokusunun Masson'un üçlü boyama yöntemi ile boyanmış kesitlerinde ise hem kontrol hem de T2DM grubuna göre villus stromasında daha yoğun kollagen lif yapısı izlendi (Resim 4.8-C).



**Resim 4.8** Kontrol grubu (A), Tip-2 diabetes mellitus grubu (B) ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna (C) ait plasenta dokusunun Masson'un üçlü boyası ile boyanmış enine kesiti. Kontrol grubuna göre T2DM ve GDM gruplarında belirgin bir şekilde artmış kollagen lif (◆) yoğunluğu görülmekte (Masson'un üçlü boyaması, x200)

### 4.3 İmmünohistokimyasal Bulgular

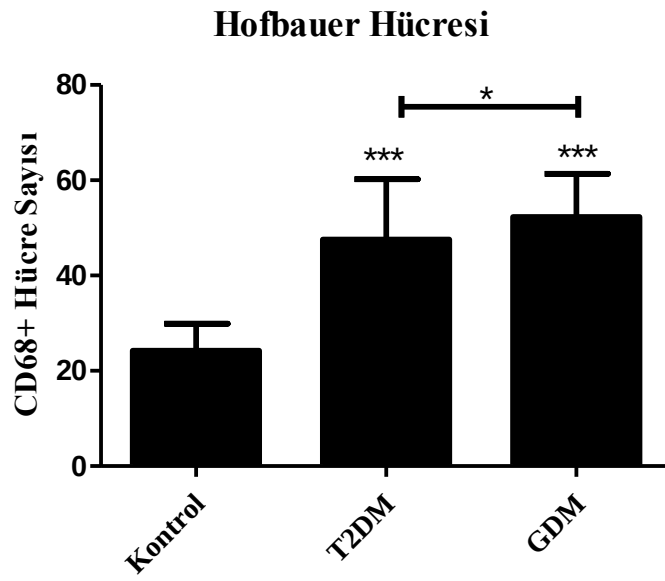
#### 4.3.1 CD68 bulgusu

Hofbauer hücrelerini işaretlemek amacıyla makrofaj belirteci CD68 ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda küçük büyütmede kontrol grubunda villus stromasında az sayıda CD68 immünpozitif Hofbauer hücresi olduğu görüldü (Resim 4.9-A). Kontrol grubuna ait plasenta örneklerinin büyük büyütmesinde T2DM ve GDM grupları ile karşılaştırıldığında az sayıda CD68 immünpozitif Hofbauer hücre bulunduğu dikkat çekti (Resim 4.10-A).

T2DM grubuna ait plasenta örneklerinde kontrol grubuna göre daha fazla sayıda CD68 immünpozitif Hofbauer hücresi belirlendi (Resim 4.9-B). T2DM grubuna ait plasenta örneklerinin büyük büyütmesinde GDM grubuna göre villus stromasında daha az CD68 immünpozitif Hofbauer hücre sayısı olduğu görüldü (Resim 4.10-B).

GDM grubuna ait plasentalarda kontrol grubuna göre daha fazla CD68 immünpozitif hücre olduğu görüldü (Resim 4.9-C). Bu gruba ait plasenta örneklerinin büyük büyütmedeki görüntülerinde Hofbauer hücrelerinde CD68 immünpozitivitesinin diğer gruplara göre daha fazla oranda bulunan ödemli villus yapılarında olduğu dikkat çekti (Resim 4.10-C). GDM ve T2DM grupları karşılaştırıldığında ise GDM grubunda daha fazla Hofbauer hücresi bulunduğu belirlendi.

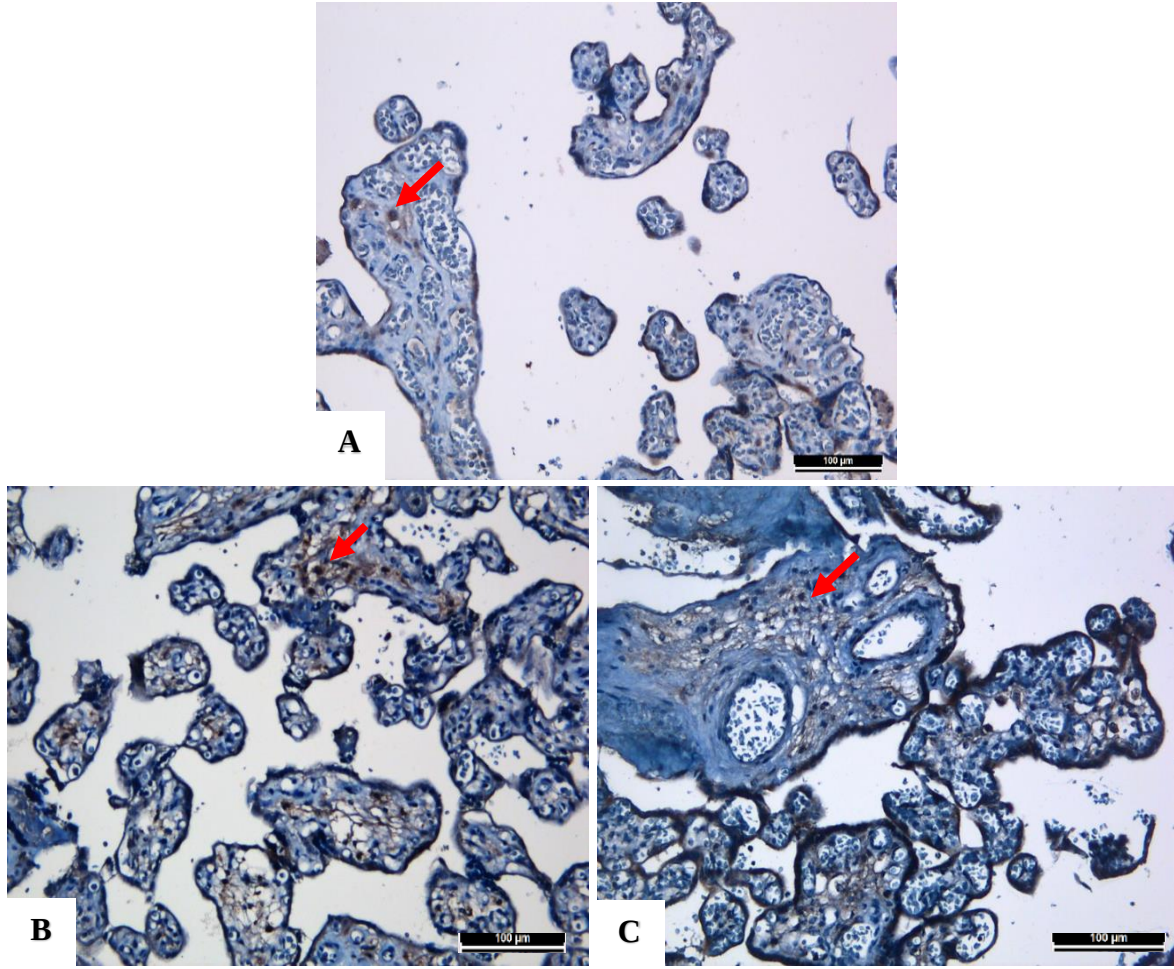
CD68 ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda elde edilen morfometrik verilerde kontrol, T2DM ve GDM gruplarında Hofbauer hücre sayısı  $24,26 \pm 5,6$ ;  $47,58 \pm 12,67$ ;  $52,28 \pm 9,1$  (sırası ile ortalama  $\pm$  SD ) olarak belirlendi. T2DM ve GDM gruplarındaki CD68 immünpozitif Hofbauer hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu belirlendi ( $p < 0,001$ ). GDM grubunda bulunan Hofbauer hücre sayısının T2DM grubuna göre anlamlı olarak daha fazla sayıda olduğu tespit edildi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** CD68 immünpozitif Hofbauer hücre sayısı (ortalama±SD, \*p<0,05; \*\*\*p<0,001)

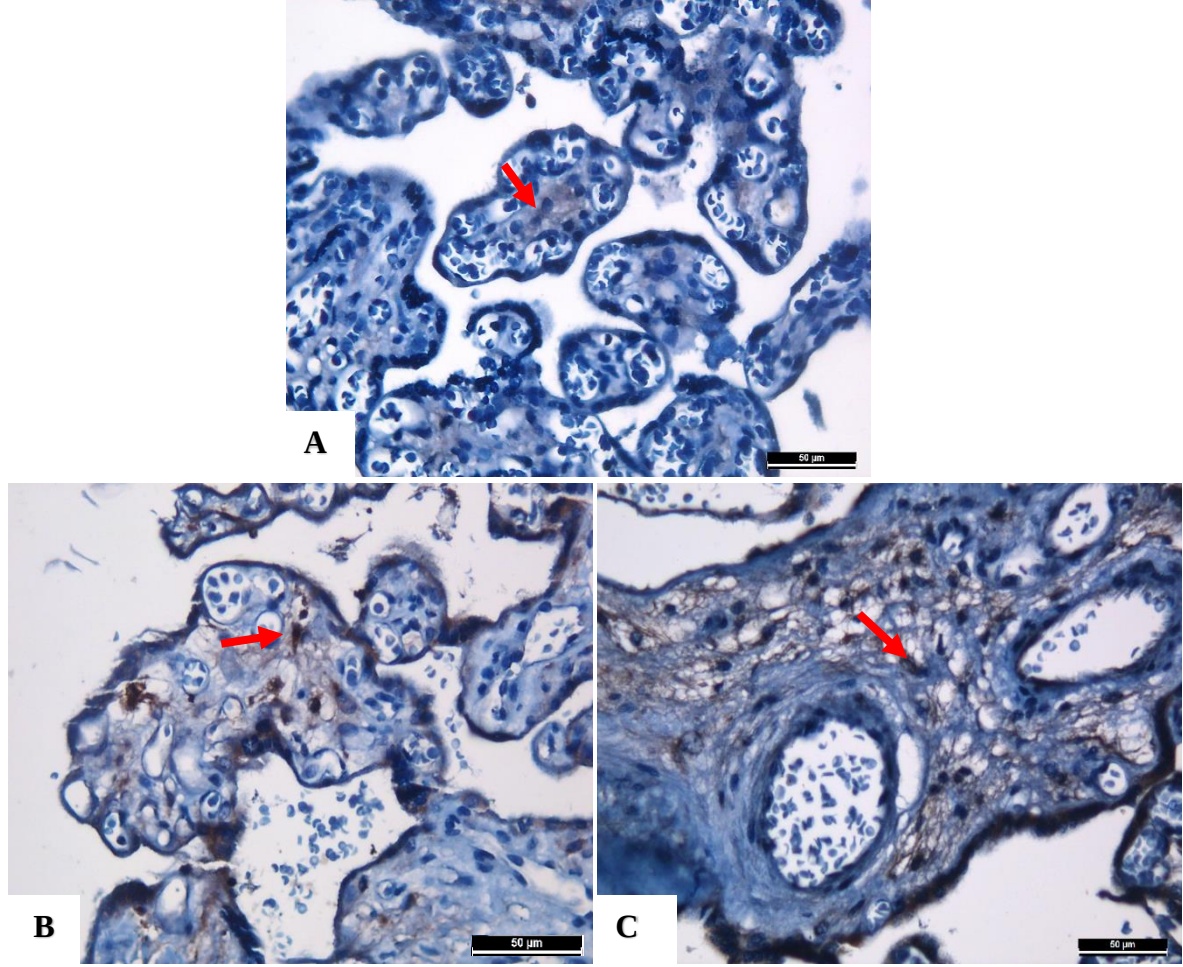
**Çizelge 4.2** CD68 immünpozitif Hofbauer hücre değerlendirmesi

|                       | Kontrol | T2DM  | GDM   |
|-----------------------|---------|-------|-------|
| <b>Ortalama</b>       | 24,27   | 47,58 | 52,28 |
| <b>Standart Sapma</b> | 5,62    | 12,67 | 9,10  |
| <b>Medyan</b>         | 24      | 49    | 52    |
| <b>Maksimum</b>       | 36      | 70    | 80    |
| <b>Minimum</b>        | 13      | 26    | 37    |



**Resim 4.9** Kontrol grubu (A), Tip-2 diabetes mellitus grubu (B) ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna (C) ait plasenta dokusundaki Hofbauer hücrelerinde CD68 immünreaktivitesi. Gestasyonel ve Tip-2 diabetes mellitus gruplarında kontrol grubuna göre artmış CD68 immünpozitif Hofbauer hücre sayısı (kırmızı ok) görülmekte (DAB-Hematoksilen, x200)





**Resim 4.10** Kontrol grubu (A), Tip-2 diabetes mellitus grubu (B) ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna (C) ait plasenta dokusunun büyük büyütmedeki Hofbauer hücrelerinde CD68 immünreaktivitesi. Gestasyonel diabetes mellitus grubunda kontrol ve Tip-2 diabetes mellitus grubuna göre daha fazla CD68 immünpozitif Hofbauer hücre varlığı (kırmızı ok) görülmekte (DAB-Hematoksilen, x400)

### 4.3.2 Platelet Endotel Hücre Adezyon Molekülü-1 (PECAM/CD31) bulgusu

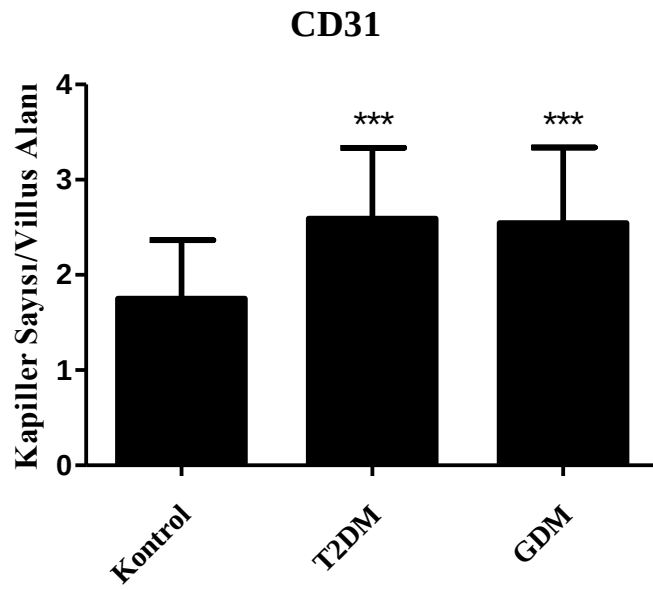
Endotel belirteci olan platelet endotel hücre adezyon molekülü-1 (PECAM/CD31) ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucu elde edilen görüntülerde kontrol grubunun damar endotel hücrelerinde CD31 immünreaktivitesi olduğu saptandı (Resim 4.11-A, 4.12-A).

T2DM grubuna ait plasenta örneklerinin CD31 ile yapılan immünohistokimyasal boyamasında kontrol grubuna göre kapiller endotel hücrelerinde daha kuvvetli CD31 immünreaktivitesi olduğu dikkat çekti (Resim 4.11-B). T2DM grubuna ait plasenta örneklerinin büyük büyütmesinde endotel hücrelerinde, kontrol grubuna göre artmış CD31 immünreaktivitesi izlenirken, GDM grubuna göre daha az immünreaktivite olduğu saptanmıştır (Resim 4.12-B).

GDM grubuna ait plasentalarda CD31 ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda kontrol grubuna göre kapiller endotel hücrelerinde daha fazla immünreaktivite olduğu görüldü (Resim 4.11-C). Bu gruba ait plasenta örneklerinin büyük büyütmesinde kapillerlerdeki endotel hücrelerinde diğer gruplara göre daha kuvvetli CD31 immünreaktivitesi olduğu belirlendi (Resim 4.12-C).

GDM ve T2DM grupları karşılaştırıldığında ise büyük büyütmede GDM grubunda T2DM grubuna göre damar endotel hücrelerinde CD31 immünreaktivitesinin daha kuvvetli olduğu görüldü (Resim 4.12-B, 4.12-C).

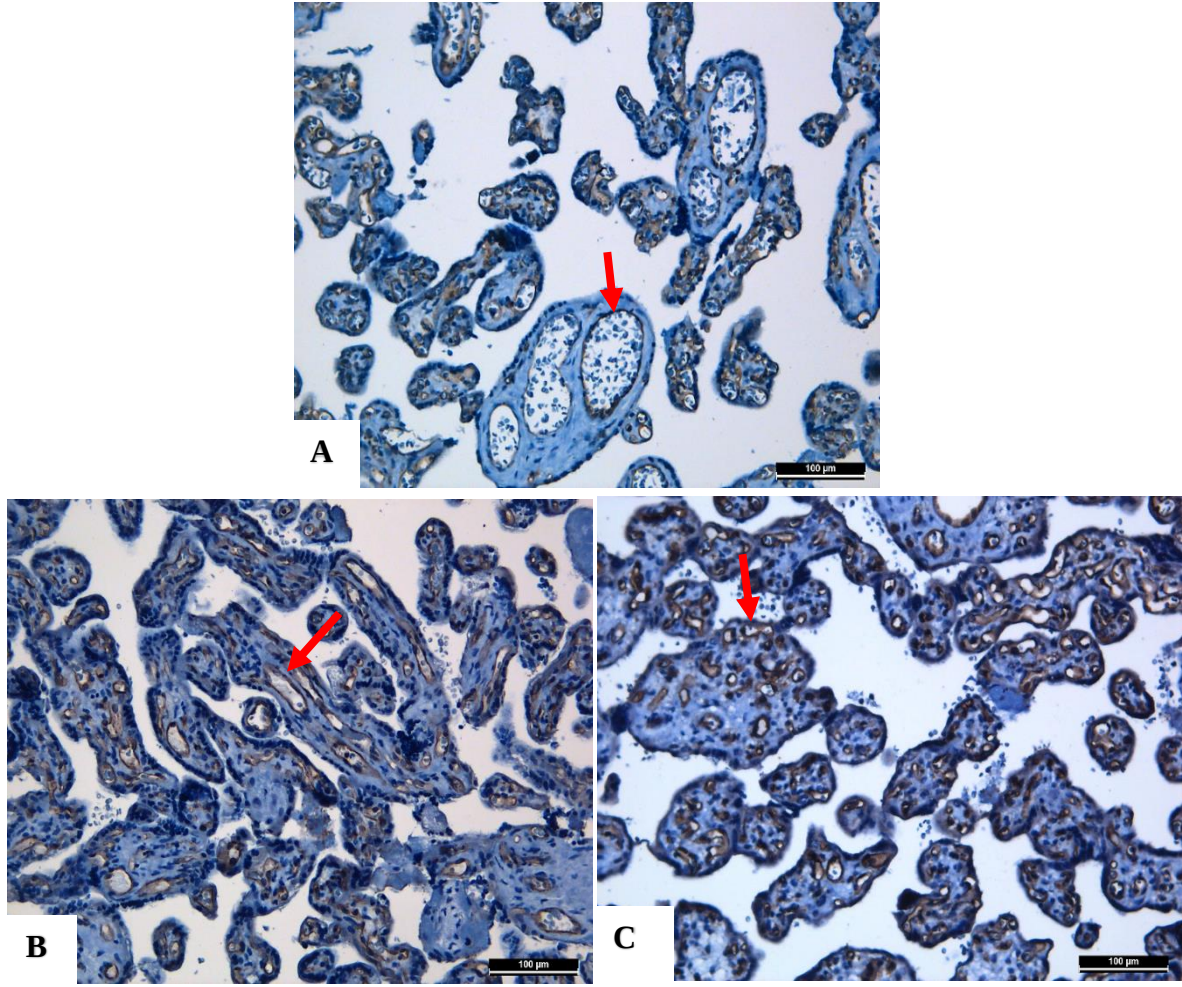
CD31 ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda elde edilen morfometrik verilerde kontrol, T2DM ve GDM gruplarında villus stromasındaki villus alanı ile normalize edilmiş kapiller sayısı  $1,7 \pm 0,6$ ;  $2,6 \pm 0,7$ ;  $2,5 \pm 0,8$  (sırası ile ortalama  $\pm$  SD ) olarak belirlendi. T2DM ve GDM gruplarındaki kapiller sayısının kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu belirlendi ( $p < 0,001$ ). GDM grubundaki kapiller sayısı ile T2DM grubundaki kapiller sayısı arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** Villus stromasında bulunan kapiller sayısı (ortalama $\pm$ SD, \*\*\*p<0,001)

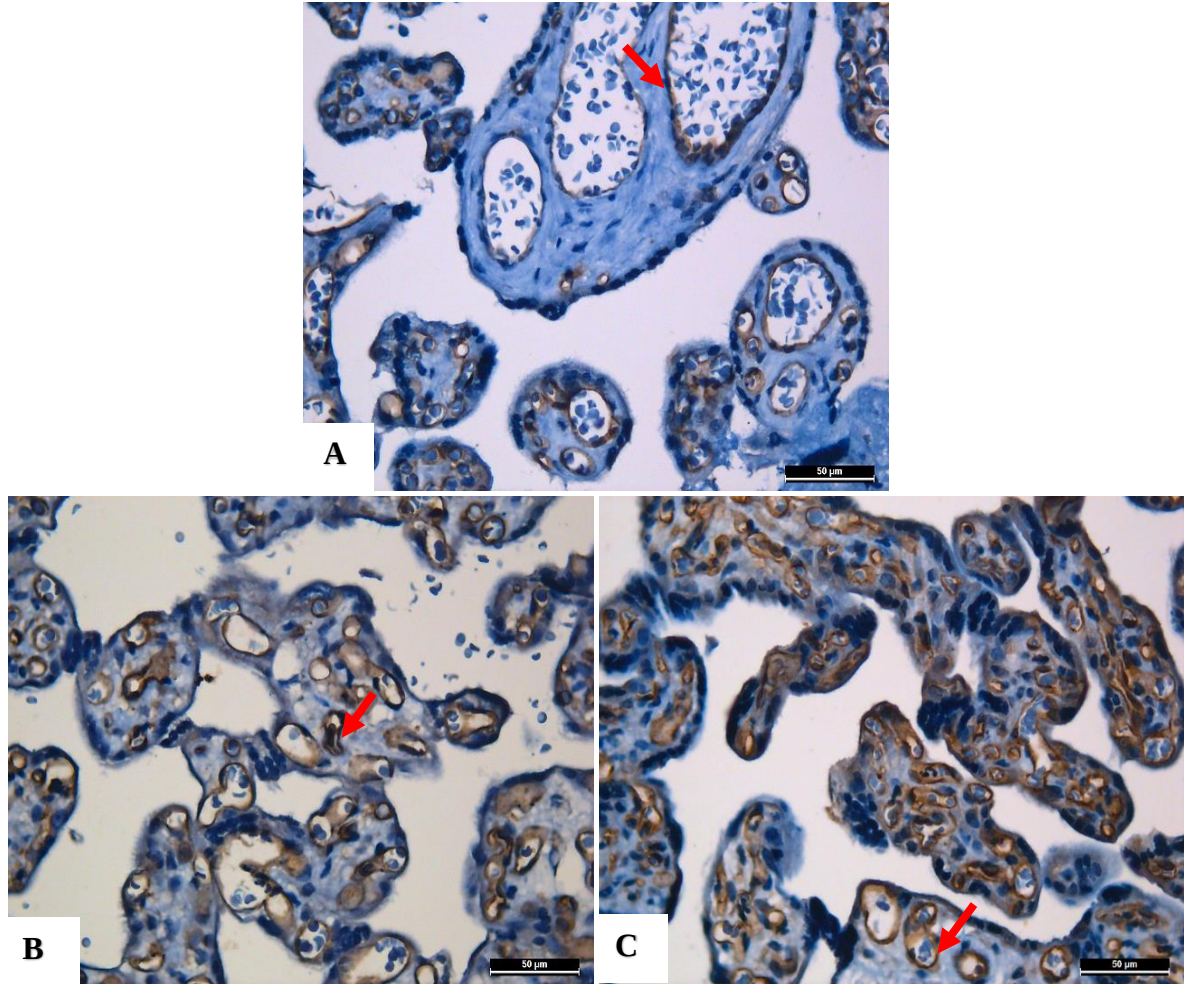
**Çizelge 4.3** CD31 ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda elde edilen morfometrik veriler. Villus alanı ile normalize edilmiş kapiller sayısı

|                       | Kontrol | T2DM | GDM |
|-----------------------|---------|------|-----|
| <b>Ortalama</b>       | 1,7     | 2,6  | 2,5 |
| <b>Standart Sapma</b> | 0,6     | 0,7  | 0,8 |
| <b>Medyan</b>         | 1,6     | 2,6  | 2,4 |
| <b>Maksimum</b>       | 4,2     | 4,4  | 6,2 |
| <b>Minimum</b>        | 0,1     | 1,0  | 1,0 |



**Resim 4.11** Kontrol grubu (A), Tip-2 diabetes mellitus grubu (B) ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna (C) ait plasenta dokusunda endotel hücrelerindeki CD31 immünreaktivitesi. Gestasyonel ve Tip-2 diabetes mellitus gruplarında kontrol grubuna göre damar endotel hücrelerinde artmış CD31 immünreaktivite (kırmızı ok) görülmekte (DAB-Hematoksilen, x200)





**Resim 4.12** Kontrol grubu (A), Tip-2 diabetes mellitus grubu (B) ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna (C) ait plasenta dokusunun büyük büyütmedeki endotel hücrelerinde CD31 immünreaktivitesi. Gestasyonel diabetes mellitus grubunda kontrol ve Tip-2 diabetes mellitus grubuna göre endotel hücrelerinde daha kuvvetli CD31 immünreaktivite (kırmızı ok) görülmekte (DAB-Hematoksilen, x400)

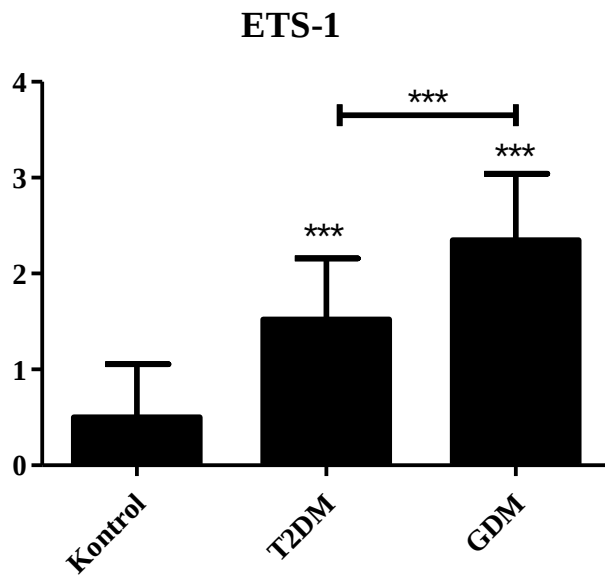
### 4.3.3 ETS-1 bulgusu

Sitotrofoblastların sinsityotrofoblastlara farklılaşmasında görev alan ETS-1 ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda elde edilen görüntülerde kontrol grubuna ait plasenta örneklerinde sinsityotrofoblast hücrelerinde zayıf ETS-1 immünreaktivitesi görüldü (Resim 4.13-A, 4.14-A).

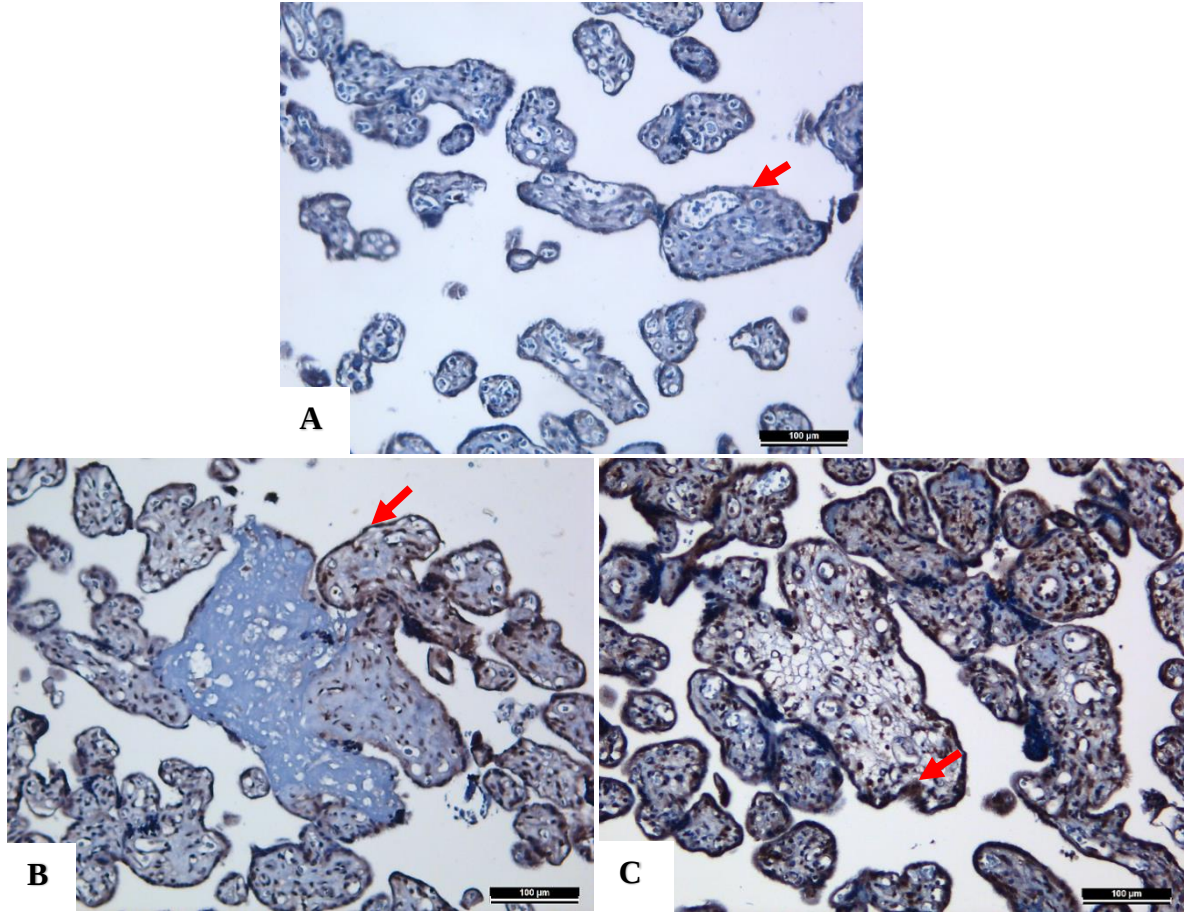
T2DM grubuna ait plasenta örneklerinde sinsityotrofoblastlardaki ETS-1 immünreaktivitesi kontrol grubuna göre daha kuvvetli izlenirken, GDM grubuna göre daha zayıf bir immünreaktivite gösterdiği belirlendi (Resim 4.13-B, 4.14-B).

GDM grubuna ait plasentalarda kontrol grubuna göre sinsityotrofoblastlarda daha kuvvetli ETS-1 immünreaktivitesi görüldü (Resim 4.13-C). Büyük büyütmede görülen sinsityotrofoblastlarda ETS-1 immünreaktivitesinin hem kontrol hem de T2DM grubu ile karşılaştırıldığında daha kuvvetli olduğu dikkat çekti (Resim 4.14-C).

ETS-1 ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda elde edilen veriler semikantitatif yöntem ile değerlendirildi. Elde edilen istatistik analiz sonucunda hem T2DM hem de GDM gruplarında sinsityotrofoblastlardaki ETS-1 immünreaktivitesinin kontrol grubuna göre daha kuvvetli olduğu belirlendi ( $p<0,001$ ). GDM grubundaki ETS-1 immünreaktivitesinin, T2DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha kuvvetli olduğu görüldü ( $p<0,001$ ; Şekil 4.3).

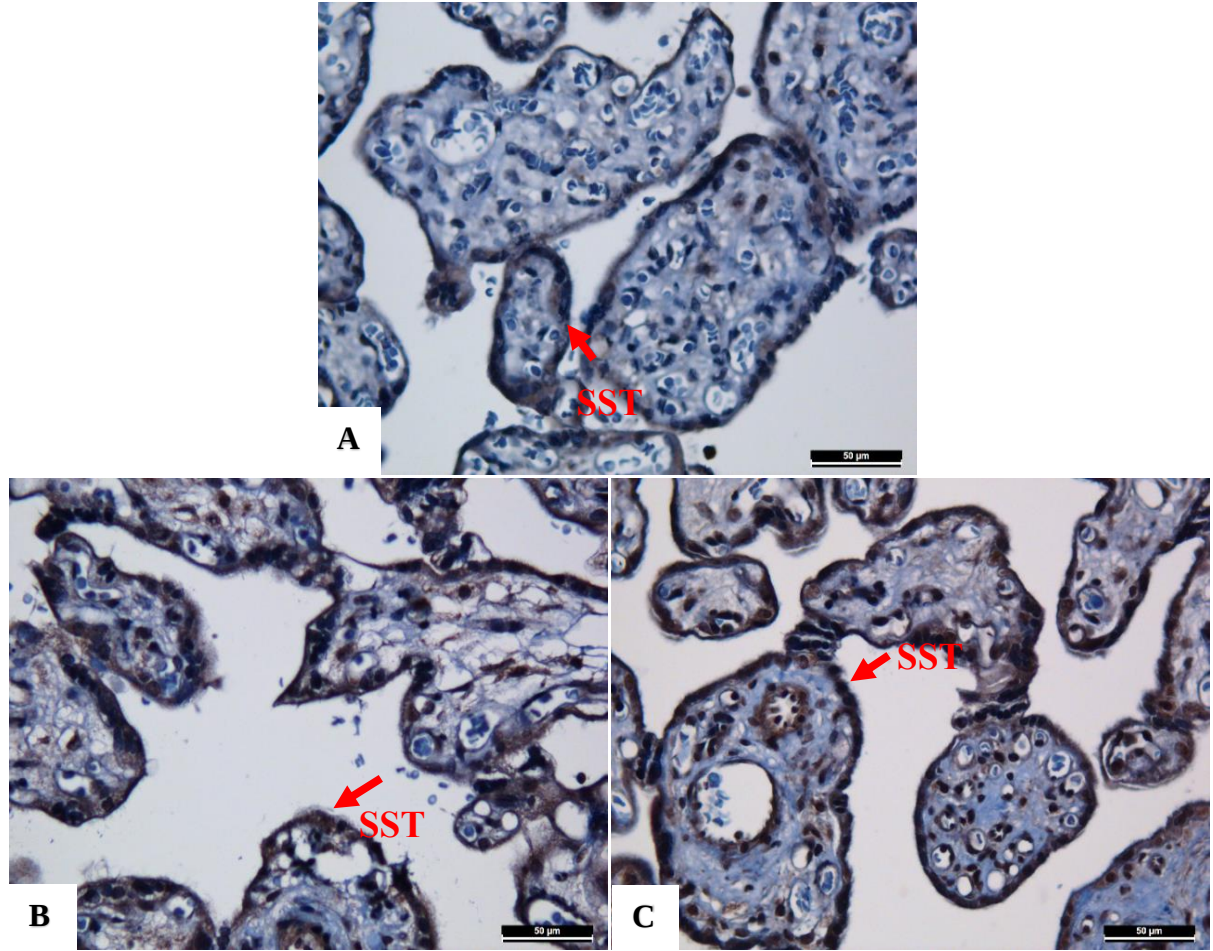


**Şekil 4.3.** ETS-1 immünohistokimyasal boyamasının semikantitatif olarak değerlendirilmesi (ortalama±SD, \*\*\*p<0,001)



**Resim 4.13** Kontrol grubu (A), Tip-2 diabetes mellitus grubu (B) ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna (C) ait plasenta dokusundaki sinsityotrofoblastlarda ETS-1 immünreaktivitesi. Gestasyonel diabetes mellitus grubunda kontrol ve Tip-2 diabetes mellitus grubuna göre daha yoğun ETS-1 immünreaktivite (kırmızı ok) görülmekte (DAB-Hematoksilen, x200)





**Resim 4.14** Kontrol grubu (A), Tip-2 diabetes mellitus grubu (B) ve Gestasyonel diabetes mellitus grubuna (C) ait plasenta dokusunun büyük büyütmedeki sinsityotrofoblast hücrelerinde ETS-1 immünreaktivitesi. Gestasyonel ve Tip-2 diabetes mellitus gruplarında kontrol grubuna göre daha kuvvetli ETS-1 immünreaktivitesi (kırmızı ok) görülmekte (DAB-Hematoksilen, x400)

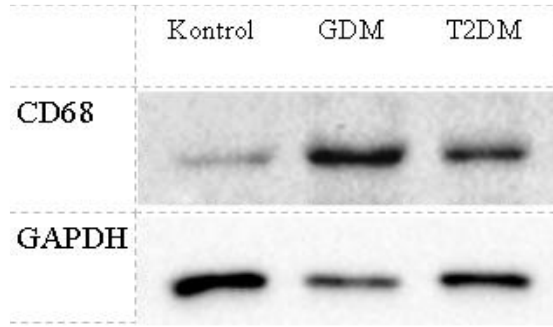
#### 4.4 Western Blot Bulgusu

Toplanan plasentalardan Western Blot yöntemi uygulamak için alınan doku örnekleri sıvı azotta dondurularak protein izolasyonu yapılana kadar -80°C’de saklandı. Her bir antikör için birbirinden bağımsız 3 tekrar yapıldı.

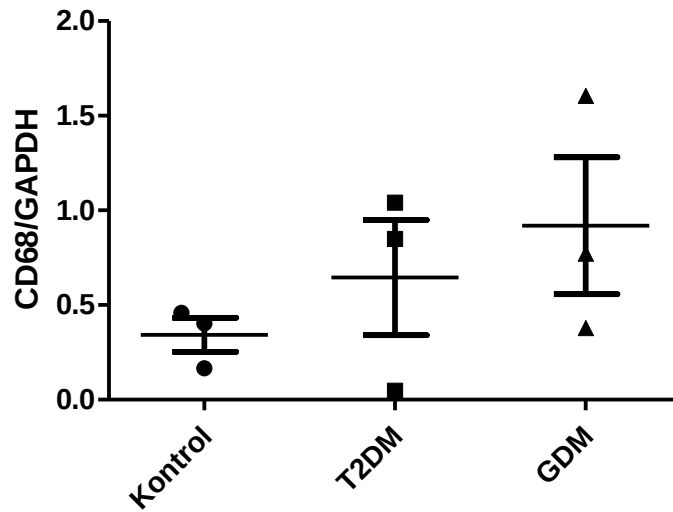
GDM grubuna ait plasenta örneklerinde kontrol ve T2DM grubuna göre daha fazla CD68 ifadesi olduğu görüldü. T2DM grubuna ait plasenta örneklerinde kontrol grubuna göre daha fazla CD68 ifadesi görülürken GDM grubuna göre daha az olduğu belirlendi (Resim 4.15).

GDM ve T2DM gruplarına ait plasenta örneklerinde kontrol grubuna göre daha yüksek oranda CD31 ifadesi bulunduğu dikkat çekti (Resim 4.16).

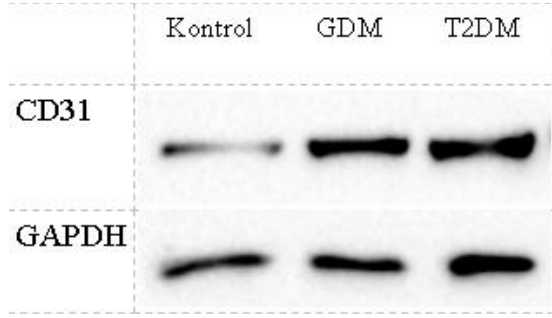
GDM ve T2DM gruplarına ait plasenta örneklerinde kontrol grubuna göre daha yüksek oranda ETS-1 ifadesi bulunduğu görüldü. GDM ve T2DM grupları karşılaştırıldığında GDM grubundaki örneklerde daha yüksek ETS-1 ifadesi olduğu belirlendi (Resim 4.17).



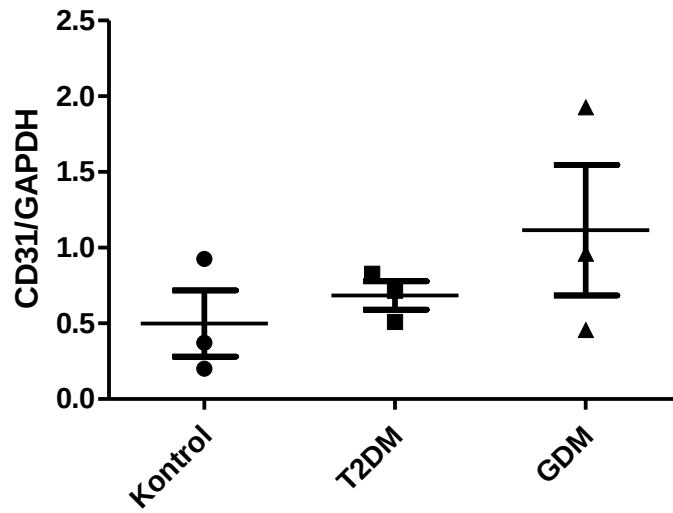
**Resim 4.15** Western Blot analizi sonucunda Gestasyonel diabetes mellitus ve Tip-2 diabetes mellitus gruplarında kontrol grubuna göre artmış CD68 ifadesi görülmekte



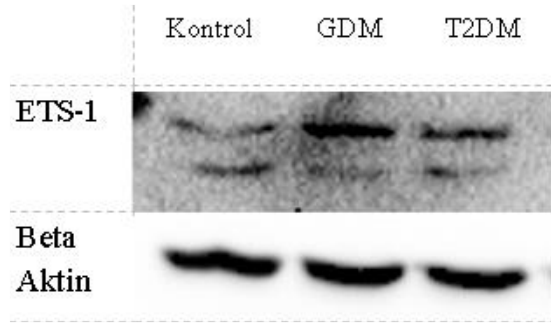
**Şekil 4.4.** Western Blot yönteminin farklı örneklerle yapılan 3'lü tekrarı ve GAPDH ile normalize edilmiş CD68 ifadesi görülmekte



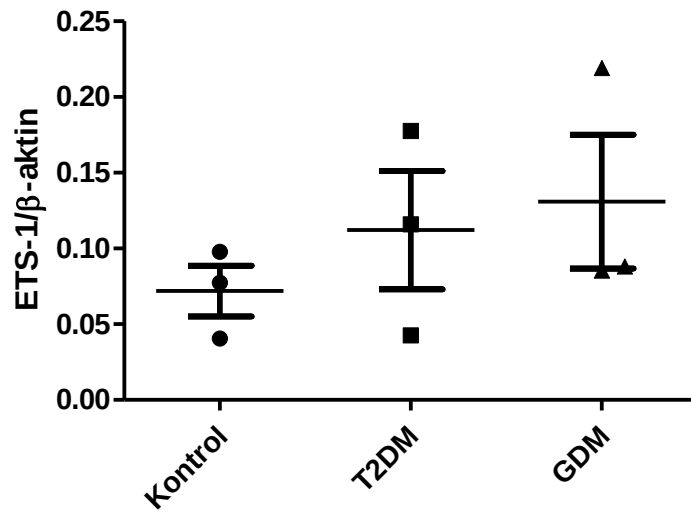
**Resim 4.16** Western Blot analizi sonucunda Gestasyonel diabetes mellitus ve Tip-2 diabetes mellitus gruplarında kontrol grubuna göre artmış CD31 ifadesi görülmekte



**Şekil 4.5.** Western Blot yönteminin farklı örneklerle yapılan 3'lü tekrarı ve GAPDH ile normalize edilmiş CD31 ifadesi görülmekte



**Resim 4.17** Western Blot analizi sonucunda Gestasyonel diabetes mellitus ve Tip-2 diabetes mellitus gruplarında kontrol grubuna göre artmış ETS-1 ifadesi görülmekte



**Şekil 4.6.** Western Blot yönteminin farklı örneklerle yapılan 3'lü tekrarı ve β-aktin ile normalize edilmiş ETS-1 ifadesi görülmekte

## 5. TARTIŞMA

Plasenta, gebelik boyunca fetusu fiziksel etkilerden korumanın yanı sıra anne ile fetus arasında madde geçişini sağlamak, hormon salgılamak gibi görevleri olan ve gelişime doğrudan etki eden geçici bir organdır. Hemokoriyal tipte olan insan plasentası, koryon frondozum ve desidua bazalisten oluşan fetal ve maternal iki kısımdan meydana gelir. Villus yapılarının bulunduğu ve madde geçişinin sağlandığı kısım koryon frondozum kısmıdır. Plasentasyon süresince; sitotrofoblast ve sinsityotrofoblast hücrelerinden oluşan primer villuslar, ekstraembriyonik mezenşimin villus merkezinde ortaya çıkması ile sekonder villuslar ve villus stromasında yoğun vasküler yapıların olduğu tersiyer villuslar meydana gelir. Plakental vaskülogenez ve ardından meydana gelen anjiyogenez, materno-fetal dolaşımın gerçekleşmesi için çok önemlidir [1, 19].

Metabolik bir hastalık olan diyabet, kalıtsal olabilir veya sonradan gelişebilir. İnsülin üretimindeki eksiklik ya da yetersizlik veya üretilen insülinin etkili olmaması sebebi ile kandaki glukoz seviyesi artar. Dolaşımda bulunan yüksek konsantrasyondaki glukoz seviyesi uzun süre devam ederse göz, kalp, böbrek, sinir sistemi ve kan damarlarında işlev bozukluğuna ve ileri dönemde organ kayıplarına sebep olur [57, 58].

Metabolik bir hastalık olan diabetes mellitus genetik kaynaklı olabileceği gibi çevresel faktörlerin etkisi ile de gelişebilir. Yapılan araştırma sonuçları fiziksel aktivitenin düşük olduğu ve yüksek kalorili yiyeceklere ulaşımın kolay olduğu ülkelerde tip-2 diyabetin daha yüksek oranda görüldüğünü ifade ediyor. Ayrıca son dönemlerde çocuklarda görülen tip-2 diyabet sıklığının artması bu konu ile ilgili daha fazla çalışma yapılma ihtiyacını gösteriyor. Amerikada yapılan ve 1999-2005 yılları arasını kapsayan bir çalışma sonucuna göre 2005 yılında gestasyon öncesi diyabet yaygınlığı 1999 yılına göre anlamlı bir şekilde artmıştır. [69]. Gebe kadınların %5'inde gestasyonel diyabet görülür. Gebelikte değişen glukoz metabolizması kaynaklı olarak gebe kadınların açlık glukoz seviyesi gebe olmayan kadınlara göre daha düşüktür, tokluk glukoz seviyeleri daha yüksektir. Gebeliğin ilk trimestirinden sonra glukoz toleransı düşmeye başlar ve plasentadan salgılanan hPL, hCG, glukagon, kortizol gibi hormonların da etkisi ile fizyolojik insülin direnci gelişir. Normoglisemi durumunu muhafaza etmek için üretilen insülin miktarı yaklaşık iki katına çıkar. Glukoz seviyesinin muhafaza edilemediği durumlarda gestasyonel diyabet gelişir [70].

Fetal pankreasta, insülin üretilmeye başladığında maternal hiperglisemiden kaynaklı yüksek seviyedeki glukozu normal seviyeye düşürmek için, fetal pankreas daha fazla insülin üretmeye başlar. Yoğun insülin ihtiyacını karşılamaya çalışan fetal pankreasta beta hücresi hipertrofisi meydana gelir. Ayrıca yüksek miktarda salgılanan insülinin etkisi ile fetal hücreler, hücre içine glukoz alımını artırır. Bunun etkisi ile adipoz dokular artarken fetusta makrozomi ortaya çıkabilir [71].

Çalışmamızda amacımız tip-2 ve gestasyonel diyabetli gebe plasentalarında oluşabilecek değişiklikleri değerlendirmek ve bunların fetal gelişim üzerine etkilerini doğum ağırlığı, plasental ağırlık ve gebelik süresi gibi ölçütler ile sağlıklı gebelerden elde edilecek bulgularla karşılaştırmalı olarak yorumlamaktır.

Daskalakis ve diğerleri (2008) sağlıklı ve gestasyonel diyabetli gebeleri maternal yaş, fetal doğum ağırlığı, gebelik süresi, plasenta ağırlığı ve histopatolojik açıdan değerlendirmek amacı ile 40 sağlıklı ve 40 gestasyonel diyabetli gebeden plasenta örnekleri almışlardır. Gruplar arasında maternal yaş ve fetal doğum ağırlığı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kontrol grubunda GDM grubuna göre gebelik süresinin daha uzun olduğu belirlenmiştir. Fetal/plasental ağırlık oranının GDM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür [72]. Yapılan bazı çalışmalarda maternal ağırlık, fetal ağırlık, plasenta ağırlığı gibi klinik özellikler arasında anlamlı fark varlığı gösterildiği gibi bazı çalışmalarda ise bu kriterler arasında herhangi bir anlamlı fark olmadığı da ifade edilmiştir [11, 72, 73]. Biz de çalışmamızda, gruplar arasındaki maternal yaş, gebelik haftası, doğum ağırlığı, plasenta ağırlığı ve HbA1C (%) ilişkisini değerlendirdik. Maternal yaş ortalaması GDM ve T2DM gruplarında kontrol grubuna göre daha yüksek olarak belirlendi. Ancak istatistiksel analiz sonucunda sadece GDM grubunda bulunan gebelerin yaş ortalamaları kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek çıktı ( $p<0,01$ ). Doğum ağırlığı ve plasenta ağırlıkları değerlendirildiğinde ise her iki kriter için de kontrol grubuna göre GDM ve T2DM gruplarında artış olduğu görülürken gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunmadı. Diyabetik durumlarda glisemik değeri izlemek için kullanılan ve ortalama kan glukoz değeri ile doğrudan ilişkisi olduğu bilinen HbA1C (%)’nin diyabetik kişilerde yüksek değerlerde olduğu bilinmektedir [74, 75]. Çalışmamızda, T2DM grubu ile GDM grubu karşılaştırıldığında T2DM grubunun HbA1C (%) değeri anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada maternal diyabet kaynaklı plasentada ortaya çıkan plasental



değişimleri incelemek amacı ile diyabetik gebe plasentaları ile sağlıklı gebe plasentalarını karşılaştırmışlardır. Diyabetik gebelerin plasentaları sağlıklı gebeler ile karşılaştırıldığında daha çok sayıda ödemli villus olduğu görülmüştür. Ayrıca diyabetik gruptaki plasental villuslarda hücreselliliğin arttığı belirlenmiştir. Sağlıklı ve diyabetik gruplardaki villus boyutları incelendiğinde anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Diyabetik ve sağlıklı gebeler arasında görülen koryonik villus morfolojisindeki farklılıkların engellenmesi için diyabet patolojisinin kontrol altına alınmasının gerekli olduğu ifade edilmiştir [76]. Bizim çalışmamızda da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gestasyonel ve tip-2 diyabet grubuna ait plasentaların Hematoksilen-Eozin ile boyanmış kesitlerinde çok sayıda ödemli villus varlığı, hiperkapillarizasyon, sinsityal düğümlerde ve fibrinoid yapısında artış gibi morfolojik farklılıklar görüldü.

Normal fetal gelişim ve sağ kalımın uygun gelişim ve işlevselliğe sahip plasenta ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. Diyabetik gebelik, fetal büyüme ve gelişme üzerinde birçok farklı etkiye sahip olduğundan, çalışmalar yüksek glisemik ortamın plasentayı nasıl etkilediğine odaklanmaktadır. Bu amaçla, Treesh ve Khair (2015) diyabetik gebelerden alınan plasenta örnekleri ile sağlıklı gebe plasentalarını histolojik olarak karşılaştırmışlar ve Hematoksilen-Eozin, boyaması sonucu elde ettikleri görüntülerde koryonik villuslarda; artan kapiller sayısı ve konjesyon varlığı, fibrinoid artışı ve villus ödemi saptamışlardır [73]. Çalışmamızda, HE boyaması sonucu elde ettiğimiz bulgularda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GDM ve T2DM grubunda villuslarda ödem varlığı, villuslarda hiperkapillarizasyon, sinsityal düğümlerde ve fibrinoid yapısında artış görüldü. Ayrıca endovillöz kapillerlerde konjesyon, dilatasyon ve perivillöz aralıkta ekstrasvazasyon dikkat çekti. GDM grubunda T2DM grubuna göre villuslarda ödem, endovillöz hiperkapillarizasyon ve konjesyon varlığının daha fazla olduğu belirlendi.

Maternal ve fetal dolaşım arasındaki difüzyon bariyerinin; trofoblast, trofoblast bazal membranı, bağ dokusu, kapiller endotel bazal membranı ve endotel hücrelerinden oluştuğu bilinmektedir [77]. Yapılan bir çalışmada, sağlıklı ve diyabetik gebelerden alınan doku örnekleri ile yapılan PAS ve Mallory'nin üçlü boyaması sonucunda diyabetik gebelerde sinsityotrofoblast bazal membran kalınlaşması, villus intertisyel kollagen lif artışı ve glikojen birikimi olduğu gösterilmiştir [72]. Çalışmamızda yaptığımız PAS ve Masson'un üçlü boyaması sonucunda GDM ve T2DM gruplarında kontrol grubuna göre endotel ve trofoblastik bazal membranda kalınlaşma ile villuslardaki PAS pozitif alanlarda ve kollagen lif varlığında artış olduğu saptandı. Işık mikroskopik bulgularımız literatürdeki yapılan

Çalışma sonuçlarıyla uyumluluk gösterdi.

Plasenta yapısındaki hücre tiplerinden olan Hofbauer hücreleri plasental makrofajlardır. Bu hücrelerle ilgili birçok araştırma olmasına rağmen plasentadaki vaskülogenez ve anjiyogenez süreçlerindeki olası rolleri çok fazla araştırılmamıştır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada Hofbauer hücrelerinin yerleşimleri ve sayıları ile villus merkezindeki vasküler yapıların ilişkili olabileceği ve böylece bu hücrelerin vaskülogenez ve anjiogenez olaylarında rol oynayabileceği ifade edilmiştir. Çalışma için plasenta dokusu olarak ilk üç ayda alınan küretaj materyalleri kullanılmıştır. Hofbauer hücrelerinin ilkel damar oluşumu ile olan ilişkisini göstermek amacı ile CD68 (makrofaj belirteci) ve CD31 (endotel belirteci) ile ikili immunohistokimyasal boyama yapılmıştır. Bunun sonucunda plasental villus merkezinde Hofbauer hücreleri ile anjiyogenik hücre kordonları ve ilkel vasküler tüpler birbirlerine yakın yerleşim göstermişlerdir. Sonuç olarak Hofbauer hücreleri, vasküler yapılar ile korelasyon gösterdiğinden vaskülogenez ve anjiyogenez süreçlerinde yer aldığı düşünülmektedir [9]. Bizde alışmamızda vaskülarizasyon gibi plasenta gelişimi ve işlevselliği için çok önemli olan bu süreçte görev aldığı düşünülen Hofbauer hücrelerinin diyabet varlığındaki değişimini inceledik. Çalışmamızda diyabetik gruptaki gebelerin plasentalarında sağlıklı gebelere göre villus stromasında daha fazla sayıda CD68 immünpozitif Hofbauer hücresi olduğunu gördük.

Vaskülogenez ve anjiyogenez mekanizmalarında yer aldığı gösterilen Hofbauer hücrelerinin aynı zamanda villus yapısındaki trofoblast gelişiminde de etkin olabileceği ifade edilmektedir. Yapılan bir çalışmada Hofbauer hücrelerinin trofoblast hücreleri üzerindeki etkisini araştırmak amacı ile izole edilen trofoblast hücreleri in vitro ortamda Hofbauer hücrelerinden elde edilen besiyerleri içinde büyütölmüş ve meydana gelen farklılıklar araştırılmıştır. Villus stromasından elde edilen Hofbauer hücrelerinin besiyerine etkin bırakılan trofoblast hücrelerinin normalden daha fazla hPL ve hCG ürettiği görölmüşür. Bu sonuçlara dayanarak Hofbauer hücrelerinin hPL ve hCG üretimini indükleyerek trofoblast gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir [78]. Biz de çalışmamızda, literatürde yapılan çalışmalarda birbirinden farklı mekanizmalarda yer aldığı gösterilen Hofbauer hücrelerinin diyabet patolojisinden etkilenerek diyabetli gebelerde sağlıklı gebe plasentalarına göre daha fazla sayıda bulunduğunu ve villuslarda birikim gösterdiğini saptadık.

Yapılan bir çalışmada gestasyonel diyabetli gebe plasentalarında öncöl inflamatuvar faktörleri araştırmak için makrofaj ve inflamatuvar mediyatör varlığı hem protein hem de

RNA düzeyinde incelenmiştir. Bu amaçla makrozomik bebek sahibi 30 gestasyonel diyabetli kadın ve makrozomik olmayan bebek sahibi 30 sağlıklı kadından plasenta örnekleri toplanmıştır. Bu örneklerden IL-6, TLR4, TGF- $\beta$ , CD68, CD14, EMR-1, CCL2, TCR- $\alpha$ , T-bet, GATA-3, leptin and adiponektin değerlendirmesi için mRNA izole edilmiştir. Yapılan PCR sonuçları inflamatuvar öncül faktörlerden IL-6, TLR4 ve TGF- $\beta$ 'nin GDM grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olduğunu göstermiştir. Makrofaj infiltrasyon belirteçlerinin; CD68, CD14 ve EMR-1'in mRNA ifadelerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GDM grubunda daha yüksek olduğu görülmüştür. T hücre infiltrasyon göstergesi TCR- $\alpha$ 'nın GDM grubunda anlamlı olarak daha fazla mRNA ifadesi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, leptin ve adiponektinin mRNA miktarları incelendiğinde GDM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla ifade edildiği görülmüştür. Çalışmanın sonucunda araştırmacılar, gestasyonel diyabetli gebelerde inflamasyonun arttığını ve bunun makrozominin patogenezi içinde olan bir mekanizma olabileceğini ifade etmişlerdir [75]. Bu çalışma sonucunda Hofbauer hücrelerin farklı patolojik durumlarda etkin olabildiği görülmüştür. Bizim çalışmamızda makrozomik bebek olmamasına rağmen Hofbauer hücre sayısında artış görülmesi bu hücrelerin farklı patolojilerdeki rolleriyle ilgili daha detaylı çalışmalar yapılması gerektiğini göstermiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada gestasyonel diyabet komplikasyonu olan gebe plasentaları incelenerek plasentada bulunan Hofbauer hücrelerinin sayısı ve işlevleri değerlendirilmiştir. Çalışma için termdeki 15 GDM'li gebe ve 10 sağlıklı gebe plasentasından PCR ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için doku örnekleri alınmıştır. Hofbauer belirteci olarak CD68 ve CD14, inflamatuvar sitokin ifadesi için IL-6 ve TNF- $\alpha$  seçilmiştir. İmmünohistokimya boyamaları sonucunda GDM grubunda CD68+ veya CD14+ pozitif hücrelerin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar Hofbauer hücrelerinin GDM patolojisinde arttığını bildirmektedir. Biz de çalışmamızda hem GDM hem de T2DM gibi farklı diyabet gruplarında CD68 immünpozitif hücrelerin sağlıklı gebelere göre daha fazla olduğunu belirledik. Ayrıca aynı çalışmanın devamında CD68+, IL-6 ve TNF- $\alpha$  mRNA ifadelerinin GDM grubunda daha yüksek olduğu gösterilerek bu sonuçlar PCR yöntemi ile de desteklemişlerdir. Çalışmanın sonucunda GDM'li gebe plasentalarında makrofaj birikimi olduğu ve öncül inflamatuvar mediyatör ifadelerinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gösterilmiş ve böylece gestasyonel diyabet etyolojisinde bu etmenlerin önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır.[10]. Bu çalışma sonucu elde edilen sonuçlar ile bizim çalışmamızdan ortaya çıkan bulgular birbirini

desteklemektedir.

Yapılan bir çalışmada, Hofbauer hücrelerinin erken fetal kayıplardaki rolünü araştırmak amacı ile CD68 ve CD31 antikorları kullanılarak immunohistokimyasal boyama yapılmıştır. Ayrıca ışık mikroskobunda Hofbauer hücre sayımı yapılmıştır. Çalışmada 15 missed abortion, 15 anembriyonik gebelik (blighted ovum) ve 15 normal gebelik materyali kullanılmıştır. Hofbauer hücre sayısı hem anembriyonik gebelik grubunda hem de missed abortion grubunda kontrol grubuna göre daha fazladır. Ayrıca anembriyonik gebeliklerle karşılaştırıldığında ise missed abortion grubunda daha çok sayıda Hofbauer hücresi tespit edilmiştir. Daha kapsamlı villus vaskülerite değerlendirmesi ise Chalkey metodu ve mikrodamar skorlanması yöntemleri ile yapılmıştır. Missed abortion grubu, diğer iki grup ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek mikrodamar skoruna sahip olduğu görülmüştür. Chalkey metodunda ise anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Missed abortion grubu ve anembriyonik gebelik grubu arasındaki bu farkın patoetyolojilerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu sonuçlarla beraber artan Hofbauer hücrelerinin erken fetal kayıpların patogenezinde önemli olabileceği gösterilmiştir [79]. Biz de diyabetik gebeler ile yaptığımız çalışmamızda, Hofbauer hücrelerinin farklı patolojik durumlarda villus yapısındaki sayısının arttığını gösterdik.

Obezite ve gebeliğin insülin direnci ve inflamatuvar değişimler yönünden ilişkili olduğu düşünülmektedir. Adipoz doku ve plasentadaki inflamatuvar transkriptomları benzerlik gösterdiğinden Challier ve diğerleri (2008) obeziteye cevaben plasentada yüksek oranda inflamatuvar yanıt gelişebileceğini iddia etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, plasentada makrofaj birikimi ve plasental inflamatuvar mediyatörleri karakterize ederek obezite durumunda gelişen inflamasyon arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada 20 obez ve 15 zayıf gebeden oluşan iki grup oluşturulmuştur. CD68 ve CD14 ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda, immünpozitif hücrelerin obez gebe plasentalarında zayıf gebelerinkine göre 2-3 kat daha fazla bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca plasentadan izole edilen CD14+ makrofajlarda proinflamatuvar sitokinlerden IL-1, TNF-alfa ve IL-6 ifadesinin arttığı gösterilmiştir. Artan sitokin ifadesi plasentada bulunan makrofajların aktif formda bulunduğunu işaret etmektedir. Ayrıca, leptin gibi trofoblastlarda üretilen bazı sitokinler maternal dolaşıma salınırken TNF-alfa gibi sitokinler ise plasentada kalmaktadır. Bu durumun ise makrofajlar tarafından üretilen sitokinlerin plasental bariyeri geçmeyerek dolaşıma katılmayacağı için sistemik inflamasyondan çok intraplasental inflamasyon mekanizmalarını tetikleyebileceği belirtilmiştir [80]. Çalışmamızda diyabetik gruplarda

görülen artmış Hofbauer sayısının obezite patolojisi ile benzerlik gösterdiği belirlendi.

Literatürde yapılan tüm bu çalışmalarda farklı patolojilere ait plasentalarda Hofbauer hücre sayısının arttığı gösterilmiştir. Bu hücrelerdeki artışla beraber IL-6, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  gibi inflamatuvar öncül faktörlerin de miktarının arttığı gösterilmiştir [75, 79, 80]. Biz de çalışmamızda, T2DM ve GDM gibi iki farklı diyabet grubuna ait gebe plasentalarındaki Hofbauer hücre varlığını inceledik. Bu amaçla makrofaj belirteci olarak kullanılan CD68 ile immünohistokimyasal boyama ve Western Blot analizi yaptık. İmmünohistokimyasal boyama sonucunda kontrol, T2DM ve GDM gruplarında Hofbauer hücre sayısı  $24,26 \pm 5,6$ ;  $47,58 \pm 12,67$ ;  $52,28 \pm 9,1$  (sırası ile) olarak belirlendi. T2DM ve GDM gruplarındaki CD68 immünopozitif Hofbauer hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu belirlendi ( $p < 0,001$ ). GDM grubunda bulunan Hofbauer hücrelerinin T2DM grubuna göre anlamlı olarak daha fazla sayıda olduğu tespit edildi ( $p < 0,05$ ). Western Blot analizi sonucunda ise CD68 miktarının kontrol grubuna göre T2DM ve GDM gruplarında arttığı görüldü. İmmünohistokimyasal boyama sonuçları ile Western Blot yöntemiyle elde ettiğimiz sonuçlar birbirini destekler durumdadır.

Hiperglisemi kaynaklı vasküler bozukluklar diyabet patolojisinde yaygın olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalarda, maternal veya fetal hipergliseminin proinflamatuvar ve proanjiyogenik ajan etkisi gösterdiği belirlenmiştir [81, 82]. Yüksek glukoz varlığında endotel hücreleri, prostoglandin üretimini artırır ve VEGF inhibitörü olan nitrik oksitini erişilirliğini azaltır. Böylece VEGF üretiminin artması ile anjiyogenez olayının tetiklendiği düşünülmektedir [83]. Akarsu, Bağırzade, Ömeroğlu ve Böke (2017), tip-1 ve gestasyonel diyabetli gebe plasentalarında vaskülarizasyon ve apoptozis süreçlerindeki değişimleri analiz etmek amacıyla 6 sağlıklı, 6 gestasyonel diyabetli ve 6 tip-1 diyabetli gebe plasentasından örnekler alıp immünohistokimyasal yöntemler uygulamışlardır. Tip-1 diyabetli gebeler insülin tedavisi almış olup, gestasyonel diyabetli gebeler diyet ile kontrol edilmiştir. Gestasyonel diyabetli ve tip-1 diyabetli gebe plasentaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında VEGF'e karşı daha güçlü bir immünreaktivite göstermişlerdir. Gestasyonel diyabetli ve tip-1 diyabetli gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Ayrıca Caspase-9 boyanması hem tip-1 diyabet grubunda hem de gestasyonel diyabet grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha fazla oranda belirlenmiştir [11]. Biz de çalışmamızda endotel belirteci olan CD31 ile diyabetik gruplarda plasentadaki vaskülarizasyonda meydana gelen değişikliği inceledik.

Gestasyonel diyabetli plasentalarda hipervaskülarizasyon olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir fakat bu süreçte VEGF ve VEGF reseptörünün etki mekanizması netleşmemiştir. 2017 yılında yapılan bir çalışmada, gestasyonel diyabetli gebe plasentalarında VEGF reseptör-1 ve reseptör-2'nin farklı pozisyonlardaki amino asitlerin fosforilasyonundaki değişikliği ve GDM'de görülen proanjiyogenik durum ile olan ilişkisi incelenmiştir. Çalışmada, 24 sağlıklı ve 18 gestasyonel diyabetli gebe plasentasından elde edilen dokularda CD31 ve CD34 belirteçleri kullanılarak endotel hücre değerlendirilmesi, VEGF, VEGF reseptör-1, VEGF reseptör-2'nin ifadeleri ve VEGF reseptör-2'nin farklı pozisyonlardaki tirozin fosforlanmaları değerlendirilmiştir. GDM'li grupta CD31 ve CD34 ifadelerinin kontrol grubuna göre daha fazla bulunduğu hem immünohistokimyasal değerlendirme ile hem de Western blot analizleri sonucunda görülmüştür. Ayrıca GDM'li plasentalarda koryonik villus başına düşen damar sayısının kontrol grubuna göre daha fazla olduğu bildirilmiştir. GDM'li plasentalarda VEGF reseptör-1'in ifadesi kontrol grubuna göre daha azken, VEGF reseptör-2'nin protein düzeyinde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Farklı bölgelerdeki tirozinde meydana gelen VEGF reseptör-2 fosforilasyonu ile GDM durumu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Sonuç olarak GDM'li gebe plasentalarında yüksek oranda ifade edilen endotel belirteçleri ve VEGF reseptör-2 ifadesi bu gebelerde hipervaskülarizasyonun varlığına ve gestasyonel diyabetin proanjiyogenik bir durum olduğuna işaret etmektedir [68]. Bu bulgular bizim çalışmamızda da hem GDM hem de T2DM gruplarından elde ettiğimiz CD31 tutulumunun arttığını gösteren sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

Gestasyonel diabetes mellitus ve maternal obezitenin sebep olduğu metabolik bozulmaların hiperglisemik ortam oluşturup vasküler yapılarda meydana gelen değişimle beraber plasenta gelişimine ve işlevselliğine etki ettiği bilinmektedir. Araştırmacılar, gestasyonel kaynaklı hipoksik stres ve inflamasyondaki artışın plasenta üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile oluşturulan hayvan modelinde VEGF, hipoksi indüklenebilir faktör 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), CD31 ve NF $\kappa$ B ifadelerini hem mRNA hem de protein düzeyinde değerlendirmişlerdir. Çalışma, yüksek yağlı ve normal diyet ile beslenen iki grup deney hayvanından oluşmaktadır. Yüksek yağlı diyetle beslenen grupta kontrol grubuna göre artan maternal kilo alımı, yüksek glukoz seviyesi, yüksek total kolesterol ve insülin direnci görülmüştür. VEGF'nin transkripsiyon faktörü olan HIF-1 $\alpha$  ifadesinin yüksek yağlı diyet ile beslenen grupta arttığı ve VEGF ifadesinin de HIF-1 $\alpha$  ile benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca endotel belirteci olan CD31 ile belirlenen kapiller artışı hipoksik durumlarda artan anjiyogenez durumunu doğrular niteliktedir. Bizim çalışmamızda da diyabetik gruplarda kontrol grubuna göre

CD31 tutulumu artmıştır. İnflammatuar yanıtta önemli rolü olan NFκB ifadesinin hipoksik koşullarda arttığı bilinmektedir [84]. Bu çalışmada, yüksek yağlı diyet grubunda NFκB'nin mRNA ve protein miktarında artış olduğu gösterilmiştir. Böylece obezite ve GDM gibi patolojik durumların kronik hipoksi gelişimi ile birlikte anjiyogenez ve inflammatuar yanıtta da sebep olduğu, bunun sonucunda perinatal komplikasyon oluşturacak mekanizmaların ortaya çıkma riskini arttırabileceği sonucuna varılmıştır [85].

Bhattacharjee, Mondal, Garain, Mandal, Ray ve Dey (2017) farklı glisemik durumlara sahip gebelerin plasentaları ile morfolojik ve histokimyasal değerlendirmeler yapmışlardır. Çalışma, normoglisemik (12 gebe), GDM (33 gebe), hafif glisemik (13 gebe) ve yüksek glisemik (18 gebe) gruplarından oluşmuştur. Çalışmanın amacı değişik şiddetteki diyabetik plasentalarda ortaya çıkan farklı histopatolojik değişimleri belirlemek ve VEGF ifadesi ile ilişkisini değerlendirmektir. Elde edilen sonuçlarda yüksek glisemik grupta % 44,4 villus immatüritesi, % 38,9 villus ödemi, % 61,1 koranjiyoz, % 38,9 fibrinoid birikimi ve % 44,4 oranda Hofbauer hücre hiperplazisi görülmüştür. GDM grubunda % 45,5 villus immatüritesi, % 45,5 villus ödemi, % 61,5 koranjiyoz, % 61,5 fibrinoid birikimi olan plasenta belirlenmiştir. GDM grubunda yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda VEGF tutulumunun sinsityotroblastlarda orta şiddette, sitotroblastlarda zayıf şiddette olduğu görülürken diğer yapılarda immünpozitifliğe rastlanmamıştır. Normoglisemik plasenta grubu ile karşılaştırıldığında, yüksek glisemik grupta VEGF ifadesinin arttığı; sinsityotroblastlarda güçlü şiddette, sitotroblastlarda ve mezenşimal hücrelerde orta şiddette, kapiller endotelinde ise güçlü şiddette immünpozitiflik olduğu belirlenmiştir. Hafif glisemik gruptaki VEGF ifadesinin normoglisemik grup ile benzer olduğu görülmüştür. Çalışmanın sonucunda GDM, hafif glisemik ve yüksek glisemik plasentaların birbirinden farklı histopatolojilerle beraber farklı VEGF ifadesine sahip olduğu gösterilmiştir. VEGF ifadesindeki farklılığın histopatolojiler arasındaki değişiklikte payı olabileceği sonucuna varılmıştır [86]. Bu bulgular bizim çalışmamızla da farklı diyabet grubuna ait plasentalarda gördüğümüz farklı seviyedeki morfolojik değişiklikler ile uygunluk göstermektedir.

Hipergliseminin kapillarizasyon üzerinde indükleyici bir etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalar tarafından gösterilmiştir [87]. Çalışmamızda endotel belirteci olan CD31 ile immünohistokimyasal yöntem uygulanarak kapiller değerlendirmesi yapıldı. Kontrol grubuna göre GDM ve T2DM gruplarında CD31 tutulumunda artış görüldü. CD31 ile yapılan Western blot analizi de immünohistokimyasal boyama bulgumuzu destekleyerek her iki diyabet grubunda da kontrol grubuna göre CD31 ifadesinin arttığını gösterdi.

Plasental villuslarda, sitotrofoblast, sinsityotrofoblast ve kapiller yapıları bulunur. Villus gelişimi sürecinde mononükleer sitotrofoblastlar membran füzyonu ile birleşerek multinükleer sinsityotrofoblastlara farklılaşır. Gebeliğin ilerlemesi ve madde geçişinin artmasıyla birlikte sinsityotrofoblastların boyu azalır, sitotrofoblast sayısı azalır, kapiller sayısı artar ve böylece plasental bariyer kalınlığı incelenerek maternofetal diffüzyon aralığı azalmış olur [25]. Sinsityotrofoblastlar, plasental işlevlerin yerine getirilmesinde önemli rol oynar. Sinsityotrofoblastlar, gebeliğin devamı için gerekli olan insan koryonik gonadotropin ve insan plasental laktojen gibi gebelik ile ilişkili hormonların üretilmesini sağladığı için sitotrofoblastlardan sinsityotrofoblastlara farklılaşma olayı sağlıklı bir plasenta gelişimi için çok önemlidir [38].

Günümüzde devamlı olarak artan maternal obezite ile birlikte gestasyonel diyabet insidansında da artış görülmektedir. Gebelikte görülen ve kontrol edilmeyen diyabetin makrozomi, doğum travması, neonatal hipoglisemi ve respiratuvar distres sendromu gibi fetal ve neonatal olumsuz sonuçlar ile ilişkili olması ve ayrıca önemli obstetrik sendromlar arasında bildirilmesi, maternal ve fetal dolaşım arasında doğal bir bariyer olarak yer alan plasentanın maternal ve fetal ilişkideki önemini ifade etmektedir. Fetal gelişimde önemli rollere sahip plasenta, hiperglisemik ortama karşı duyarlılık göstererek bu şartlara uyum sağlayabilmek için yapısal ve işlevsel değişiklikler meydana getirir. Farklı şiddette diyabet olan 7 kadından 6'sında plasentada değişimler ve takibinde ortaya çıkan vasküler disfonksiyon görülür. Çoğu GDM'li gebe plasentasında villus immatüritesi, villus fibrinoid nekroz, ve artan anjiyogenez gibi histolojik bulgular bulunmaktadır. Diyabet kaynaklı olarak plasentada ortaya çıkan disfonksiyon çeşitleri, glisemik hastalıkların meydana gelme zamanına bağlı olarak değişir. Gebeliğin erken döneminde teşhis edilen glukoz metabolizmasındaki bozulma yapısal disfonksiyonlara sebep olurken, geç dönemde ortaya çıkan GDM plasentanın işlevselliği üzerinde daha büyük çapta etkilerin görülmesine sebep olur. Ayrıca, birçok çalışma diyabetik plasentalarda meydana gelen değişikliklerin kronik fetal hipoksiye sebebiyet veren inflamasyon ve oksidatif stres ile ilişkili olduğunu iddia etmektedir. Hipergliseminin plasental disfonksiyon ve ardından ortaya çıkan gebelik komplikasyonlarına sebep olduğu olaylar zincirini anlamının, ilerleyen çalışmalara büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir [6].

Maternal diyabetli plasentaların villus yapılarının dismatür veya immatür olabileceği bilinmektedir. Gebelikte maternal diyabetin plasenta üzerinde birçok işlevsel ve yapısal patolojik değişikliğe sebep olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar kalıcı sitotrofoblastik



tabakanın villus yapısında bulunmasının immatürite göstergesi olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca sitotrofoblastik hücre bölünmelerinin artması ve trofoblastik bazal membran kalınlaşmasının da diyabetli gebe plasentalarında bulunabileceği belirtilmiştir [25]. Bizim çalışmamızda, tip-2 ve gestasyonel DM grubunda trofoblastik bazal membran kalınlığı kontrol grubuna göre daha belirgindir. Ayrıca diyabet varlığında villus matürasyonu ETS-1 değişimi ile incelenmiştir.

İn vitro olarak primer insan sitotrofoblastların sinsityotrofoblastlara farklılaşması iki aşamaya ayrılır. Morfolojik farklılaşma olarak gerçekleşen ilk aşama sitotrofoblastların çoğalma, toplama ve birleşerek sinsityumu oluşturmalarını kapsar. Biyokimyasal olarak nitelendirilen ikinci aşamada ise hücreler hormon sentezi ve salınımı, metabolizma ve diğer farklılaşmış sinsityotrofoblast işlevleri için gerekli olan genleri ifade etmeye başlar. Birçok çalışma, farklılaşmanın bu iki aşamasının birbirine bağlı olduğunu ve hücrelerin biyokimyasal olarak farklılaşmadan önce morfolojik olarak farklılaşmaları gerektiğini göstermiştir [88].

Sağlıklı ve gestasyonel diyabetli gebeler ile yapılan bir çalışmada kontrol grubuna göre GDM grubunda villus immatüritesinin anlamlı olarak arttığı, ayrıca GDM grubunda korangiyoz ve nükleuslu fetal eritrosit varlığı gösterilmiştir. Elde edilen bu veriler GDM varlığında ortaya çıkan kronik fetal hipoksi geliştiğini işaret etmektedir. Sonuç olarak GDM grubunda meydana gelen histopatolojik olguların fetal komplikasyonlara sebep olabileceği öngörülmektedir [72].

İnsan plasental farklılaşmasını yönlendiren genetik temeli araştırmak amacı ile Aronow, Richardson ve Handwerger (2001), kendiliğinden farklılaşan ve büyük oranda arındırılarak hazırlanan insan sitotrofoblast hücreleri ile DNA mikrodizilim analizi yapmıştır. Elde edilen RNA örnekleri, 7197 prob seti barındıran Incyte Human GEM V mikrodizilimi ve sonrasında 54675 prob seti içeren Affymetrix U133 mikrodizilimi kullanılarak sonuçlar analiz edilmiştir. Kullanılan iki farklı mikrodizilim platformundan elde edilen sonuçlar önemli ölçüde uyuma göstermiştir. İzole edilen ve primer kültürde arındırılmış olarak büyütülen sitotrofoblast hücrelerinin ilk 2-3 gün süresince toplandığı ve birleşerek multinükleer sinsityumu oluşturduğu gösterilmiştir. Hücre kültüründe geçen sonraki günlerde birleşip multinükleer yapıya sahip olan bu hücrelerin farklılaşmış sinsityotrofoblastlar tarafından ifade edilen plasental laktojen, insan koryonik gonadotropin ve diğer proteinleri yüksek oranda ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca yapılan analizlerden elde

edilen sonuçlar, geniş çaplı genom Affymetrix mikrodizilimin içerdiği 54675 genden 1062 tanesinin indüklendiği ve 1592 tanesinin farklılaşmamış hücrelerle karşılaştırıldığında iki katından fazla oranda azaldığını göstermiştir. Sitotrofoblastların farklılaşma sürecinde bazı genlerin ifadesinin azalıp, bazılarının arttığı ve biyokimyasal olarak farklılaşmış sinsityotrofoblast işlevlerini yerine getirmek için hücrelerin birçok farklı mekanizmayı meydana getirerek bu duruma adaptasyon sağladığı düşünülmektedir [39, 88].

Villus trofoblast hücrelerinin işlevsel olarak farklılaşması ve sitotrofoblastların füzyonu östradiol, glukokortikoidler ve hCG gibi hormonlar tarafından tetiklenir. Bu hormonlar farklı zamanlarda ve miktarlarda salgılandıklarından fizyolojik olarak trofoblast farklılaşmasını etkin bir şekilde regüle edebilir. Özellikle hCG erken gelişim döneminde yüksek oranda bulunduğu için mitotik özelliğe sahip sitotrofoblastların birleşmesi ile mitoz özelliği olmayan sinsityotrofoblastlara farklılaşmasını etkiler. Ayrıca farklılaşmanın en önemli olaylarından olan sitotrofoblastların füzyon sürecinin artan ikincil haberci (cAMP) ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [36]. İmmatür villus yapısını geniş villus çapı, fazla miktardaki gevşek stromal bağ dokusu, küçük kapillerlerin ve belirgin trofoblastların varlığı ile betimleyen Greco, Kamat ve Demopoulos yaptıkları çalışmada sağlıklı ve gestasyonel diyabetli gebelerden oluşan iki gruba  $\beta$  hCG, hPL ve plasental alkalın fosfotaz (PLAP) dağılımları üzerinden incelemiştir. İncelenen trofoblastik proteinlerin immunohistokimyasal boyamaları sonucunda diyabetik gebelerin plasentalarında artan hCG, azalan PLAP ve hPL görmüşlerdir [89]. Çalışmamızda literatürde daha önce değerlendirilen bu parametrelere bakılmamıştır. Ancak onların yerine son çalışmalarda trofoblast farklılaşmasında görev aldığı düşünülen ETS-1'in diyabetik plasentalardaki ifadesi değerlendirilmiştir.

Transkripsiyon faktör v-ets avian erythroblastokist virus E26 oncogene homolog 1 (ETS-1); MMP-3, kollagenaz-1 gibi ekstrasellular matriks yeniden modellenmesinde yer alan genlerin ifadesini kontrol etmektedir. Takai, Ueda, Narahara ve Miyakawa (2006) ETS-1'in trofoblast invazyonuyla olan ilişkisi incelemek amacıyla gebeliğin 9-12 ve 38-41 hafta aralıklarındaki gebelerden plasenta örnekleri almışlardır. Gebeliğin farklı dönemlerindeki bu plasentalara Western blot analizi ve immunofloresan boyama yöntemleri uygulamışlardır. Gebeliğin ilk üç ayında ETS-1 ifadesinin sitotrofoblast sitoplazmasında olduğu, son üç ayında ise invaziv trofoblastların hem sitoplazmasında hem de nükleusunda bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca yapılan Western blot analizi göstermiştir ki gebeliğin ilk üç ayında, görülen ETS-1 ifadesi son üç aya göre çok daha fazladır. Araştırmacılar, normal plasentada gebelik haftasının artması ile beraber ETS-1 ifadesinin azaldığını görmüşler ve

trofoblastların invazyon özellikleri ile ETS-1 ifadesi arasında korelasyon olduğunu, bu bağlamda erken dönemde trofoblast gelişimindeki invazyon yolağını MMP-3, kollagenaz ve u-PA gibi proteinlerin transkripsiyonlarını aktive ederek tetikleyen bir faktör olabileceğini belirtmişlerdir [42]. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara miadını tamamlamış sağlıklı plasentalarda, erken dönemde villus matürasyonu için gerekli olan ETS-1 ifadesinin termde azalmış olacağı sonucu elde edilmiştir. Diyabet varlığında immatür villusların sağlıklı gebelere göre daha fazla olduğu bilindiğinden diyabetik gruptaki term plasentalarda ETS-1 ifadesinin sağlıklı gebelere göre daha fazla olacağı düşünüldü.

ETS-1, neovaskülarizasyon ve invazyon süreci ile ilişkili olduğu bilinen transkripsiyon faktörlerinden biridir. Yapılan bir çalışmada, gebeliğin ilk trimestirinde gerçekleşen implantasyon sürecinde ETS-1 ifadesini incelemek amacı ile küretaj materyallerinden trofoblast örnekleri alınmış ve in situ hibridizasyon yöntemi uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda CD34 belirteci ile ayırt edilen villus endotel hücrelerinde ve uterustaki damarları invaze eden ekstravillöz trofoblast hücrelerinde ETS-1 mRNA varlığı tespit edilmiştir. Maternal endotel hücrelerinde, mRNA düzeyinde herhangi bir ETS-1 görülmemiştir. Alınan sonuçlara dayanarak ETS-1'in villus ağacı gelişirken meydana gelen angiogenezde rol aldığı ve implantasyon sürecinde uterus ve maternal damar invazyonunda görev aldığı düşünülmüştür. Ayrıca ETS-1'in metalloproteinaz genlerinin transkripsiyon regülasyonu ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir [90]. Bu çalışma, ETS-1 ile yapılan immünohistokimyasal boyama görüntülerimizdeki ETS-1 pozitif kapiller yapılarının sebebinin açıklar niteliktedir. Biz de çalışmamızda hem anjiyogenez hem de villus matürasyonunda görev aldığı düşünülen ETS-1 ifadesinin diyabet varlığında arttığını belirledik.

Kessler, Stanek, Stringer ve Handwerger (2015), ETS-1'in trofoblast hücre farklılaşması üzerindeki rolünü, multinükleer sinsityotrofoblastlara farklılaşan insan sitotrofoblastları ile incelemiştir. Araştırmada, term plasentalardan izole edilen sitotrofoblastlar kullanılmıştır. İmmünohistokimyasal yöntemler ile ETS-1'in plasentada villus yapısında bulunduğu gösterilmiştir. Plasentadan izole edilen sitotrofoblastlar hücre kültüründe büyütüldükten sonra ETS-1 siRNA ile susturulmuş ve hücre membranını gösteren desmoplankin boyaması yapılmıştır. ETS-1 geni susturulan gruptaki hücrelerin, normal sitotrofoblastlara göre multinükleer yapıya farklılaşmasının azaldığı görülmüştür. Ayrıca, ETS-1 geni susturulmuş sitotrofoblast hücrelerinde siRNA uygulanmayan sitotrofoblastlara göre diğer sinsityotrofoblast belirteçlerinden olan, sinsitin, transkripsiyon faktör aktivatör protein-2 ve plasental laktojen ifadelerinin de azaldığı qPCR yöntemi ile gösterilmiştir. Geçici transfeksiyon yöntemi ile ETS-1'i aşırı ifade eden sitotrofoblast hücrelerinde normal

sitotrofoblast hücrelerine göre sitotrofoblast belirteçlerinde mRNA düzeyinde artış görülmüştür. Sonuç olarak ETS-1'in sitotrofoblastların sinsityotrofoblastlara farklılaşmasını indüklediği düşünülmektedir. Tüm bu bilgiler göstermiştir ki, sitotrofoblastların farklılaşma sürecinde ETS-1 önemli bir rol oynamaktadır [14].

Yapılan tüm bu çalışmalar ışığında biz de çalışmamızda, diyabetin trofoblast gelişimini nasıl etkilediğini incelemek amacı ile literatürde farklılaşmayı tetiklediği düşünülen ETS-1 molekülünün diyabet varlığındaki ifadesini inceledik. GDM ve T2DM gruplarında, kontrol grubuna göre sinsityotrofoblastlarda daha kuvvetli ETS-1 tutulumu görüldü. GDM ve T2DM grupları karşılaştırıldığında GDM grubundaki ETS-1 tutulumunun daha kuvvetli olduğu saptandı. Trofoblastların farklılaşması için gerekli olan ETS-1 ifadesinin termdeki plasentada azaldığı bilinirken sağlıklı gruba göre diyabetli gruplarda artış göstermesi, diyabetin villus matürasyonunu etkilediği ve trofoblast farklılaşma sürecinin diyabetli gruplarda tamamlanmadığını ifade ettiği düşünüldü.

Literatürdeki bir çalışmada ETS-1 ifadesinin CD68+ makrofajlarda ve ASO2+ fibroblastlarda bulunduğu yapılan ikili boyama sonucunda tespit edilmiştir. Ayrıca IL-1 ve TNF $\alpha$ 'nın ETS-1 ifadesini indüklediği gösterilmiştir. Elde edilen veriler ile ETS-1'in sitokin aracılı inflamasyon mekanizmalarında yer aldığı sonucuna varılmıştır [91]. Çalışmamızda villus stromasında az sayıda görülen ETS-1 tutulumunun stromada yer alan diğer hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir, immünohistokimyasal değerlendirme sadece sinsityotrofoblast tabakasındaki tutulum göz önüne alınarak yapıldı.

Plasentada meydana gelen farklı patolojilerin diyabet tipi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Huynh ve diğerleri 18-40 yaş aralığında olan tip-1 (T1DM; n:36), tip-2 (T2DM; n:37) ve gestasyonel diyabetes mellitus (GDM; n:126) tanıları gebelerin plasentalarını incelemiştir. T1DM grubundaki gebelerin T2DM ve GDM grubundakilere göre daha fazla gebelik kilosu aldığı görülmüştür. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda T1DM ile T2DM ve GDM plasentalarında görülen infarktüs prevalansında anlamlı bir fark görülmemiştir. T2DM ve GDM plasentaları karşılaştırıldığında, T2DM grubunda daha yüksek oranda desidual vaskülopati ve koranjyoz görülürken daha az villus immatüritesi görülmüştür. Yapılan bu araştırma maternal diyabet tipinin plasental vaskülopatik abnormalite üzerine etkisi olduğunu ve bunun farklı patofizyolojik mekanizmalardan kaynaklanabileceğini belirtmiştir [16]. Bizim çalışmamızda da kontrol grubuna göre artmış ETS-1 ve CD68 ifadesi görülen diyabetik gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında GDM grubunda daha fazla ETS-1 ve

CD68 ifadesi olduğu hem immünohistokimyasal boyama sonucunda hem de Western blot analizlerinde görüldü. Endotel belirteci olan CD31 ifadesinde ise gestasyonel ve tip-2 DM gruplarında kontrol grubuna göre artış görülürken, kendi aralarında herhangi bir anlamlı farklılık saptanmadı.

Plasental gelişim için, trofoblastların uygun bir şekilde çoğalması, invaze olması ve farklılaşarak villus stromasındaki kapillerler ile birlikte matür villus yapısını meydana getirmesi gerekmektedir. Villus matürasyonunda meydana gelecek bir bozulmanın oksijen ve besin geçişini etkileyerek fetal malformasyonlara sebep olabileceği ifade edilmiştir [92].



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Şehir hayatı ile birlikte artan hareketsiz yaşam şekli ve yüksek kalorili beslenme toplumdaki diyabet görülme sıklığının artmasına sebep olmaktadır. Fetal gelişimde önemli işlevlere sahip olan plasentanın gebelik döneminde diyabet patolojisinden etkilendiği bilinmektedir. Çalışmamızda, tip-2 ve gestasyonel diyabetli gebe plasentaları ile sağlıklı gebe plasentaları karşılaştırılarak meydana gelen değişiklikler incelendi. Elde ettiğimiz bulgular sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tip-2 ve gestasyonel DM gruplarında villuslarda ödem, hiperkapillarizasyon, endovillöz kapillerlerde konjesyon, perivillöz aralıkta ekstrasvazasyon, artmış sinsityal düğüm ve fibrinoid birikimleri dikkat çekti. Ayrıca tip-2 ve gestasyonel DM gruplarında kontrol grubuna oranla daha fazla sayıda Hofbauer hücresi olduğu ve endotel hücrelerinde CD31 ifadesinde artış olduğu görüldü. Trofoblast farklılaşmasında rol alan ETS-1'in term plasentadaki sinsityotrofoblastlarda tip-2 ve gestasyonel DM gruplarında daha fazla ifade edildiği dikkat çekti. Bütün bu bulguların gerek tip-2 DM gerek GDM'un, plasentanın yapısal ve işlevsel birimi olan villuslarda immatüriteye, plasental hipoksiye ve iskemiye sekonder olarak gelişebileceği düşünülen vasküler yapılanmanın bozulmasına yol açabileceği düşünüldü.

Plasentanın yapısal ve işlevsel bozukluklarının fetal gelişimde olumsuz etkilere sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu durum fetal gelişim bozukluklarına, yeni doğanda mortalite ve morbiditeye neden olabilir. Tüm bunlar göz önüne alınarak gebelik öncesi ve gebelik döneminde hastaların iyi değerlendirilmesi, uygun tedavi ve yaklaşımların yapılması ile yeni doğanın oluşabilecek zararlara karşı korunması gereklidir.





## KAYNAKLAR

1. Gude, N.M., Roberts, C.T., Kalionis, B., and King, R.G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*, 114, 397-407.
2. Sadler, T.W., and Langman, J. (2012). *Langman's medical embryology (12. Edition)*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
3. Milosevic-Stevanovic, J., Krstic, M., Radovic-Janosevic, D., Stefanovic, M., Antic, V. and Djordjevic, I. (2016). Preeclampsia with and without intrauterine growth restriction-Two pathogenetically different entities? *Hypertension in Pregnancy*, 35, 573-582.
4. Ornoy, A. (2011). Prenatal origin of obesity and their complications: Gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical effects of fetal growth restriction and macrosomia. *Reproductive Toxicology*, 32, 205-212.
5. Satman, I., Omer, B., Tutuncu, Y., Kalaca, S., Gedik, S., Dinccag, N., Karsidag, K., Genc, S., Telci, A., Canbaz, B., Turker, F., Yilmaz, T., Cakir, B., Tuomilehto, J. and Group, T.-I.S. (2013). Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *European Journal of Epidemiology*, 28, 169-180.
6. Jarmuzek, P., Wielgos, M., and Bomba-Opon, D. (2015). Placental pathologic changes in gestational diabetes mellitus. *Neuro Endocrinology Letter*, 36, 101-105.
7. Ingman, K., Cookson, V.J., Jones, C.J. and Aplin, J.D. (2010). Characterisation of Hofbauer cells in first and second trimester placenta: incidence, phenotype, survival in vitro and motility. *Placenta*, 31, 535-544.
8. Demir, R. and Erbenli, T. (1984). Some new findings about Hofbauer cells in the chorionic villi of the human placenta. *Acta Anatomica (Basel)*, 119, 26.
9. Seval, Y., Korgun, E.T., and Demir, R. (2007). Hofbauer cells in early human placenta: possible implications in vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta*, 28, 841-845.
10. Yu, J., Zhou, Y., Gui, J., Li, A.Z., Su, X.L. and Feng, L. (2013). Assessment of the number and function of macrophages in the placenta of gestational diabetes mellitus patients. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical Sciences*, 33, 725-729.
11. Akarsu, S., Bagirzade, M., Omeroglu, S. and Buke, B. (2017). Placental vascularization and apoptosis in Type-1 and gestational DM. *Journal of Maternal-Fetal Neonatal Medicine*, 30, 1045-1050.
12. Knofler, M. and Pollheimer, J. (2013). Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Frontiers in Genetic*, 4, 190.

13. Cartwright, J.E., Fraser, R., Leslie, K., Wallace, A.E. and James, J.L. (2010). Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction*, 140, 803-813.
14. Kessler, C.A., Stanek, J.W., Stringer, K.F. and Handwerger, S. (2015). ETS1 induces human trophoblast differentiation. *Endocrinology*, 156, 1851-1859.
15. Pirinen, E., and Soini, Y. (2014). A survey of zeb1, twist and claudin 1 and 4 expression during placental development and disease. *APMIS*, 122, 530-538.
16. Huynh, J., Yamada, J., Beauharnais, C., Wenger, J.B., Thadhani, R.I., Wexler, D., Roberts, D.J. and Bentley-Lewis, R. (2015). Type 1, type 2 and gestational diabetes mellitus differentially impact placental pathologic characteristics of uteroplacental malperfusion. *Placenta*, 36, 1161-1166.
17. Sadler, T.W., Langman, J. (2012). *Langman's medical embryology (12. Edition)*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 3-130.
18. Kierszenbaum, A.L. (2002). *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. Mosby, 585-600.
19. Ross, M.H., Pawlina, W. (2010). *Histology : a text and atlas with correlated cell and molecular biology (6.edition)*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wil, 852-860.
20. Genbacev, O., Joslin, R., Damsky, C.H., Polliotti, B.M. and Fisher, S.J. (1996). Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *Journal of Clinical Investigation*, 97, 540-550.
21. Burrows, T.D., King, A. and Loke, Y.W. (1996). Trophoblast migration during human placental implantation. *Human Reproduction Update*, 2, 307-321.
22. Madazlı, R. (2008). *Plasenta*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi,
23. Kay, H., Nelson, D.M. and Wang, Y. (Editors) (2011). *The Placenta: From Development to Disease*. Wiley, Blackwell Publishing, 17-26.
24. Moore, K.L. Persaud, T.V.N. and Torchia, M.G. (2015). *The Developing Human E-Book: Clinically Oriented Embryology (10. Edition)*. Elsevier Health Sciences,
25. Baergen, R.N. (2005). *Manual of Benirschke and Kaufmann's Pathology of the Human Placenta*. Springer New York, 45-107, 319.
26. Ellery, P.M., Cindrova-Davies, T., Jauniaux, E., Ferguson-Smith, A.C. and Burton, G.J. (2009). Evidence for transcriptional activity in the syncytiotrophoblast of the human placenta. *Placenta*, 30, 329-334.
27. Costa, M.A. (2016). The endocrine function of human placenta: an overview. *Reproductive Biomedicine Online*, 32, 14-43.

28. Gauster, M., Moser, G., Orendi, K., and Huppertz, B. (2009). Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia. *Placenta*, 30 Suppl A, S49-54.
29. Benirschke, K., Burton, G.J. and Baergen, R.N. (2012). *Pathology of the Human Placenta* (6. Edition). Springer Berlin Heidelberg, 101-138, 395-407.
30. Castellucci, M., Celona, A., Bartels, H., Steininger, B., Benedetto, V. and Kaufmann, P. (1987). Mitosis of the Hofbauer cell: possible implications for a fetal macrophage. *Placenta*, 8, 65-76.
31. Kumazaki, K., Nakayama, M., Yanagihara, I., Suehara, N. and Wada, Y. (2004). Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Human Pathology*, 35, 47-54.
32. Aderem, A. and Ulevitch, R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406, 782-787.
33. Saji, F., Samejima, Y., Kamiura, S. and Koyama, M. (1999). Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. *Reviews of Reproduction*, 4, 81-89.
34. Wang, Y. and Zhao, S. (2010). Integrated Systems Physiology: from Molecules to Function to Disease. (editörler). *Vascular Biology of the Placenta*. San Rafael (CA). Morgan & Claypool Life Sciences Copyright (c) 2010 by Morgan & Claypool Life Sciences.,
35. Battistelli, M., Burattini, S., Pomini, F., Scavo, M., Caruso, A. and Falcieri, E. (2004). Ultrastructural study on human placenta from intrauterine growth retardation cases. *Microscopy Research Technique*, 65, 150-158.
36. Malassine, A. and Cronier, L. (2002). Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine*, 19, 3-11.
37. Mayhew, T.M. (2014). Turnover of human villous trophoblast in normal pregnancy: what do we know and what do we need to know? *Placenta*, 35, 229-240.
38. Ji, L., Brkic, J., Liu, M., Fu, G., Peng, C. and Wang, Y.L. (2013). Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine*, 34, 981-1023.
39. Handwerger, S. (2010). New insights into the regulation of human cytotrophoblast cell differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 323, 94-104.
40. Ng, Y.H., Zhu, H. and Leung, P.C. (2011). Twist regulates cadherin-mediated differentiation and fusion of human trophoblastic cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96, 3881-3890.
41. Lu, X. He, Y. Zhu, C. Wang, H. Chen, S. and Lin, H.Y. (2016). Twist1 is involved in trophoblast syncytialization by regulating GCM1. *Placenta*, 39, 45-54.

42. Takai, N., Ueda, T., Narahara, H. and Miyakawa, I. (2006). Expression of c-Ets1 protein in normal human placenta. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 61, 15-20.
43. Maroulakou, I.G. and Bowe, D.B. (2000). Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene*, 19, 6432-6442.
44. Wasylyk, C., Gutman, A., Nicholson, R. and Wasylyk, B. (1991). The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *Embo journal*, 10, 1127-1134.
45. Kaufmann, P., Luckhardt, M., Schweikhart, G. and Cattle, S.J. (1987). Cross-sectional features and three-dimensional structure of human placental villi. *Placenta*, 8, 235-247.
46. Zhou, Y., Damsky, C.H. and Fisher, S.J. (1997). Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *Journal of Clinical Investigation*, 99, 2152-2164.
47. Servos, S., Zachary, I. and Martin, J.F. (1999). VEGF modulates NO production: the basis of a cytoprotective effect? *Cardiovascular Research*, 41, 509-510.
48. Rizov, M., Andreeva, P. and Dimova, I. (2017). Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 56, 127-132.
49. Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M.S., Ehrlich, H.P. and Brem, H. (2009). The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Journal of Surgical Research*, 153, 347-358.
50. Taimeh, Z., Loughran, J., Birks, E.J. and Bolli, R. (2013). Vascular endothelial growth factor in heart failure. *Nature Review Cardiology*, 10, 519-530.
51. Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3, 4-10.
52. Duffy A. M. and Bouchier-Hayes D. J. H. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF. *VEGF and Cancer*. In: Madame Curie Bioscience Database: Landes Bioscience.
53. DeLisser, H.M., Christofidou-Solomidou, M., Strieter, R.M., Burdick, M.D., Robinson, C.S., Wexler, R.S., Kerr, J.S., Garlanda, C., Merwin, J.R., Madri, J.A. and Albelda, S.M. (1997). Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *American Journal of Pathology*, 151, 671-677.
54. Majchrzak, K., Kaspera, W., Szymaś, J., Bobek-Billewicz, B., Hebda, A. and Majchrzak, H. (2013). Markers of angiogenesis (CD31, CD34, rCBV) and their prognostic value in low-grade gliomas. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 47, 325-331.

55. Pusztaszeri, M.P., Seelentag, W. and Bosman, F.T. (2006). Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54, 385-395.
56. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27, 1047-1053.
57. Wong, E., Backholer, K., Gearon, E., Harding, J., Freak-Poli, R., Stevenson, C. and Peeters, A. (2013). Diabetes and risk of physical disability in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 1, 106-114.
58. American Diabetes, A. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37 Suppl 1, S81-90.
59. Rosenbloom, A.L., Silverstein, J.H., Amemiya, S., Zeitler, P. and Klingensmith, G.J. (2008). ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2006-2007. Type 2 diabetes mellitus in the child and adolescent. *Pediatric Diabetes*, 9, 512-526.
60. DeFronzo A. R., Ferrannini E., Zimmet P., and Alberti A. G. (editors) (2015). *International Textbook of Diabetes Mellitus* (3.edition). Wiley, Blackwells
61. Reinehr, T. (2013). Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *World Journal of Diabetes*, 4, 270-281.
62. Kharroubi, A.T. and Darwish, H.M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, 6, 850-867.
63. Olokoba, A.B., Obateru, O.A. and Olokoba, L.B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Medical Journal*, 27, 269-273.
64. Chiefari, E., Arcidiacono, B., Foti, D. and Brunetti, A. (2017). Gestational diabetes mellitus: an updated overview. *Journal of Endocrinological Investigation*, 40, 899-909.
65. Rizzo, G., Arduini, D., Capponi, A. and Romanini, C. (1995). Cardiac and venous blood flow in fetuses of insulin-dependent diabetic mothers: evidence of abnormal hemodynamics in early gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 173, 1775-1781.
66. Fox, H. (1997). *Pathology of the placenta* (3. Edition). W.B. Saunders,
67. Nelson–Piercy, C. (2003). *Sistemik Hastalıklar ve Gebelik*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, 82-99.
68. Troncoso, F., Acurio, J., Herlitz, K., Aguayo, C., Bertoglia, P., Guzman-Gutierrez, E., Loyola, M., Gonzalez, M., Rezgaoui, M., Desoye, G. and Escudero, C. (2017). Gestational diabetes mellitus is associated with increased pro-migratory activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 and reduced expression of vascular endothelial growth factor receptor 1. *PLoS One*, 12, e0182509.

69. Masharani, U. and German, M.S. (2011). Chapter 17. Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus. D.G. Gardner ve Shoback, D. (editörler). *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology, 9e*. New York, NY. The McGraw-Hill Companies,
70. Hall, D., du Toit, M., Mason, D. and Conradie, M. (2015). Diabetes mellitus in pregnancy, still changing. *Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa*, 20, 108-114.
71. Jansson, T., Cetin, I., Powell, T.L., Desoye, G., Radaelli, T., Ericsson, A. and Sibley, C.P. (2006). Placental transport and metabolism in fetal overgrowth -- a workshop report. *Placenta*, 27 Suppl A, S109-113.
72. Daskalakis, G., Marinopoulos, S., Krielesi, V., Papapanagiotou, A., Papantoniou, N., Mesogitis, S. and Antsaklis, A. (2008). Placental pathology in women with gestational diabetes. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 87, 403-407.
73. Treesh, S.A. and Khair, N.S. (2015). Histological Changes of the Human Placenta in Pregnancies Complicated with Diabetes. *Cytology & Histology*. 6-307
74. Makris, K. and Spanou, L. (2011). Is There a Relationship between Mean Blood Glucose and Glycated Hemoglobin? *Journal of Diabetes Science and Technology*, 5, 1572-1583.
75. Mrizak, I., Grissa, O., Henault, B., Fekih, M., Bouslema, A., Boumaiza, I., Zaouali, M., Tabka, Z. and Khan, N.A. (2014). Placental infiltration of inflammatory markers in gestational diabetic women. *General Physiology and Biophys*, 33, 169-176.
76. Jacomo, K.H., Benedetti, W.L., Sala, M.A. and Alvarez, H. (1976). Pathology of the trophoblast and fetal vessels of the placenta in maternal diabetes mellitus. *Acta Diabetologica Latina*, 13, 216-235.
77. Landers, K. and Richard, K. (2017). Traversing barriers - How thyroid hormones pass placental, blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 458, 22-28.
78. Khan, S., Katabuchi, H., Araki, M., Nishimura, R. and Okamura, H. (2000). Human villous macrophage-conditioned media enhance human trophoblast growth and differentiation in vitro. *Biology of Reproduction*, 62, 1075-1083.
79. Karakaya, Y.A. and Ozer, E. (2013). The role of Hofbauer cells on the pathogenesis of early pregnancy loss. *Placenta*, 34, 1211-1215.
80. Challier, J.C., Basu, S., Bintein, T., Minium, J., Hotmire, K., Catalano, P.M. and Hauguel-de Mouzon, S. (2008). Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta*, 29, 274-281.
81. Sweet, I.R., Gilbert, M., Maloney, E., Hockenbery, D.M., Schwartz, M.W. and Kim, F. (2009). Endothelial inflammation induced by excess glucose is associated with cytosolic glucose 6-phosphate but not increased mitochondrial respiration. *Diabetologia*, 52, 921-931.

82. Yang, Z., Laubach, V.E., French, B.A. and Kron, I.L. (2009). Acute hyperglycemia enhances oxidative stress and exacerbates myocardial infarction by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase during reperfusion. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 137, 723-729.
83. Leach, L., Taylor, A. and Sciota, F. (2009). Vascular dysfunction in the diabetic placenta: causes and consequences. *Journal of Anatomy*, 215, 69-76.
84. D'Ignazio, L. and Rocha, S. (2016). Hypoxia Induced NF- $\kappa$ B. *Cells*, 5.
85. Li, H.P. Chen, X. ve Li, M.Q. (2013). Gestational diabetes induces chronic hypoxia stress and excessive inflammatory response in murine placenta. *Int J Clin Exp Pathol*, 6, 650-659.
86. Bhattacharjee, D., Mondal, S.K., Garain, P., Mandal, P., Ray, R.N. and Dey, G. (2017). Histopathological study with immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in placentas of hyperglycemic and diabetic women. *Journal of Laboratory Physicians*, 9, 227-233.
87. Martin, A., Komada, M.R. and Sane, D.C. (2003). Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Medicinal Research Reviews*, 23, 117-145.
88. Aronow, B.J., Richardson, B.D. and Handwerger, S. (2001). Microarray analysis of trophoblast differentiation: gene expression reprogramming in key gene function categories. *Physiological Genomics*, 6, 105-116.
89. Greco, M.A.i Kamat, B.R. and Demopoulos, R.I. (1989). Placental protein distribution in maternal diabetes mellitus: an immunocytochemical study. *Pediatric Pathology*, 9, 679-690.
90. Luton, D., Sibony, O., Oury, J.F., Blot, P., Dieterlen-Lievre, F. and Pardanaud, L. (1997). The c-ets1 protooncogene is expressed in human trophoblast during the first trimester of pregnancy. *Early Human Development*, 47, 147-156.
91. Redlich, K., Kiener, H.P., Schett, G., Tohidast-Akrad, M., Selzer, E., Radda, I. Stummvoll, G.H., Steiner, C.W., Gröger, M. and Bitzan, P. (2001). Overexpression of transcription factor Ets-1 in rheumatoid arthritis synovial membrane: Regulation of expression and activation by interleukin-1 and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arthritis & Rheumatology*, 44, 266-274.
92. Djelmis, J., Desoye, G. and Ivanisevi, M. (Editors) (2005). *Diabetology of Pregnancy*. Basel, Karger, 2005, vol 17.





## **EKLER**

## EK-1. Etik Kurul Onayı

## KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

|                                  |                                                                                                                                    |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI            | TİP-2 VE GESTASYONEL DİYABETLİ GEBE PLASENTALARININ TROFOBlast GELİŞİMİ, ANJİYOGENEZ YÖNÜNDEN KARŞILAŞTIRILMALI OLARAK İNCELENMESİ |
| VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU |                                                                                                                                    |

|                      |                  |                                                                                                                                   |
|----------------------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ETİK KURUL BİLGİLERİ | ETİK KURULUN ADI | T.C SAĞLIK BAKANLIĞI ZEKAI TAHİR BURAK KADIN SAĞLIĞI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-19) |
|                      | AÇIK ADRESİ:     | T.C. Sağlık Bakanlığı Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Talatpaşa Bulvarı Samanpazarı/ANKARA          |
|                      | TELEFON          | 0 312 306 56 85                                                                                                                   |
|                      | FAKS             | 0 312 312 50 69                                                                                                                   |
|                      | E-POSTA          | etik_kurul@yahoo.com.tr                                                                                                           |

BAŞVURU BİLGİLERİ

|                                                                                                 |                                                                                   |                                        |                                    |                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------|
| KOORDİNATÖR/SORUMLU<br>ARAŞTIRMACI<br>UNVANI/ADI/SOYADI                                         | PROF. DR. SUNA ÖMEROĞLU                                                           |                                        |                                    |                                           |
| KOORDİNATÖR/SORUMLU<br>ARAŞTIRMACININ UZMANLIK<br>ALANI                                         | Histoloji ve Embriyoloji                                                          |                                        |                                    |                                           |
| KOORDİNATÖR/SORUMLU<br>ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU<br>MERKEZ                                       | Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi                                                   |                                        |                                    |                                           |
| VARSA İDARİ SORUMLU<br>UNVANI/ADI/SOYADI                                                        |                                                                                   |                                        |                                    |                                           |
| DESTEKLEYİCİ                                                                                    |                                                                                   |                                        |                                    |                                           |
| PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ<br>UNVANI/ADI/SOYADI<br>(TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan<br>destek alanlar için) |                                                                                   |                                        |                                    |                                           |
| DESTEKLEYİCİNİN YASAL<br>TEMSİLCİSİ                                                             | Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi                                                   |                                        |                                    |                                           |
| ARAŞTIRMANIN FAZİ VE<br>TÜRÜ                                                                    | FAZ 1                                                                             | <input type="checkbox"/>               |                                    |                                           |
|                                                                                                 | FAZ 2                                                                             | <input type="checkbox"/>               |                                    |                                           |
|                                                                                                 | FAZ 3                                                                             | <input type="checkbox"/>               |                                    |                                           |
|                                                                                                 | FAZ 4                                                                             | <input type="checkbox"/>               |                                    |                                           |
|                                                                                                 | Gözlemsel ilaç çalışması                                                          | <input type="checkbox"/>               |                                    |                                           |
|                                                                                                 | Tıbbi cihaz klinik araştırması                                                    | <input type="checkbox"/>               |                                    |                                           |
|                                                                                                 | İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan<br>performans değerlendirme çalışmaları | <input type="checkbox"/>               |                                    |                                           |
|                                                                                                 | İlaç dışı klinik araştırma                                                        | <input checked="" type="checkbox"/>    |                                    |                                           |
| Diğer ise belirtiniz:                                                                           |                                                                                   |                                        |                                    |                                           |
| ARAŞTIRMAYA KATILAN<br>MERKEZLER                                                                | TEK MERKEZ<br><input checked="" type="checkbox"/>                                 | ÇOK MERKEZ<br><input type="checkbox"/> | ULUSAL<br><input type="checkbox"/> | ULUSLAR ARASI<br><input type="checkbox"/> |

|                          |                                     |        |                   |                                                                                                   |
|--------------------------|-------------------------------------|--------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DEĞERLENDİRİLEN BELGELER | Belge Adı                           | Tarihi | Versiyon Numarası | Dili                                                                                              |
|                          | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ                 |        |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                          | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU |        |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                          | OLGU RAPOR FORMU                    |        |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                          | ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ                   |        |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: **Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU**  
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

## EK-1 (devam) Etik Kurul Onayı

## KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

|                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                    |          |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | TİP-2 VE GESTASYONEL DİYABETLİ GEBE PLASENTALARININ TROFOBlast GELİŞİMİ, ANJİYOGENEZ YÖNÜNDEN KARŞILAŞTIRILMALI OLARAK İNCELENMESİ |          |
| VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                    |          |
| DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER   | Belge Adı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                    | Açıklama |
|                                  | SIGORTA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <input type="checkbox"/>                                                                                                           |          |
|                                  | ARAŞTIRMA BÜTÇESİ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                |          |
|                                  | BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <input type="checkbox"/>                                                                                                           |          |
|                                  | İLAN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <input type="checkbox"/>                                                                                                           |          |
|                                  | YILLIK BİLDİRİM                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <input type="checkbox"/>                                                                                                           |          |
|                                  | SONUÇ RAPORU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <input type="checkbox"/>                                                                                                           |          |
|                                  | GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <input type="checkbox"/>                                                                                                           |          |
|                                  | DİĞER:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <input type="checkbox"/>                                                                                                           |          |
| KARAR BİLGİLERİ                  | Karar No: 11 /2017                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Tarih: 17.1.2017                                                                                                                   |          |
|                                  | Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. |                                                                                                                                    |          |

| KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU |                                                                                                                      |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI      | İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu Son Versiyonu |
| BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI: | Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU                                                                                             |

| Unvanı/Adı/Soyadı                   | Uzmanlık Alanı    | Kurumu                               | Cinsiyet                                                         | Araştırma ile ilişki                                             | Katılım                                                          | İmza |
|-------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------|
| Av. Murat CANGÜL                    | Hukuk             | Serbest Avukat                       | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Doç. Dr. Eyüp HORASANLI             | Anesteziyoloji    | Keçiören EAH                         | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Doç. Dr. Fırat HARDALAÇ             | Biomedikal        | Gazi Üni. Müh. Fak. Elek. Elektronik | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Yük. Müh. Fatih DULKAN              | Metalurji Müh.    | Sanayi Bakanlığı                     | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Yrd. Doç. Dr. Beyza Doğanay Erdoğan | Biyoistatistik    | Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi    | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Uzm. Dr. Ece GÜL İBRİŞİM            | Biyokimya         | Zekai Tahir Burak EAH                | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Prof. Dr. Ömer ERDEVE               | Neonatoloji       | Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi    | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Prof. Dr. H. Zafer GÜNEY            | Farmakoloji       | Gazi Üni. Tıp Fak                    | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Prof. Dr. Tarkan KARAKAN            | Gastroenteroloji  | Gazi Üni. Tıp Fak                    | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Doç. Dr. Elif Gül YAPAR EYİ         | Kadın Doğum Hast. | Zekai Tahir Burak EAH                | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU            | Patoloji          | Zekai Tahir Burak EAH                | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |

\*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU  
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : CEYHAN Müşerref Şeyma  
 Uyuğu : TC  
 Doğum tarihi ve yeri : 01.01.1988, KONYA  
 Medeni hali : Bekar  
 Telefon : 03122026918  
 e-mail : msceyhan@hotmail.com



### Eğitim

| Derece        | Eğitim Birimi                                | Mezuniyet    |
|---------------|----------------------------------------------|--------------|
| Yüksek Lisans | Gazi Ü, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji | Devam ediyor |
| Yüksek Lisans | Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoloji      | 2014         |
| Lisans        | Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoloji      | 2011         |
| Lise          | Lüleburgaz Anadolu Lisesi                    | 2006         |

### İş Deneyimi

| Yıl                | Yer                                | Görev               |
|--------------------|------------------------------------|---------------------|
| 2015- devam ediyor | Gazi Üniversitesi Sağlık Bil. Ens. | Araştırma Görevlisi |

### Yabancı Dil

İngilizce

### Yayınlar

1. Enayat, S, **Ceyhan MS**, Taskoparan B, Stefek M, Banerjee S. CHNQ, a novel 2-Chloro-1,4-naphthoquinone Derivative of Quercetin, induces Oxidative Stress and Autophagy both in vitro and in vivo. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2016, 596:84-98. DOI: 10.1016/j.abb.2016.03.004
2. Bounaama A, Enayat S, **Ceyhan MS**, Moulahoum H, Djerdjouri B and Banerjee S. Ethanolic extract of bark from *Salix aegyptiaca* ameliorates 1,2-dimethylhydrazine induced

colon carcinogenesis in mice by reducing oxidative stress. *Nutrition and Cancer: An International Journal*, 2016, 68, 495-506. DOI: 10.1080/01635581.2016.1152379

3. Soltesova Prnova M, Majekova M, Milackova I, Díez-Dacal B, Pérez-Sala D, **Ceyhan MS**, Banerjee S, Stefek M. [5-(Benzyloxy)-1H-indol-1-yl]acetic acid, an aldose reductase inhibitor and PPAR $\gamma$  ligand. *Acta Biochim Pol.* 2015, 62(3):523-8.

4. Enayat S, **Ceyhan S. M**, Basaran A. A, Gürsel M and Banerjee S. Anticarcinogenic effects of the ethanolic extract of *Salix aegyptiaca* and its active fractions in colon cancer cells: involvement of PI3K/AKT and MAPK pathways. *Nutrition and Cancer: An International Journal*. 2013, 65:1045-58

## Kongreler ve Seminerler

### Sözlü Sunumlar

1. Enayat S, **Ceyhan S.M**, Başaran A, Gürsel M and Banerjee S. Anticarcinogenic effects of the ethanolic extract of *Salix aegyptiaca* and its active fractions in colon cancer cells: involvement of PI3K/AKT and MAPK pathways. 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, ISOPS10, 26 Jun -29 Jun, 2012 Ankara, Turkey.

2. Enayat S, **Ceyhan S.M**, Başaran A, Gürsel M and Banerjee S. Anticarcinogenic effects of the ethanolic extract of *Salix aegyptiaca* and its active fractions in colon cancer cells: involvement of PI3K/AKT and MAPK pathways. EMBO Young Scientist Forum, 14 Jun-16 Jun, 2012 Istanbul, Turkey.

### Poster Sunumları

1. **Müşerref Şeyma Ceyhan**, Suna Ömeroğlu, Deniz Karcaaltıncaba, Tuncay Peker, Saadet Özen Akarca Dizakar, İsmail Türkoğlu, Sreeparna Banerjee. Tip-2 Ve Gestasyonel Diyabetli Gebe Plasentalarının Trofoblast Gelişimi, Anjiyogenezis Yönünden Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. 1. Uluslararası Sağlık Bilimleri ve Yaşam Kongresi (IHSLC 2018) 02-05 Mayıs 2018, Burdur.

2. Sinem Tunçer, İsmail Çimen, Ayşe Keskus, Alper Duranel, Özlen Konu, **M. Şeyma Ceyhan**, Melis Çolakoğlu, Caner Yener, Sreeparna Banerjee. 15-Lipoxygenase-1 expression inhibits angiogenesis in colorectal cancer cell lines. 14th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases, July 12-15, 2015, Budapest, Hungary. Travel award given to Sinem Tunçer.

3. Soltesova Prnova M, Majekova M, Ballekova J, **Ceyhan MŞ**, Enayat S, Banerjee S, Stefek M. Characterization and functional effects of cemtirestat, a potent aldo-keto reductase inhibitor, in diabetes and inflammation. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), 9-12 June, 2015, Ankara.

4. Effects of AKR1B1 silencing in HCT-116 colon cancer cells. Taskoparan B, **Ceyhan M.Ş**, Tunçer S, Stefek M, Banerjee S. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), 9-12 June, 2015, Ankara.

5. Shabnam Enayat, **Müşerref Şeyma Ceyhan**, Sreeparna Banerjee, Milan Stefek. 2-chloro-1,4-naphthoquinone derivative of quercetin exerts antitumor activity against colorectal cancer through the induction of apoptosis and oxidative stress related autophagy. 3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey Sep 10-12, 2014 Izmir, Turkey

6. Enayat S, **Ceyhan S.M**, Başaran A, Gürsel M and Banerjee S. Anticarcinogenic effects of the ethanolic extract of *Salix aegyptiaca* and its active fractions in colon cancer cells: involvement of PI3K/AKT and MAPK pathways. EMBO Young Scientist Forum, 14 Jun-16 Jun, 2012 Istanbul, Turkey.

## **Hobiler**

Tiyatro seyretmek, yürüyüş yapmak, güncel haberleri takip etmek



*GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..*



