

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GESTASYONEL DİYABETLİ GEBE PLASENTALARINDA
AQP8 VE AQP9 DAĞILIMLARININ İNCELENMESİ**

Dr. Ayşegül Süzer

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2013**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GESTASYONEL DİYABETLİ GEBE PLASENTALARINDA
AQP8 VE AQP9 DAĞILIMLARININ İNCELENMESİ**

Dr. Ayşegül Süzer

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Figen Kaymaz**

**ANKARA
2013**

04.06.2013

Sayı:58792979H50

Tıp Fakültesi Dekanlığına,

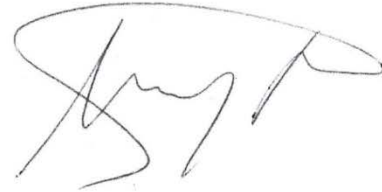
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden Dr. Ayşegül Süzer "Gestasyonel Diyabetli Gebe Plasentalarında AQP8 ve AQP9 Dağılımlarının İncelenmesi" başlıklı tezini başarıyla sunarak uzmanlık sınavına girmeye hak kazanmıştır.

Gereğinin yapılmasını bilgilerinize saygılarımızla arz ederiz.

Prof. Dr. A. Nur Çakar
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı



Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğr. Üyesi



Prof. Dr. Figen Kaymaz
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğr. Üyesi



TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında, Araştırma Görevlisi olarak görev yaptığım dört yıl boyunca, bilimsel ve manevi desteğini benden esirgemeyen, üzerinde çalıştığım konularda kendi öğrenme tarzıyla ilerlememe izin veren ve bu sayede mesleğimi daha da sevmeme ve sahiplenmeme vesile olan hocam, Sayın. Prof. Dr. Figen Kaymaz'a; Asistanlığımın her döneminde tecrübelerini benimle büyük bir içtenlikle paylaşan başta değerli hocam, Prof. Dr. Nur Çakar olmak üzere tüm değerli hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam için gerekli dokuların sağlanmasında en az benim kadar çabalayan Zekai Tahir Eğitim ve Araştırma Hastanesi araştırma görevlilerinden Dr. Miray Sekkin'e, tezimin istatistik kısımlarında yardımlarını esirgemeyen Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim elemanlarından Dr. Anıl Dolgun'a teşekkür ederim.

Eğitimim süresince benden yardımlarını ve güleryüzlerini hiç eksik etmeyen Seyhan Özer, Elif Yüce, Hüsamettin Köse ve Emrah Tosun'a teşekkür ederim. Dört yıl boyunca aynı odayı paylaştığım asistan arkadaşlarıma da destekleri için teşekkür ederim.

Bu zorlu süreçte, sevgilerini benden hiç eksik etmeyen Eşim Alper ve Oğlum Ayaz'a da teşekkür ederim.

ÖZET

Suzer A., Gestasyonel Diyabetli Gebe Plasentalarında AQP8 Ve AQP9 Dağılımlarının İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2013.

Gebelik boyunca fetusun büyümesiyle fetal su ihtiyacı belirgin olarak artar. Fizyolojik veriler suyun plasentadan geçişi için hem transsellüler hem de parasellüler yolun mümkün olduğunu belirtmektedir. Transsellüler yolun küçük integral membran proteinleri olan akuaporinler (AQP) aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu proteinler hem suya hem de gliserol gibi küçük eriyiklere geçirgen olabilirler.

Memeli dokusunda, organlarda geniş bir dağılım aralığı gösteren ve su transportunda aktif olarak rol oynayan 13 tane AQP bulunmuştur. AQP9 aquagliseroporin alt ailesinin bir üyesidir ve AQP3-7-8-10 ile en yüksek aminoasit sekansı homolojisini göstermektedir ve su geçirgenliğinin yanında gliserol, üre, pürin ve pirimidin gibi yüklü olmayan küçük moleküllere de geçirgendir.

İnsülin hormonunun, glukoz transportunu stimüle etmek dışında hücre yüzeyine bağlandığında birçok genin ekspresyonunu değiştirdiği bilinmektedir. Plasenta ve trofoblastik dokularda insülinin hücrelere glukoz alımını ya da glikojen sentezini stimüle etmek gibi bir etkisi yoktur. Buna karşılık insülinin plasentada hPL (human plasental lactogen) ve HCG (human chorionic gonadotropin) hormonlarının sentezini arttırdığı ve 3 β -OH steroid dehidrogenaz enzim regülasyonunda görev aldığı bilinmektedir.

Akuaporin-insülin ilişkisi de araştırılmış, insülinin normal plasental eksplant kültürlerinde AQP9 ekspresyonunu azalttığı, ancak insülin rezistansı oluşturduğu bilinen bir molekül olan TNF-alfa uygulanmasından sonra bu etkinin ortadan kalktığı bildirilmiştir.

Gestasyonel Diyabetes Mellitus, Gebelikte ortaya çıkan ya da gebelikte fark edilen glukoz toleransının bozulması olarak tanımlanmıştır. Gebelikte en sık görülen metabolik bozukluktur. Hastalıkta patoloji; farklı etyolojik sebeplerden dolayı insülin hormonunun eksikliği ya da periferik rezistansından dolayı meydana gelir.

Bu çalışma, AQP8 ve AQP9 'un GDM'li plasentalardaki immunohistokimyasal dağılımını incelemek amacıyla gerçekleştirildi.

Çalışmada; normal, insülinle regüle GDM'li ve diyetle regüle GDM'li hastalardan gruplar oluşturuldu ve villus yapısında bulunan hücreler AQP8 ve AQP9 ekspresyonu yönünden incelendi. Çalışmada toplanan doku örnekleri 38.-40. Gebelik haftasında doğum yapan bireylerden elde edildi.

Insulinle regüle GDM grubunun Hofbauer hücrelerinde ve villus içi bağ dokusu hücrelerinde AQP8 immunoreaktivitesi diğer gruplara göre daha zayıftı. Fetal kapiller endotel hücreleri ise diyetle regüle GDM grubunda daha zayıf bir immünoreaktiviteye sahipti. Kontrol grubunda AQP9 ekspresyonu villus içi bağ dokusu hücrelerinde diğer gruplara göre daha zayıftı. Sinsityotrofoblast hücreleri ise tüm gruplarda AQP8 ve AQP9 ekspresyonu açısından benzer özellikteydiler.

Çalışmamızda diyetle regüle ya da insulinle regüle GDM hastalarının sinsityotrofoblast tabakasında AQP8 ve AQP9 ekspresyonu, kontrol gruplarından farklı bir dağılım göstermemiştir. İnsulinin sinsityotrofoblast hücre tabakasında AQP9 ekspresyonunu azalttığı bilgisi göz önüne alındığında, çalışmamızda kullandığımız gestasyonel diyabeti olan ve kan glukoz seviyeleri diyetle ya da insülinle regüle edilmiş dolayısıyla insülin rezistansının da kırılmış olduğu kabul edilen hastalarda AQP'lerin immunohistokimyasal ifadelerinin kontrol grubuyla benzer özellik göstermesi beklenmelidir ki sonuçlarımız da bu yöndedir.

Anahtar Kelimeler: Gestasyonel Diyabetes Mellitus, akuaporin 8, akuaporin 9, plasenta

Destekleyen Kurum: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (012D11101004).

ABSTRACT

Suzer A., Evaluation of AQP8 and AQP9 immunoreactivity in human placenta with Gestational Diabetes Mellitus. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Department of Histology and Embryology, Ankara, 2013.

During pregnancy, fetal water requirements increase markedly due to the exponential growth of fetus. Physiological data indicate that both a transcellular and a paracellular pathway are available for water transport across the human placenta. Transcellular water flux may be facilitated by aquaporins (AQPs), a family of small integral membrane proteins. Aquaporins transport either water alone or water and small solutes such as gliserol.

In mammals, there are at least 13 AQPs, which show a wide range distribution in organs that are actively involved in water transport. AQP9 is a member of aquaglyseroporin subfamily of AQPs and share the highest amino acid sequence homology with AQP3, AQP7 and AQP10. In addition to water, AQP9 transports small uncharged molecules like glycerol, urea, purines and pyrimidines.

It is generally accepted that in addition to stimulating glucose transport, binding of insulin to cell surface receptors alters the expression of numerous genes in a variety of tissues. In placental trophoblastic cells, insulin has no stimulatory effect on glucose uptake or glycogen synthesis, but it is involved in the synthesis of human placental lactogen (hPL) and hCG and the regulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase.

In literature, the relationship of AQP9 and insulin has been investigated. It has been reported that insulin decreased the molecular expression of AQP9 exclusively in explant from normal placentas in a concentration-dependent manner. TNF-alfa is an antiinflammatory cytokine. It is one of the reason of insulin resistance in the pregnancy. Treatment with TNF-alfa previous to insulin addition in normal placental explants, prevent the changes in AQP9 expression.

Gestational diabetes mellitus (GDM) is a pregnancy related metabolic disorder and it is characterized by impaired glucose tolerance. GDM is the most common metabolic disorder in the pregnancy. Pathology in the GDM can occurs

because of different etiological reasons which cause the deficiency or peripheric resistance of insulin.

The objective of this study is to evaluate the expression of AQP8 and AQP9 in placentas with GDM. Samples from normal and gestational diabetic placentas which is regulated with diet or insulin were studied by immunohistochemical staining. Specific anti- AQP8 and anti-AQP9 antibody was used for cellular localization of the molecules.

In comparison to the other groups, AQP8 expression of mesenchymal cells in villi and Hofbauer cells were significantly decreased in the insulin regulated GDM group. In diet regulated GDM group, fetal capillary endothelial cells; there was a significant decrease in the AQP8 expression compared with the other groups. AQP9 expression of mesenchymal cells in villi in control group was lower in comparison to the other groups.

In syncytiotrophoblast cell layer, AQP8 and AQP9 immunoreactivitiy shows similar expression patterns when we compared the groups with each other. Our results support the data that ‘insulin decreased the molecular expression of AQP9 in placental explants’ .

Keywords: Gestational diabetes mellitus, aquaporin 8, aquaporin 9, placenta.

Supported By Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit 012D11101004).

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiii
GRAFİKLER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Plasenta	3
2.1.1. Plasentanın Genel Yapısı	3
2.1.2 Plasentanın Gelişimi	4
2.1.3 Villusların Gelişimleri ve Villus Tipleri	5
2.1.4. Bir Plasenta Villusunun Yapısı	7
2.2. Diyabetes Mellitus	9
2.2.1. Tip 1 Diyabet.....	10
2.2.2. Tip 2 Diyabet.....	10
2.2.3. Gestasyonel Diyabet.....	11
2.3. Akuaporinler	13
2.3.1. Akuaporin 8.....	16
2.3.2. Akuaporin 9.....	17
2.3.3. Akuaporinlerin Plasenta ve Fetal Membranlardaki Rolü.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1 Gereç	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Örneklerin Hazırlanması	20
3.2.2. Hematoksilen-Eozin Boyama.....	21
3.2.3. İmmünohistokimya Yöntemi	22

3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi	27
4. BULGULAR	28
4.1. Histolojik Bulgular.....	28
4.1.1. Işık Mikroskobu Bulguları	28
4.1.1.b. İnsulinle Regüle GDM Grubu (Grup 2).....	29
4.1.2. AQP8 İmmunohistokimyasal Bulguları.....	31
4.1.2.a. AQP8 Kontrol Grubu (Grup 1)	31
4.1.3. AQP9 İmmunohistokimyasal bulgular.....	35
4.2. İstatistik Bulguları.....	40
4.2.1. AQP8 İstatistik Bulguları.....	40
4.2.2. AQP9 İstatistik Bulguları.....	47
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇLAR	60
7. ÖNERİLER	61
8. KAYNAKLAR	62

SİMGELER ve KISALTMALAR

KV	Kök Villus
MİV	Matür İntermediyer Villus
TV	Terminal Villus
İİV	İmmatür İntermediyer Villus
MV	Mezenşimal Villus
GER	Granüllü Endoplazma Retikulumu
HCG	İnsan Koryonik Gonadotropini (Human Chorionic Gonadotropin)
hPGH	İnsan Plasental Büyüme Hormonu (Human Placental Growth Hormone)
CRH	Kortikotropin Salgılatıcı Hormon (Corticotropin Releasing Hormon)
PTHrp	Parathormon Salgılatıcı Peptid (Parathormon Releasing Peptid)
DM	Diyabetes Mellitus
GDM	Gestasyonel Diyabetes Mellitus (Gestational Diabetes Mellitus)
HPL	İnsan Plasental Laktojeni (Human Placental Lactogen)
PRL	Prolaktin (Prolactin)
GH	Büyüme Hormonu (Growth Hormone)
IRS	İnsülin Reseptör Substratı (İnsulin Receptor Substrat)
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (İnsulin Like Growth Factor)
AQP	Akuaporin
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
RNA	Ribonükleik Asit
T3	Triiodothyronine

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.3.1. Akuaporinlerin sınıflaması.....	14
Şekil 2.3.2. Akuaporinlerin farklı sistemlerdeki görevleri.....	16
Şekil 4.1.1.a.1 Kontrol grubu.....	28
Şekil 4.1.1.b.1 İnsülinle regüle GDM grubu.....	29
Şekil 4.1.1.c.1 Diyetle regüle GDM grubu.....	30
Şekil 4.1.2.a.1. AQP8 Kontrol Grubu.....	31
Şekil 4.1.2.a.2. AQP8 Kontrol Grubu.....	32
Şekil 4.1.2.b.1. AQP8 İnsülin Grubu.....	33
Şekil 4.1.2.b.2. AQP8 İnsülin Grubu.....	34
Şekil 4.1.2.c.1. AQP8 Diyet Grubu.....	35
Şekil 4.1.3.a.1. AQP9 Kontrol Grubu.....	36
Şekil 4.1.3.b.1. AQP9 İnsülin Grubu.....	37
Şekil 4.1.3.b.2. İnsülin ile regüle GDM grubu.....	38
Şekil 4.1.3.c.1. AQP9 Diyet Grubu.....	39

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.2.1. Diyabetin sınıflandırılması	9
Tablo 2.2.2. Tip 2 DM'deki insülin eksikliği nedenleri	11
Tablo 2.2.3.1. Gebelik sırasında diyabetin sınıflandırılması ve tedavi protokolleri.....	13
Tablo 2.3.3.1. Akuaporinlerin, insan plasentası ve fetal zarlarındaki lokalizasyonu. ...	18
Tablo 3.1.1. .. Gruplar.....	20
Tablo 3.2.3.1. Kullanılan primer antikörlerin özellikleri ve sulandırma oranları.....	24
Tablo 3.2.3.2. Sekonder kitin içerdiği solüsyonlar ve miktarları.	24
Tablo 3.2.3.3. İmmünoreaktivite şiddetleri ve temsili skorları.	26
Tablo 3.2.3.4. İmmünoreaktivite gösteren hücre sayıları ve temsili skorları.....	26
Tablo 4.2.1.1. AQP8 eksprese eden sinsityotrofoblast hücrelerinin immünoreaktivite şiddetleri	40
Tablo 4.2.1.2. AQP8 immünoreaktivitesi gösteren sinsityotrofoblast hücrelerinin sayıları.	41
Tablo 4.2.1.3. AQP8 eksprese eden Hofbauer Hücrelerinin immünoreaktivite şiddetleri	42
Tablo 4.2.1.4. AQP8 immünoreaktivitesi gösteren Hofbauer Hücrelerinin sayıları.	43
Tablo 4.2.1.5. AQP8 eksprese eden Villus İçi Bağ Dokusu Hücrelerinin immünoreaktivite şiddetleri.....	44
Tablo 4.2.1.6. AQP8 immünoreaktivitesi gösteren villus içi bağ dokusu hücrelerinin sayıları.	45
Tablo 4.2.1.7. AQP8 eksprese eden Fetal Kapiller Endotel Hücrelerinin immünoreaktivite şiddetleri.....	46
Tablo 4.2.1.8. AQP8 immünoreaktivitesi gösteren fetal kapiller endotel hücrelerinin sayıları.	47
Tablo 4.2.2.1. AQP9 eksprese eden sinsityotrofoblast hücrelerinin immünoreaktivite şiddetleri	48
Tablo 4.2.2.2. AQP9 immünoreaktivitesi gösteren sinsityotrofoblast hücrelerinin sayıları.	49

Tablo 4.2.2.3. AQP9 eksprese eden Hofbauer Hücrelerinin immunoreaktivite şiddetleri.	50
Tablo 4.2.2.4. AQP9 immünoreaktivitesi gösteren Hofbauer hücrelerinin sayıları.	51
Tablo 4.2.2.5. AQP9 eksprese eden villus içi bağ dokusu hücrelerinin immunoreaktivite şiddetleri.....	52
Tablo 4.2.2.6. AQP9 immunoreaktivitesi gösteren villus içi bağ dokusu hücrelerinin sayıları.	53
Tablo 4.2.2.7. AQP9 eksprese eden fetal kapiller endotel hücrelerinin immunoreaktivite şiddetleri.....	54
Tablo 4.2.2.8. AQP9 immunoreaktivitesi gösteren fetal kapiller endotel hücrelerinin sayıları	55

GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
Grafik 4.2.1.1. Gruplara ait sinsityotrofoblastların AQP8immünoreaktivite şiddetleri.....	40
Grafik 4.2.1.2. AQP8 eksprese eden sinsityotrofoblast hücrelerinin sayısal değerleri.41	
Grafik 4.2.1.3. AQP8 eksprese eden hofbauer hücrelerinin immunoreaktivite şiddetleri.....	42
Grafik 4.2.1.4. AQP8 eksprese eden Hofbauer hücrelerinin sayısal değerleri.....	43
Grafik 4.2.1.5. Gruplara ait villus içi bağ dokusu hücrelerinin AQP8 immunoreaktivite şiddetleri.....	44
Grafik 4.2.1.6. AQP8 eksprese eden villus içi bağ dokusu hücrelerinin sayısal değerleri.....	45
Grafik 4.2.1.7. Gruplara ait fetal kapiller endotel hücrelerinin AQP8 immunoreaktivite şiddetleri.....	46
Grafik 4.2.1.8. AQP8 eksprese eden fetal kapiller endotel hücrelerinin sayısal değerleri.....	47
Grafik 4.2.2.1. Gruplara ait sinsityotrofoblast hücrelerinin immunoreaktivite şiddetleri.....	48
Grafik 4.2.2.2. AQP9 eksprese eden sinsityotrofoblast hücrelerinin sayısal değerleri.....	49
Grafik 4.2.2.3. Gruplara ait Hofbauer hücrelerinin AQP9 immunoreaktivite şiddetleri.....	50
Grafik 4.2.2.4. AQP9 eksprese eden Hofbauer hücrelerinin sayısal değerleri.....	51
Grafik 4.2.2.5. Gruplara ait villus içi bağ dokusu hücrelerinin immunoreaktivite şiddetleri.....	52
Grafik 4.2.2.6. AQP9 eksprese eden villus içi bağ dokusu hücrelerinin sayısal değerleri.....	53
Grafik 4.2.2.7. Gruplara ait fetal kapiller endotel hücrelerinin AQP9 immunoreaktivite şiddetleri.....	54
Grafik 4.2.2.8. AQP9 eksprese eden fetal kapiller endotel hücrelerinin sayısal değerleri.....	55

1. GİRİŞ

Plasenta gebelik boyunca anne ile fetus arasındaki fizyolojik değişimlerin gerçekleştiği geçici bir organdır. Gebelik boyunca fetusun büyümesiyle fetal su ihtiyacı belirgin olarak artar. Fizyolojik veriler suyun plasentadan geçişi için hem transsellüler hem de parasellüler yolun mümkün olduğunu belirtmektedir[1]. Transsellüler yolun küçük integral membran proteinleri olan akuaporinler (AQP) aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu proteinler hem suya hem de gliserol gibi küçük eriyiklere geçirgen olabilirler[2, 3].

Memeli dokusunda, organlarda geniş bir dağılım aralığı gösteren ve su transportunda aktif olarak rol oynayan 13 tane AQP bulunmuştur. AQP9 aquagliseroprin alt ailesinin bir üyesidir ve AQP3-7-8-10 ile en yüksek aminoasit sekansı homolojisini göstermektedir[4, 5]. Su geçirgenliğinin yanında gliserol, üre, pürin ve pirimidin gibi yüklü olmayan küçük moleküllere de geçirgendir[6].

Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM), gebelikte ortaya çıkan ya da gebelikte fark edilen glukoz toleransının bozulması olarak tanımlanmıştır[7]. Gebelikte en sık görülen metabolik bozukluktur[8]. Hastalıkta patoloji; farklı etyolojik sebeplerden dolayı insülin hormonunun eksikliği ya da periferik rezistansından dolayı meydana gelir. GDM, normal glikoz dengesinin sağlanmasında, doku gereksinimlerini karşılayacak insülin arzının uyumsuz olmasından kaynaklanır. GDM'li gebelerde hem besinlere insülin yanıtının, hem de dokuların insüline yanıt azalmıştır[9]. Gestasyonel dönemde, karakteristik olarak insülin duyarlılığı azalmış, beta hücre yanıtı artmıştır[7]. İnsülin direnci, gebeliğin ilk üç ayında normal olarak bulunur ve gebeliğin ilerlemesi ile 2. ve 3. trimesterde iskelet ve kas dokusunda insülin etkisinin azalmasıyla bozukluk belirginleşir[10, 11].

İnsülin hormonunun, glukoz transportunu stimüle etmek dışında[12] hücre yüzeyine bağlandığında birçok genin ekspresyonunu değiştirdiği bilinmektedir[13]. Plasenta ve trofoblastik dokularda insülinin hücrelere glukoz alımını ya da glikojen sentezini stimüle etmek gibi bir etkisi yoktur[14, 15]. Buna karşılık insülinin plasentada hPL (human plasental lactogen) [16] ve HCG (human chorionic gonadotropin) [17] hormonlarının sentezini arttırdığı ve 3 β -OH steroid dehidrogenaz enzim regülasyonunda görev aldığı bilinmektedir [18].

AQP8 ve AQP9 ekspresyonu insan plasentasına ait villus yapısında, sinsityotrofoblast hücrelerinde ve sitotrofoblast hücrelerinde gösterilmiştir[19, 20]. Akuaporinlerin plasentadaki regülasyon mekanizmalarıyla ilgili çok az veri bilinmesine rağmen HCG hormonunun AQP9 ekspresyonunu arttırdığı ve bu etkiyi cAMP üzerinden sağladığı gösterilmiştir[21].

Akuaporin-insülin ilişkisi de araştırılmış, insülinin normal plasental eksplant kültürlerinde AQP9 ekspresyonunu azalttığı, ancak insulin rezistansı oluşturduğu bilinen bir molekül olan TNF-alfa uygulanmasından sonra bu etkinin ortadan kalktığı bildirilmiştir[22].

Bu çalışma AQP8 ve AQP9 ekspresyonunu insulin rezistansının doğal olarak olduğu GDM'li plasentalarda göstermek ve sağlıklı plasentalarla olası farklılıklarını karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Plasenta

2.1.1. Plasentanın Genel Yapısı

Plasenta gebelik boyunca, anne ile fetus arasında fizyolojik değişimlerin gerçekleştiği organdır. Fetus ile anne arasında bağlantıyı sağlayan en önemli yapıdır.[23] .

Sadece insan ve memeli hayvanlarda bulunur. Plasenta, maternal kandan besin maddelerinin alınmasını, fetal metabolizma artıklarının geri verilmesini, O₂ ve CO₂'in değiştirilmesini gerçekleştiren ve aynı zamanda gebelik için gerekli hormonları sentezleyip, salgılayan geçici endokrin bir organdır[24, 25].

Ortalama olarak 185 mm uzunluğunda, 497 ml hacminde, 23 mm kalınlığında ve 500 gram ağırlığındadır. Plasentanın ağırlık ve kalınlık gibi özellikleri gebelik haftasına göre değişiklikler gösterir. Son haline 36. haftada ulaşır. 10–38 kadar kotiledondan oluşmuştur[26]. Kotiledonların sayısı gebelik boyunca sabit kalır. Her kotiledon arteria umbilicalis ve vena umbilicalisin bir dalı tarafından beslenir.

Plasenta fetal ve maternal olmak üzere iki yüzeyden oluşur. Fetal yüzeye koryon frondozum, maternal yüzeyine desidua bazalis denir. Plasentanın fetal yüzü maternal yüze göre düzgün yüzeyli ve soluk renktedir, bu görünümün nedeni amniyon ve koryon zarına bağlıdır[27, 28].

İnsan plasentası hemokoryal tip plasentadır. Hemokoryal tip plasenta çeşidinde koryon villusları endometriyumla sıkı ilişki içinde olduğundan dolayı doğumda kanama olur[27]. Hemokoryal tip plasentada değişim kabaca dairesel bir alanda sınırlanmıştır. Villuslar anne kanı ile temas halindedir. Maternal ve fetal etkileşimin en yoğun olduğu plasenta tipidir[29].

Gebeliğin ilerlemesiyle plasentada değişiklikler meydana gelir. 30. Haftadan itibaren sinsityal düğümlerin gelişmesiyle sinsityotrofoblastlar incilir. Villusların sayısı giderek artar, toplam yüzeyleri 6-7 m²' ye ulaşır ve villus çapı azalır. Villusların merkezi kısmından trofoblast tabakasına doğru kapillerlerin göçü olur.

Termde fetal kapillerlerin lümeni endotel çoğalması ile kapanmış durumdadır. Villus merkezindeki bağ dokusu artar. Fetal kapiller bazal membranı kalınlaşır[30] .

2.1.2 Plasentanın Gelişimi

Erkek ve dişi gamet hücrelerinin birbiriyle birleşip kaynaşması anlamına gelen fertilizasyon tuba uterinaların en geniş kısmı olan ampulla bölgesinde gerçekleşir. Spermiumların başlangıçta ovumu fertilize etme yeteneği yoktur. Kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu denilen reaksiyonlar sonucu fertilizasyon yeteneğini kazanır. Fertilizasyon, sperm hücresinin önce oositin korona radiata'sını ve daha sonra zona pellusida'sını geçmesi sonucunda hücre zarlarının kaynaşmasıyla gerçekleşir.

Fertilizasyon sonucu oluşan yapının adı zigottur. Fertilizasyondan yaklaşık 24–36 saat sonra zigot ilk mitoz bölünmesini gerçekleştirerek iki hücreli blastomer halini alır. Sekiz hücre evresine kadar gevşek bir hücre kümesi halinde olan blastomerler, üçüncü yarıklanmanın ardından birbirleriyle daha sıkı temasa geçerek kompakt bir hücre topu haline gelirler[31]. Fertilizasyondan yaklaşık 3 gün sonra kompakt haldeki embriyo tekrar bölünerek 16 hücreli dut benzeri morulayı oluştururla

Morula uterusu ulaştığında, uterus boşluğundaki sıvı zona pellusidayı geçerek iç hücre kitlesinin hücrelerarası boşluğuna sızarak toplanmaya başlar. Hücrelerarası boşluk giderek genişler ve birbiriyle birleşerek blastosel denilen yapıyı oluştururlar. Morulanın iç hücreleri iç hücre kitlesini (embriyoblast), dış hücreler de dış hücre kitlesini (trofoblast) oluştururlar. Embriyoblastlar embriyoyu ve göbek kordonunu, trofoblastlarda ekstra embriyonik membranları ve plasentayı oluştururlar[29].

Gelişimin 4. gününde 16–64 hücreden oluşan embriyo, serbest bir şekilde uterus boşluğunda bulunur. Gelişimin 5.günü ve 6.günü başında 128–256 hücreden oluşan blastosistin zona pellusidası dejenere olur ve endometriyuma tutunur (appozisyon) ve çapı 0,2–0,3mm kadardır.

Gelişimin 6.günü sonu ile 8.günün başında blastosistin implantasyonu gerçekleşir; blastosistin embriyonik kutbu çoğunlukla, uterus posterior duvarının üst kısmına, midsagittal düzlemin yakınlarına implante olur. Blastosist bu evrede 0.3x0.3x0.15mm çapında ve yassı olarak gözlenir.

İmplantasyon blastosistin uterus yüzey epiteline tutunması, bazal laminayı geçmesi ve uterus stromasına tutunması ile gerçekleşir[32]. Tutunmada uterus epitel hücrelerinin apikal yüzeyindeki pinopot denilen sitoplazmik çıkıntılar işlev görür.

İmplantasyon, blastosistin dış tabakası trofoektodermin uterusun luminal epiteli ile etkileşime girdiği genel bir birlikteliği gerektirir[33].

İmplantasyon, endometriyumun sekresyon fazında iken meydana gelir. Blastosistin uterus endometriyumuna implantasyonu iki aşamada olur. Önce blastosist endometriyal yüzeyle bir araya gelir. Daha sonra endometriyal stromanın desidualizasyonu sonucu blastosist uterus endometriyumuna implante olur. İmplantasyon bölgesindeki endometriyal damar geçirgenliğindeki artış ve implantasyon için endometriumdaki şartların sağlanması korpus luteum tarafından salgılanan progesteron ve östrojen arasındaki etkileşimin uyumuna bağlıdır[29]. Zona pellusida'nın blastosistten ayrılmasıyla iç hücre kitlesinin dışındaki trofoblast hücreleri yüzey çıkıntıları oluşturur böylece blastosist uterus epiteline tutunmaya hazır hale gelir. Luminal epitel hücrelerindeki düzenli mikrovilluslar ovulasyondan yaklaşık 6 gün sonra yerlerini pinopodlara bırakır. Bu pinopodlar insan embriyoları için önemli bir tutunma bölgeleridir[34]

Gelişimin 8.günü sonu ile 12.günü arasında koryon kesesinin çapı, 0.9x0.9x0.6 mm'ye çıkar. Endometriyumun stromasına kısmen gömülmüş olan blastosistin embriyonik kutbundaki trofoblastlar, gelişimin 8. gününde artık iki tabakaya farklılaşmıştır. Mitoz bölünmenin görüldüğü ve tek çekirdekli hücrelerden meydana gelen iç tabaka olan sitotrofoblastlar ile hücre sınırlarının belirgin olmadığı çok çekirdekli hücrelerden oluşan dıştabaka olan sinsityotrofoblastlardır

Sitotrofoblastlar mitoz bölünme yeteneğine sahipken sinsityotrofoblast tabakasında mitoz bölünme görülmez. Çok çekirdekli hücrelerden oluşan sinsityal dış tabaka, tek çekirdekli hücrelerden oluşan sitotrofoblast hücrelerinin çoğalması ve birbirleriyle kaynaşmasından meydana gelir[35]

2.1.3 Villusların Gelişimleri ve Villus Tipleri

İlk görülen villus tipi primer koryonik villuslardır ve ikinci haftanın sonunda oluşmaya başlarlar. Sitotrofoblast hücreleri, üst tabakadaki sinsityotrofoblast hücrelerinin içine doğru büyüyen hücresel uzantılar meydana getirir. Bir primer koryonik villusu transvers kesiti sitotrofoblast hücrelerinden oluşmuş yuvarlak bir merkezin etrafını saran sinsityotrofoblastik hücre tabakasından oluşur.

Primer koryon villusları oluştuktan kısa bir süre sonra dallanmaya başlarlar. Üçüncü haftanın başında mezenşim, primer villusların içine doğru büyür ve ortada gevşek bir mezenşimal bağ dokusu oluşturur. Bu evredeki villuslar sekonder koryonik villus olarak adlandırılır.

Villuslardaki bazı mezenşimal hücreler daha sonra kapillerlere ve kan hücrelerine farklıdır. Villuslar içlerinde kan hücreleri görülmeye başladığında tersiyer koryon villus adını alırlar. Koryon villuslarındaki kapillerler arteriyol kapiller ağı oluşturacak şekilde birleşir, daha sonra koryon ve bağlantı sapının içinde farklı damarlar aracılığıyla embriyonik kalp ile bağlantı kurarlar. Üçüncü haftanın sonunda embriyo kanı koryon villuslarındaki kapillerler içinde yavaşça akmaya başlar[36].

Bir villus ağacında bulunan yapılar büyüklükleri, stroma karakterleri ve fetal damarların özelliklerine göre 5 çeşide ayrılabilir.

1) **Stem (Kök) Villus (KV):** Plasental villusların koryonik plaktan ilk çıktığı bölümdür.. KV'lar, sıkı yapılı fibroz stroma içerir ve villus ağacındaki yapıların mekanik desteğini sağlar. KV'un ortasına yerleşmiş arter, ven ve geniş arteriyol ve venüller vardır. Çapları en geniş villuslardır ve fetal damarlar ile intervillöz mesafedeki maternal dolaşım arasında geniş mesafe mevcuttur. Bu sebeple gaz ve besin alışverişinde aktif rol almazlar.

2) **Matür İntermediyer Villus (MİV) :** Uzun, ince ve çapları 60–160 µm arasında olan periferik dallardır. Stromaları, düzensiz, gevşek bağ dokusu lif demetleri ve bağ dokusu hücrelerinden oluşur. Matür intermediyer villuslarda fetal dolaşıma ait arteriyol, venül ve kapillerler bulunur.

3) **Terminal Villus (TV):** Olgun ara villusların yüzeyinden dışarı doğru çıkan tomurcuklanmalardır. Terminal villuslar ağacın en çok uç noktalarında bulunmaktadır. Villus yapısının %30-40'ını oluştururlar. İntervilloz mesafedeki maternal dolaşım ile fetal dolaşım arasında en yakın mesafenin sağlandığı bölgelerdir. Fetal dolaşım sinuzoidler haline dönüşmüştür, fetal kan göllenmiş ve akım hızı iyice azalmıştır. Besin ve gaz alışverişi başlıca, her iki dolaşımın da ileri

derecede yavaşladığı ve birbirlerine en yakın mesafeye geldiği, terminal villuslarda gerçekleşmektedir.

4) **İmmatür İntermediyet Villus (İİV):** Kök villusların uç noktasında bulunan immatür, şişkin villuslardır. Karakteristik özelliği retiküler tipteki stromasıdır. Çoğunlukla olgunlaşmamış plasentalarda bulunur. Olgun plasentalarda ise villus gelişiminin devam ettiği plasentonun merkezinde bulunabilirler. Gevşek bağ doku, haufbauer hücreleri, fetal arteryol ve venüller bulunur.

5) **Mezanşimal Villus (MV):** Villus ağacının en ilkel tipleridir. Erken gebelik haftalarında plasentalarda bulunur. Olgunlaşmamış ara villusların öncüleridir. Villus ağacında ara villusların üzerinde tomurcuklanma şeklinde gözlenirler [37]

Plasenta ile desidua bazalis arasında sitotrofoblastik kabuk mevcuttur. Plasental villus ağacının en uç dalları bu kabuğa tutunur ve tutundurucu villus olarak adlandırılır. Anne kanı içinde serbest olarak hareket eden villuslara ise yüzen villus adı verilir[36]

2.1.4. Bir Plasenta Villusunun Yapısı

Plasentadaki bütün villusların temel yapısı aynı olup altı bileşenden oluşur:

- A)– Sinsityotrofoblast
- B)– Sitotrofoblast (Langhans) hücreleri
- C)– Trofoblast bazal membranı
- D)– Mezanşimal villus stroması
- E)– Fötal damarlar
- F)– Fibrinoid materyal

A–Sinsityotrofoblast

Sinsityotrofoblast hücre tabakası plasentada boyunca devamlılık gösteren devamlı bir yapıdır. Sinsityotrofoblastın apikalinde fırçamsı kenarlı membranı ve bazal plazma membranı bulunur ve bu iki membranın arasında önemli farklar mevcuttur. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar, term bir plasentada, sinsityotrofoblast hücre tabakasının apikal yüzünün yaklaşık 1milyar/cm² yoğunluğunda mikrovilluslarla kaplı olduğunu göstermiştir[38].

Sinsityotrofoblastın şeklini korumasında sinsityum hücre iskeleti önemli rol oynar. Aktin, tubulin, sitokeratin ve desmoplakin, sinsityum hücre iskeletinin önemli bileşenlerindedir. Sinsityotrofoblast içinde hücre membranı kalıntılarına rastlanabilir, bunlara intrasinsityal membranlar adı verilir. Sinsityotrofoblast ayrıca, Granüllü Endoplazma Retikulumundan (GER) Zengin Sinsityotrofoblast ve Granülsüz Endoplazma Retikulumundan Zengin Sinsityotrofoblast olmak üzere de ikiye ayrılır. GER'den zengin sinsityotrofoblastda, insan koryonik gonadotropini (hCG), insan büyüme hormonları (hGHs), leptin, eritropoietin, kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH), paratiroid hormon ilişkili protein (PTHrP) gibi peptid ve protein yapıda hormonlar sentezlenirken, düz yüzlü endoplazma retikulumundan zengin sinsityotrofoblastda ise steroid yapıda maddeler sentezlenir[39].

Plasenta villuslarında, fetal kapillerlerin villus yüzeyine doğru çıkıntı yaptıkları bölgelerde, sinsityum, çekirdekten yoksun ince lamellere, vaskülosinsityal membrana dönüşür. İki komşu villusu birbirine bağlayan yapılara ise sinsityal köprüler adı verilir[40]

B- Sitotrofoblastlar (Langhans Hücreleri)

Sitotrofoblast hücre tabakası erken gebelikte bir bütünlük gösteren neredeyse kesintisiz bir tabakadır; gebelik ilerledikçe kesintili hale gelir[35].

Sitotrofoblastların önemli bir kısmı farklanmamış proliferasyon gösteren kök hücrelerdir; bu tür sitotrofoblastların büyük ökromatik çekirdekleri ve az sayıda organelleri bulunur. Sitoplazmalarında iyi gelişmiş Golgi kompleksi, birkaç mitokondriyon, genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum ve çok sayıda ribozom bulunur. Sitotrofoblastların küçük bir kısmı ise ileri derecede farklanmış aşamadır. Bu hücrelerde bol miktarda ribozom, GER ve mitokondriyon bulunur. Bu hücreler giderek sinsityotrofoblasta benzerler. Farklanmamış sitotrofoblastlar, proliferasyon olup farklanarak sinsityal füzyon döngüsü adı verilen bir süreçle sinsityotrofoblasta katılırlar[41].

C-Trofoblast Bazal Membranı

Trofoblast bazal membranı, trofoblastların epitelyum tabakasını villus stromasından ayırır. Trofoblast bazal membranı yer, yer sitotrofoblastlarla, yer, yer

sinsityotrofoblastlarla temas halindedir. Kalınlığı 20–50 nanometre kadardır. Yapısında kollagen tip IV, laminin, heparan sülfat ve fibronektin saptanmıştır. Fibronektin çeşitli kollajen lifler ve proteoglikanlar için bağlanma bölgelerine sahiptir. Fibronektinin bazal laminayı bağ doku liflerine bağladığı düşünülmektedir. Trofoblast bazal membranı, maternal ve fetal dolaşım arasındaki filtrasyon bariyerinin yapısına da katılmaktadır.

2.2. Diyabetes Mellitus

Diyabetes mellitus; insülin sekresyonundaki eksiklik ya da insülin hedef hücrelere olan etkisindeki yetersizlik sonucu meydana gelen hiperglisemiyle karakterize metabolik bir hastalıktır.

İlk olarak sadece kan şekeri yüksekliğiyle kendini gösteren bu tablo, hiperglisemi kronikleşince göz, böbrek, periferik sinirler, kalp ve kan damarları gibi birçok organda fonksiyon bozukluğuna sebep olur[7].

Diyabet insülin eksikliği ya da duyarsızlığına göre sınıflandırılmaktadır [42].

Tablo 2.2.1. Diyabetin sınıflandırılması (Amerikan Diyabet Birliği)

Tip 1 Diyabet
Tip 2 Diyabet
Diğer spesifik diyabet tipleri
Gestasyonel diyabet

Tip-1 Diyabet

İdyopatik ya da otoimmün nedenlere bağlı beta hücre adacık harabiyeti.

Tip-2 Diyabet

Periferik insülin direnci ve uygun olmayan insülin salınımı.

Diyabetin diğer spesifik tipleri

Genetik defektler, endokrinopatiler, ekzokrin pankreas hastalıkları, enfeksiyonlar, ilaçla indüklenmiş diyabet, diyabetin eşlik ettiği genetik sendromlar.

Gestasyonel Diyabet [7]

2.2.1. Tip 1 Diyabet

İnsülin salınımındaki tam veya kısmi eksiklik sonucu meydana gelen kronik metabolik bir hastalıktır. İnsülin pankreasın langerhans adacıklarında bulunan β hücreleri tarafından sentezlenir. Bu hücrelerde otoimmün sebeplerden dolayı oluşan hasar ya da hücrelerin kaybı sonucu tip 1 diyabetin meydana gelir.

İnsidans tüm diyabetli hastalar arasında %10 civarındadır. Hastalığın etiolojisinde, çevresel ve genetik faktörler önemli rol oynamaktadır[43]. Hastaların %90'ında otoimmün (Tip 1A), %10 kadarında ise nonotoimmün (Tip 1B) β -hücre yıkımı söz konusudur[44].

2.2.1.1. Tip 1A Diyabet

Genetik yatkınlığı olan kişilerde, çevresel tetikleyici faktörlerin (virüs, toksin, vb) etkisiyle otoimmünitenin tetiklenmesi sonucu β -hücre hasarı başlar. β -hücre rezervi %80–90 oranında azaldığı zaman klinik diyabet semptomları ortaya çıkar. Tip 1A diyabette başlangıçta kanda adacık otoantikörleri pozitif bulunur.

2.2.1.2. Tip 1B Diyabet

Otoimmünite dışındaki bazı nedenlere bağlı mutlak insülin eksikliği sonucu gelişir. Kanda adacık otoantikörleri bulunmaz[45].

2.2.2. Tip 2 Diyabet

İnsidans, tüm diyabetli hastalar arasında %90-95'tir[46]. Hedef hücredeki reseptör ya da post reseptör hasarına ortaya çıkar. İnsülin periferik etkisi olan glukozu hücre içine sokma görevini gerçekleştiremez ve kan şekeri yüksek kalır.

İnsülin direncini oluşturabilen veya arttırabilen birçok faktör vardır. Bunlardan bazıları arasında obezite, hipertansiyon, yüksek kolesterol, metabolik sendrom, stres ve akromegali sayılabilir.

Tablo2.2.2. Tip 2 DM'deki insülin eksikliği nedenleri

• Beta hücrelerinin kitlesinde azalma
• Düşük doğum ağırlığı
• Glukoz toksisitesi
• Lipid toksisitesi
• İnsülin Salgılanma Bozukluğunda Genetik Nedenler

2.2.3. Gestasyonel Diyabet

Gebelikte ortaya çıkan ya da gebelikte fark edilen glukoz toleransının bozulması olarak tanımlanmıştır[47]. Gebelikte en sık görülen metabolik bozukluktur [8]. Hastalıkta patoloji; farklı etyolojik sebeplerden dolayı insülin hormonunun eksikliği ya da periferik rezistansından dolayı meydana gelir. GDM, normal glikoz dengesinin sağlanmasında, doku gereksinimlerini karşılayacak insülin arzının uyumsuz olmasından kaynaklanır. GDM'li gebelerde hem besinlere insülin yanıtının, hem de dokuların insüline yanıt azalmıştır[9]. Gestasyonel dönemde, karakteristik olarak insülin duyarlılığı azalmış, beta hücre yanıtı artmıştır[46]. İnsülin direnci, gebeliğin ilk üç ayında normal olarak bulunur ve gebeliğin ilerlemesi ile 2. ve 3. trimesterde iskelet ve kas dokusunda insülin etkisinin azalmasıyla bozukluk belirginleşir[10, 48].

Gebelikte ortaya çıkan insülin direnci, annenin artmış yağ dokusu ve plasentada yapılan hormonlar ve insülini desensitize edici etkilerinin kombinasyonu sonucudur. Doğumdan sonra bu durumun hemen düzelmesi, plasental hormonlardan kaynaklandığını düşündürmektedir. Normal ve GDM grupları arasındaki insülin direnci farkı hamilelik dışında çok büyüktür. 3.trimesterde insülin seviyeleri veya sekresyonu arasındaki fark en fazladır. Gebelikte oluşan insülin direncinde, insüline duyarlı dokularda glukoz transportundaki postreseptör değişiklikler insülin duyarlılığının bozulmasında rol oynamaktadır [11].

Gebelerde insülin direnci vücut kitle indeksi ve kalıtım tarafından belirlenir. B hücre fonksiyonundaki değişiklik fetoplasental yapının hormon aktivitesi ile paralellik gösterir. Lokal üretilen östrojen, progesteron, kortizol, human koryonik somatotropin (hCS), human plasental laktojen (hPL), prolaktin (PRL) ve growth hormon (GH) insülin direncini arttırmaktadır [49]. Gebeliğin erken dönemlerinde

artan östrojen ve progesteron, maternal glukometabolik değişimde rol oynar. Östrojen, insülin salgısını ve reseptör bağlanmasını arttırırken, progesteron ters etki yaparak glukoz intoleransına yol açar.

Gebelikte kortizol miktarı iki kat artmıştır. Glukokortikoidler insülin reseptör fonksiyonunda bozulma, insülin reseptör substratı (IRS) miktarında azalmaya neden olarak insülin direnci gelişimini arttırırlar. Human plasental laktojen annede insülin benzeri büyüme faktörlerinin (IGF) üretimini arttırarak, metabolizmayı fetusun enerji ihtiyacına göre yönlendirir. Laktojen hormonlar (hPL, hGH, PRL), gebelikte gözlenen pankreas β 10 hücre kitlesindeki artıştan sorumludur [48].

Human plasental laktojen gebelikte 30 kata kadar artan salgısıyla, pankreastan insülin salınımını arttırmaktadır. Gebelikteki insülin direncinden sorumlu tutulan bir diğer hormon da human plasental growth hormon (hPGH)'dur. Hipofizer growth hormondan 13 aminoasiti farklıdır. Gebelik boyunca hPGH salınımı 6-8 kat artış göstererek, 20. hafta civarında annenin dolaşımındaki normal GH'un yerini alır.

GDM insidansı Amerikan Diyabet Derneği'nin verilerine göre %7 olarak bildirilmesine rağmen, bu oranın %17,8 olduğu tahmin edilmektedir[7].

GDM'li kadınlarda Tip 2 Diyabetes Mellitus (Tip 2 DM) gelişme riskinin ileri yaşlarda yedi kat arttığı bildirilmiştir[50]. Regüle olmayan gestasyonel diyabetli annelerin çocuklarında Tip 2 DM gelişme riski fazladır[51].

Daha önceki gebeliklerinde, GDM veya glukoz toleransı bozukluğu tanısı almış olması, iri bebek doğurma, ilk gebelik yaşının 25'den büyük olması, gebelik öncesi kilo fazlalığı, diyabet riski yüksek etnik gruptan olmak, ailede diyabetli öyküsü olması, spontan abortus hikayesi olması ve gebelik sırasında açlık ya da tesadüfen alınan kan şekeri değerinin yüksek tespit edilmesi durumu GDM tanısı koyma sıklığını arttırmaktadır[48, 52, 53].

Perinatal mortalite ve morbidite sebepleri arasından GDM ön sıralarda gelmektedir[54]. GDM de erken doğum, perinatal mortalite, fetal makrozomi, polisitemi, sarılık, hidroamniyoz, kardiomyopati, ilk trimesterde hipoglisemi ve gebeliğin ikinci yarısında hiperglisemi riski artmaktadır. GDM'li annenin bebeği, erken yaşlarda obezite gelişimi, bozulmuş glikoz intoleransı ve diyabet riski altındadır[55].

GDM' li gebelerde fetal kayıp ve hastalık oranları normal gebelere kıyasla yaklaşık dört kat yükselmiştir [52]. GDM' nin taranması, anne ve fetusta meydana gelen komplikasyonların uygun tedavi ile önlenabilir olması nedeniyle doğum öncesi takipte standart hale getirilmiştir[56].

GDM için dünyada en yaygın tarama testi olarak kullanılan 50 gr, bir saatlik glukoz testinin alınan eşik değerlere göre GDM'u yakalama duyarlılığı %60–80 arasındadır[57]. Tarama testinde eşik değer ≥ 140 mg/dl alınırsa GDM'li kadınların ortalama % 80'i saptanırken, eşik değer ≥ 130 mg/dl alınırsa GDM'li olarak tanı alacak kadınların oranı % 90'a ulaşmaktadır[46].

Tablo 2.2.3.1. Gebelik sırasında diyabetin sınıflandırılması ve tedavi protokolleri

SINIF	BAŞLANGIÇ	AÇLIK	POSTPRANDİYAL 2. SAAT	TEDAVİ
A1	Gestasyonel	< 105 mg/dL	< 120 mg/dL	Diyet
A2	Gestasyonel	> 105 mg/dL	> 120 mg/dL	İnsülin
SINIF	BAŞLANGIÇ YAŞI	SÜRE (YIL)	DAMAR HASTALIĞI	TEDAVİ
B	20 yaşından sonra	< 10	Yok	İnsülin
C	10–19	10–19	Yok	İnsülin
D	10 yaşından önce	< 20	Belign retinopati	İnsülin
F	Herhangi bir yaş	Herhangi bir yaş	Nefropati	İnsülin
R	Herhangi bir yaş	Herhangi bir yaş	Proliferatif retinopati	İnsülin
H	Herhangi bir yaş	Herhangi bir yaş	Kalp	İnsülin

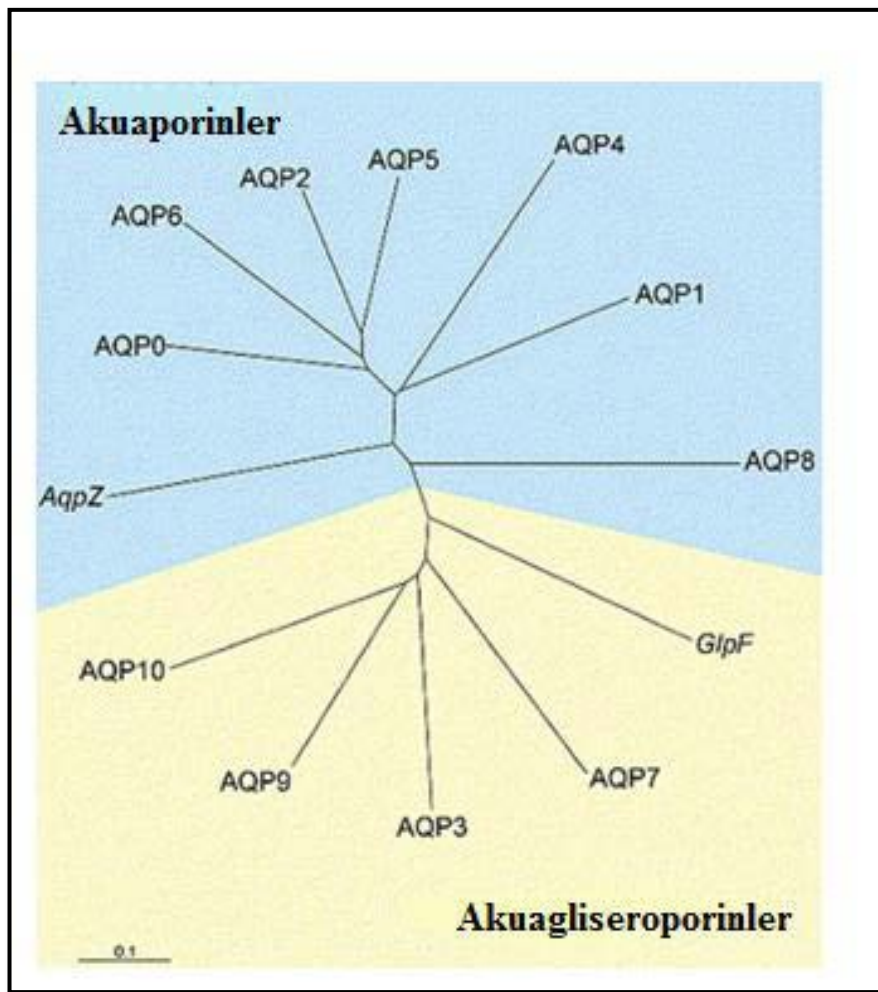
2.3. Akuaporinler

Akuaporinler olarak bilinen su kanalları, bir çok dokuda suyun transmembran olarak geçişinden sorumlu integral membran proteinleridir[2, 3]. Akuaporinler hücre membranının suya olan geçirgenliğini 5-50 kat artırırlar. Memelilerde bugüne kadar organlarda geniş bir dağılım aralığı gösteren toplam 13 adet akuaporin bulunmuştur[58]. Yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre akuaporinler 3 gruba ayrılır.

1. Klasik Akuaporinler; akuaporin 1,2,4,5,6 ve 8. Sadece suya geçirgendirler. Sekanslarına bağlı olarak akuaporin 6 (anyonlara da geçirgen) ve akuaporin 8 (üreye de geçirgen) de bu grupta yer almaktadır[4, 59].

2. Akuagliseroprinler; akuaporin 3,7,9,10. Suya,üreye ve gliserole de geçirgendirler. Akuaporin 9 ayrıca nötral solutlere de geçirgendir (purin,pirimidin gibi) [5, 60].

3. Süper Akuaporinler; akuaporin 11,12. Sitoplazmada lokalizedirler ve fonksiyonları henüz bilinmemektedir[61].



Şekil 2.3.1. Akuaporinlerin sınıflaması.

Memeli akuaporinleri sıvı transportunun gerekli olduğu birçok epitel ve endotelde, ayrıca epidermis, adiposit ve iskelet kası hücreleri gibi farklı diğer hücre tiplerinde de mevcuttur[62].

Böbrekte, akuaporin 1-2-3-4-6-7 ve 11 olmak üzere toplam 7 adet akuaporin mevcuttur. Akuaporin 1-2-3-4 idrar konsantrasyonunda önemli rol oynarlar[63]. Nefronlarda akuaporin 1, proksimal tübülün ve henlenin inen ince kolunun apikal ve basolateral membranlarında bulunur[64]. Akuaporin 2 ise toplayıcı tübüllerin prinsipal hücrelerinin apikal membranlarına lokalizedir. Bu molekülün mutasyonu nefrojenik diyabetes insipidusa yol açar[65]. Özellikle bu iki molekül glomerüler filtrattan suyun geri emiliminde rol oynarlar[64].

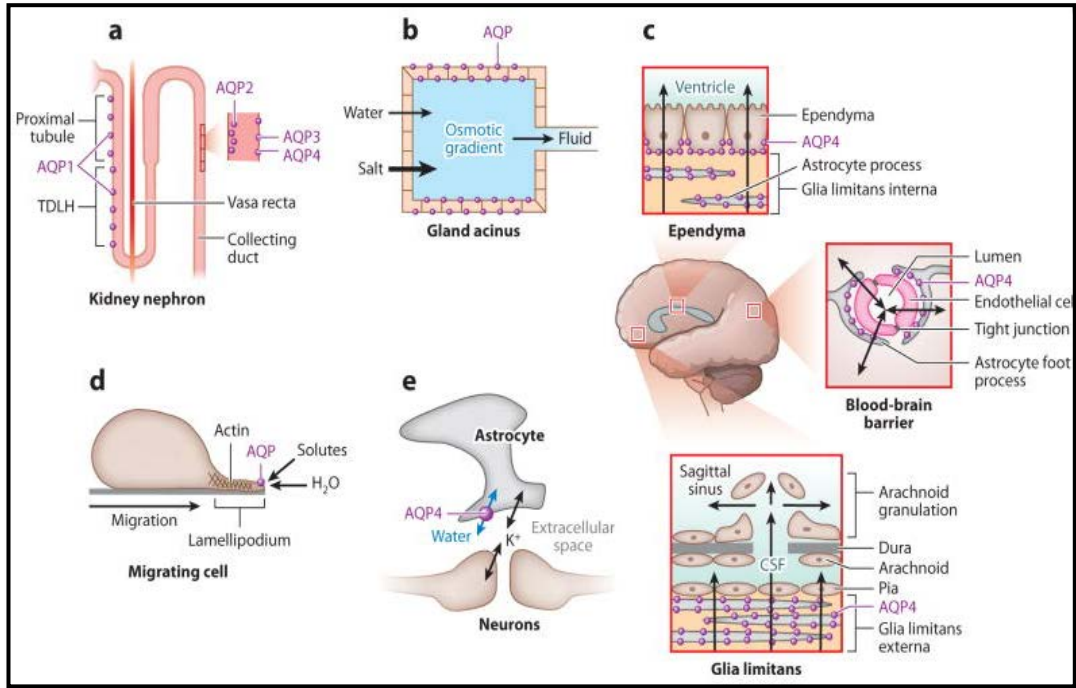
Akuaporin 3 ve 4 ise toplayıcı tübüllerin bazolateral membranına lokalize olup interstisyuma su çekmekle sorumludurlar[66, 67]. Akuaporin 7 proksimal tübülün 3. segmentinde apikal membranlara lokalizedir ve suyun yanında gliserole de geçirgendir[68]. Akuaporin 6 ve 11 ise diğer renal akuaporinlerin aksine hücre içi membranlarda lokalizedir. Akuaporin 6, toplayıcı tübüllerdeki interkalar hücrelerin hücre içi veziküllerinde, akuaporin 11 ise proksimal tübül endoplazma retikulum membranında bulunur[69]. Bu iki molekülün görevleri tam olarak netleşmemiş olsa da, akuaporin 11 knock-out fareler de polikistik böbrek hastalığı geliştiği gözlenmiştir[70].

Akuaporinler, tükrük bezleri gibi transepitelyal sıvı sekresyonunun olduğu egzokrin glandlarda da su geçişinden sorumludurlar[71]. Akuaporin 1-3-4-5 [72] ve 8 memeli tükrük bezlerinde bulunan akuaporinlerdir[73, 74].

Beyinde akuaporin 1-2-3-4-5-7-8-9 ve 11 birçok glia hücresinde mevcuttur[75]. Koroid hücrelerinde akuaporin 1 [76], astrositlerde akuaporin 1-3-4-5-8 ve 9 [77], oligodendrositlerde akuaporin 8 [78] ve ependimal hücrelerde akuaporin 1-4-9 ekspresyonu mevcuttur [79]. Akuaporin 1'in en yoğun bulunduğu bölge koroid pleksustur ve serebrospinal sıvı oluşumu için gereklidir [80-82]. Akuaporin 4, kan-beyin bariyerini oluşturan astrosit son ayaklarında ve ventrikülü döşeyen ependimal hücrelerde ve piamaterde glia limitans hücrelerinin plazma membranında bulunur[82]. akuaporin 4'ün özellikle sitotoksik beyin ödeminde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir[83].

Gözde akuaporinler kornea, lens, siliyer epitel ve retinada bulunur. Oküler yüzeyin hidrasyonunda, kornea ve lens saydamlığının korunmasında, göz içi basıncının korunmasında ve görsel sinyal iletiminde görev alırlar[84].

Deride, epidermal keratinositlerde bulunan akuaporin 3 derinin hidrasyonu ve epidermal proliferasyonda görev alır [85].



Şekil 2.3.2. Akuaporinlerin farklı sistemlerdeki görevleri.

2.3.1. Akuaporin 8

İnsanda akuaporin 8 geni 261 amino asidi kodlar ve klasik NPA motifini içerir. Bugüne kadar değişik gruplar tarafından, rat testis, karaciğer ve pankreasında [4, 74], fare karaciğer, akciğer ve plasentasında [86, 87] ve insan testisinde akuaporin 8 ekspresyonu gösterilmiştir. Akuaporin 8 civa ile inhibe olan bir su kanalıdır[88]. Fare akuaporin 8'i su yanında üreye de geçirgen olmasına rağmen insanda bu kanal sadece suya geçirgendir[89]. Akuaporin 8'in H ve NH₄ gibi yüklü moleküllere de geçirgenliği gösterilmiştir[90]. Bu özelliğinden dolayı akuaporin 8 ne klasik bir su kanalı ne de bir akuagliseroprin olarak değerlendirilmemektedir[91].

İnsanda akuaporin 8 mRNA'sı sadece pankreas ve testiste gösterilmiştir[88]. Rat'ta seminifer tübüller, epididim, karaciğer, duodenum, jejunum, kolon, egzokrin

pankreas, tükürük bezleri, böbrek ve bronşlarda farede ise ayrıca kalp, akciğer ve plasentada da akuaporin 8 mRNA'sı mevcuttur[4, 74, 88, 92]

Akuaporin 8'in regülasyon mekanizmaları çoğunlukla rat üzerinde çalışılmıştır(kendin). Rat karaciğerinde akuaporin 8, hepatosit içi veziküllerde bulunur ve taşınım c-AMP ile artar. C-AMP artışı aynı zamanda hücrelerin su geçirgenliğini de arttırmaktadır.bu iki durum göz önüne alındığında akuaporin 8 c AMP ile indüklenen safra sekresyonunda rol oynuyor olabilir [93]. Başka bir çalışmada hipotiroidizimin hepatic akuaporin 8 m-RNA'sını düşürdüğü T3 replasmanının ise bu etkiyi tamamen düzelttiği gözlenmiştir [94].

2.3.2. Akuaporin 9

Akuaporin 9 birçok türde karaciğer, epididim ve deride eksprese olur[95-97]. İnsanda periferik lökositlerde ve onların kümelendiği akciğer, dalak ve kemik iliğinde de akuaporin 9 m-RNA'sı gösterilmiştir[60].

Akuaporin 9 su transportu yapabilir ancak osmotik su geçirgenliği diğer akuaporinler kadar yüksek değildir[5, 60, 98]. Bunun yanında akuaporin 9; polioller (gliserol, mannitol, sorbitol), karbamidler (üre), pürinler (adenin), pirimidinler (urasil) ve monokarboksilatlar (laktat, beta hidroksibütirat) gibi birçok yüksüz solüte de geçirgendir[5]. Akuaporin 9'un beta hidroksibütirat nötral pH'da geçirgen değildir[98]. pH aside kaydırıldığında geçirgenlik aktif hale gelmektedir[99]. Akuaporin 9'un su ve solut geçirgenliği HgCl₂ ile inhibe olur. Bu durumun tek istisnası üre transportudur[100].

Akuaporin 9 ekspresyonu, karaciğerde farklı metabolik koşullarda farklılıklar gösterir. Fare ve sıçan karaciğerinde akuaporin 9 m-RNA seviyeleri uzamış açlıktan sonra artar ve beslenme sonrası azalır[101]. Streptozosin ile düklenmiş diyabetes mellitusta ise karaciğer akuaporin 9 m-RNA seviyeleri belirgin olarak düşer ve insülin uygulamasından sonra normale döner[98]. Buna karşın porcin karaciğerinde yapılan in vitro çalışmalarda insülin uygulamasının akuaporin 9 m-RNA seviyelerine bir etkisinin olmadığı ancak T3 ve glukagon uygulamasının m-RNA ve protein seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir[96]. İnsülin rezistansı olan, obez, leptin reseptörü mutant farelerde ise akuaporin 9 protein seviyeleri yüksek plazma insülin seviyelerine rağmen yükselmiştir[101]. İnsülin rezistansı olan farklı bir sıçan türünde

ise akuaporin 9 m-RNA seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılık bulunmamıştır[102]. Sonuç olarak akuaporin 9 ekspresyonu direkt ve indirekt olarak farklı birçok sinyal yolağı ile regüle olmaktadır[91].

2.3.3. Akuaporinlerin Plasenta ve Fetal Membranlardaki Rolü

Plasenta gebelik boyunca anne ile fetus arasındaki fizyolojik değişimlerin gerçekleştiği geçici bir organdır. Gebelik boyunca fetusun büyümesiyle fetal su ihtiyacı belirgin olarak artar. Fizyolojik veriler suyun plasentadan geçişi için hem transsellüler hem de parasellüler yolun mümkün olduğunu belirtmektedir[1]. Transsellüler yolun küçük integral membran proteinleri olan akuaporinler (AQP) aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir [2, 3]. İnsan plasentasında bugüne kadar 5 tip akuaporin tanımlanmıştır.

Tablo 2.3.3.1. Akuaporinlerin, insan plasentası ve fetal zarlarındaki lokalizasyonu.

Akuaporin	Lokalizasyon	Ref. No.
Akuaporin 1	Koryon Amnion Plasental damarlar	[103, 104]
Akuaporin 3	Koryon Amnion Trofoblastlar	[104, 105]
Akuaporin 4	Trofoblastlar	[106]
Akuaporin 8	Koryon Amnion Trofoblastlar	[19]
Akuaporin 9	Koryon Amnion Trofoblastlar	[20]

Plasenta ve fetal zarlardaki akuaporinlerin dağılımları özellikle amniyotik sıvı anormalliklerinde farklılıklar göstermektedir. İdiyopatik polihidramniyosla komplike gebeliklerde akuaporin 1 ekspresyonu normale göre 33 kat artmaktadır. Bu artış, polihidramniyosa karşı gelişmiş kompensatuvar bir cevap olabilir[107]. İdiyopatik polihidramniyoslu plasentalarda akuaporin 8 ekspresyonu amniyonda, akuaporin 9 ekspresyonu ise amnion ve koryonda yüksek, plasenta ekspresyonları ise belirgin derecede düşüktür. Bu durum, idiyopatik polihidramniyosta farklı düzenleyici

faktörlerin akuaporin 8 ve akuaporin 9 seviyelerini değiştirmesiyle ilgili olabilir[108]. Bu değişikliklerin amacı intramembranöz absorpsiyonu artırıp maternal-fetal su geçişini azaltarak amniyotik sıvı homeostazını dengede tutmaya çalışmaktır. Bunun yanında aynı grup oligohidramniyosla komplike gebeliklerde, akuaporin 1 ekspresyonunun amniyonda arttığını ancak plasenta ve koryonda belirgin bir değişikliğin olmadığını gösterdi. Akuaporin 3 ekspresyonunun da amniyon ve koryonda azaldığı, plasentada ise belirgin olarak arttığı gösterildi[104].

Trofoblastlarda akuaporin 3 ve akuaporin 9 moleküllerinin eksprese olduğu ve bu iki molekülün anne ve fetus arasında su transportunun yanında solut geçişinde de rol oynadığı öne sürüldü[109]. Preeklampitik plasentalarda ise akuaporin 9'un sinsityotrofoblastların hem apikal hem de bazal membranlarında eksprese olduğu gösterildi. Molekülün ekspresyondaki bu artışın su transportundaki artışla ilgili olabileceği öne sürüldü. Aynı çalışmada plasental eksplantların su ve mannitol alımları ölçüldüğünde, sonuçların normal eksplantlardan düşük olduğu ve kanalların HgCl₂ 'e duyarlı olmadığı gözlemlendi. Mannitol alımı HgCl₂'ye duyarlıdır ve akuaporin 9 için spesifiktir. Bu bilgi ışığında sonuçlar değerlendirildiğinde akuaporin 9'un preeklampside su ve mannitol alımı ile ilgili fonksiyon kaybına uğradığı düşünülebilir. Yine aynı çalışmada preeklampitik eksplantların üre alımlarının %35 arttığı gözlemlenmiştir. Tüm bu sonuçlar akuaporin 9 geçirgenliğinin patolojik koşullar altında yeniden düzenlenebilir bir molekül olduğunu işaret etmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

Projemiz Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklendi (Proje no: 012D11101004). Çalışmada kullanılan plasenta doku örnekleri Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesinde, 38-40. Haftalarda sezeryan ya da normal yolla doğum yapan, herhangi bir hastalığı olmayan ve diyetle veya insülinle regüle edilen gestasyonel diyabet hastalığı olan gebelerden elde edildi. Tüm hastalardan yazılı onam alındı (Etik Kurul İzin No: LUT12/62).

Elde edilen plasenta doku örnekleri çalışmaya uygunluk açısından değerlendirildi.

Grup 1 (sağlıklı ve sistemik bir hastalığı olmayan, 38-40. gebelik haftaları arası doğum yapmış kişilerden alınan plasenta doku örnekleri) n=8

Grup 2 (insülinle regüle edilen gestasyonel diyabetes mellitusu olan, 38-40. gebelik haftaları arası doğum yapmış kişilerden alınan doku örnekleri) n=4

Grup 3 (diyetle regüle edilen gestasyonel diyabetes mellitusu olan, 38-40. gebelik haftaları arası doğum yapmış kişilerden alınan doku örnekleri) n=10

Tablo 3.1.1. Gruplar

Grup 1	Kontrol grubu	N=8
Grup 2	İnsülinle regüle GDM	N=4
Grup 3	Diyetle regüle GDM	N=10

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Doğum sonrası elde edilen plasental doku örnekleri %10 tamponlu nötral formaldehit içine alınarak Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına getirildi. Plasentanın fetal yüzünden 1 cm³ lük örnekler alındı. 2 gün boyunca %10 tamponlu nötral formaldehit içinde immersiyon fiksasyonu uygulandı. Doku örnekleri daha sonra rutin ışık mikroskobu doku takip yöntemine göre dereceli alkollerden geçirilerek dehidrate edildi, ksilolde şeffaflandırdıktan sonra parafine gömüldü. Doku takibi için sabit vakumlu bir doku

takip cihazı kullanıldı (Leica, model TP 1020). Parafin bloklardan rotary mikrotom (Leica SM 2000R) ile 2-3 um kalınlığında kesitler krom alüm jelatin kaplı rodajlı lamlara alındı.

3.2.2. Hematoksilen-Eozin Boyama

Mayer' in hematoksileni ve eozin kullanıldı.

Mayer'in hematoksileninin malzemeleri

- Aliminyum potasyum sülfat ($KAL(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) (Sigma, K.N:A 7167) 50gr.
- Hematoksilen (Sigma, K.N:H 9627)1.0gr.
- Sodyum İodit ($NaIO_3$) (Sigma, K.N:S 407) 0.2gr
- Kloral hidrat ($C_2H_3Cl_3O_2$) (Sigma, K.N:N 8383) 50gr
- Distile su 1000ml
- Sitrik asit (monohidrat)($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (Sigma, K.N:C 7129) 1.0gr

Boyanın Hazırlanışı

1.0gr hematoksilen 1000ml distile suda eritildi. Üzerine 0.2gr sodyum iyodit ilave edildi. 50gr aliminyum potasyum sülfat eklenerek manyetik karıştırıcıda tamamen eriyinceye kadar karıştırıldı. Son olarak kloral hidrat ve sitrik asit ilave edildi. Boya kullanılmadan önce süzüldü.

Eozinin hazırlanması

- Eozin Y (suda eriyen) 3gr
- Distile su 475ml
- %95'lik alkol 125ml
- Asetik Asit 2 damla

3 gr eozin Y 100ml distile suda çözüldü. Üzerine 125ml %95'lik alkol eklendi. Karışımın üstüne 375ml daha distile su eklenerek 2 damla asetik asit damlatıldı.

Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Kesitler boyama işlemi öncesi 1 gece 60⁰C lik etüvde bekletilerek deparafinize edildi.

Ertesi gün boyama işlemi gerçekleştirildi.

- 3 kez 15 dakika ksilolde bekletildi.
- %96-%96-%80' lik alkollerde 10'ar dakika bekletilerek rehidrate edildi.
- Akarsuda 10 dakika yıkandı.
- Hematoksilende 15 dakika bekletildi.
- Akarsuda 10 dakika yıkandı.
- 2 kere asit alkole batırılıp çıkarıldı.
- Akarsuda 10 dakika yıkandı.
- 2 kere amonyaklı suya batırılıp çıkartıldı
- 60sn eozinde bekletildi.
- %80-%96-%96'lık alkollerden geçirilerek dehidrate edildi.
- Kurutulup, 45 dakika ksilolde bekletildi.
- Kapama materyali ile lamalar kapatıldı.

Değerlendirme

Kesitler, Hacettepe Üniversitesi Histolojik Görüntüleme Merkezi'nde yer alan, Leica DM6000B ışık mikroskopunda değerlendirildi. Görüntüler DC 500 model Leica marka dijital kamera ile bilgisayar ortamına aktarıldı.

3.2.3. İmmünohistokimya Yöntemi

Kullanılan Malzeme ve Solüsyonların Hazırlanması

- Jelatinli lam
- Fosfat tampon solüsyonu (PBS)
- Sitrat Tamponu
- Primer antikor
- Sekonder antikor
- Diamino benzidin solüsyonu (DAB)

- Mayer' in hematoksileni

Jelatinli lam

Çalışmada kullanılan jelatinli lamlar ticari olarak sağlandı. (Thermo Scientific- Lot no: 0105129)

Fosfat Tamponlu Salin Solusyonunun (PBS) Hazırlanması

Solüsyon I:

- Sodium dihydrogen phosphatemonohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 13.7 gr
- (Merck K,N:3090) Sodium chloride (NaCl) 87.66 gr
(Merck K,N:6408)
- Distile su 1000 ml

Solüsyon II:

- Sodium dihydrogenorthophosphate($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 71.2 gr
(BDH Chemicals No: 30132)
- Sodium chloride (NaCl) 350.64 gr
(Merck K,N:6408)
- Distile su 4000 ml

Stok Solüsyonu: Hazırlanan solüsyon I ve solüsyon II ayrı ayrı süzöldükten sonra 4000 ml. solüsyon II içerisine 500 ml. solüsyon I eklendi. Karışımın pH' sı pHmetre ile ölçöldü. Karışımın pH' sı 6, 9 olana kadar solüsyon I veya II eklendi.

Kullanma Solüsyonu (yıkama solüsyonu): Stok solüsyonu 1/ 10 oranında distile su ile dilöe edildi. Solüsyon I ve II yardımı ile pH' sı 7, 4 olacak şekilde ayarlandı.

Sitrat tamponu

Antijen geri çağırma için kullanılan sitrat tamponu Abcam firmasından ticari olarak sağlandı. (cat no: 64326) 100X citrate buffer, pH:6.0 .

Primer antikorlar

Çalışmada kullanılan primer antikorlar Abcam firmasından ticari olarak sağlandı. (AQP9-cat no: ab85910, AQP8-cat no: ab85908) Antikorlar için uygun dilüsyon, önerilen oranlarda seri dilüsyon denemeleri yapılarak saptandı.

Tablo 3.2.3.1. Kullanılan primer antikorların özellikleri ve sulandırma oranları.

Antikor adı	Klon adı	kaynağı	izotip	Sulandırma oranı	Katalog no
AQP8	POLİKLONAL	ABCAM	RABBİT IgG	1/5000	ab85910
AQP9	POLİKLONAL	ABCAM	RABBİT IgG	1/8000	ab85908

Sekonder antikor

Rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (abcam, cat. no. ab64261)

Diamino benzidin solusyonu (DAB)

DAB solusyonu sekonder kit'e dahildi. (abcam, cat. no. ab64261)

Tablo 3.2.3.2. Sekonder kitin içerdiği solüsyonlar ve miktarları.

Sekonder kit bileşenleri	miktar
50X DAB kromojen	0.5ml
Sekonder antikor	15ml
DAB substrat	15ml
Hidrojen peroksidaz bloklayıcı serum	15ml
Protein blokaj serumu	15ml
Streptavidin peroksidaz	15ml

İndirekt ABC Yöntemi

- Parafin kesitler 60°C' ye kadar ısıtılmış etüvde 3 saat bekletildi.
- Üç kez yenilenen ksilolde 10' ar dakika bekletildi.
- %96-%90-%80-%70'lik alkollerde 10' ar dakika bekletilerek rehidrate edildi.

- Sitrat tamponu kullanılarak mikrodalgada 360W 'ta 10 dakika kaynar halde tutularak antijen açığa çıkarma işlemi uygulandı.
- Kesitler oda sıcaklığında 10 dakika soğumaya bırakıldı.
- PBS yıkama solusyonu ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için hidrojen peroksit solusyonu ile nemli ve kapalı bir kutuda oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
- Şalelere dizilen lamalar PBS yıkama solusyonu ile 3 kez 5' er dakika yıkandı.
- Blokaj serumu damlatılarak nemli ve kapalı bir kutuda 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- Kesitlerin etrafı doku sınırlayıcı kalem ile sınırlandırıldı.
- Primer antikolar kesitlere damlatıldı ve nemli ve kapalı bir kutuda 1 saat 37C'lik etüvde inkübe edildi.
- Şalelere dizilen lamalar PBS yıkama solusyonu ile 3 kere 5' er dakika yıkandı.
- Kesitler sekonder antikor (Biotinylated Seconder Antibody) ile 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- Şalelere dizilen lamalar PBS yıkama solusyonu ile 3 kere 5' er dakika yıkandı.
- Kesitler streptavidin-peroksidaz ile 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- Şalelere dizilen lamalar PBS yıkama solusyonu ile 3 kere 5' er dakika yıkandı.
- Kesitlerin üzerine kit içeriğine uygun şekilde hazırlanmış olan kromojen (DAB) damlatıldı 5 dakika bekletildi.
- Şalelere dizilen lamalar PBS yıkama solusyonu ile 3 kere 5' er dakika yıkandı.
- Şalelere dizilen lamalar çeşme suyu ile yıkandı.
- Hematoksilen süzüldü.
- Lamlar 45 saniye hematoksilende bekletildi.
- Şalelere dizilen lamalar çeşme suyu ile yıkandı.
- Artan alkol serilerinde (%70-80-90-96) 10'ar dakika bekletilerek dehidrate edildi.
- Kesitler kurutulduktan sonra ksilolde 15-20 dakika bekletilerek şeffaflaştırıldı.
- Kapama materyali ile kesitler kapatıldı.

Kontrol boyaması

Negatif kontrol: tüm kesitler, primer antikor basamağında PBS uygulanarak, izleyen tüm basamaklar uygulandı.

Değerlendirme

Diyetle regüle GDM'li ve insulinle regüle GDM'li gebe ile sağlıklı gebelere ait plasentalarına ait kesitlerde AQP8 ve AQP9 primer antikorları ile yapılan immunohistokimyasal işaretlemelerde her bir kesitte X400 büyütmede rastgele beş alan seçildi.

Seçilen alanlardaki tüm sinsityotrofoblastlar, haufbauer hücreleri, villus içi bağ dokusu hücreleri ve fetal kapiller endotel hücreleri sayıldı. immünoaktivite gösteren hücreler sayıları, toplam hücre sayılarına oranlandı ve yüzde olarak ifade edilip aşağıdaki tabloya göre skorlandı olarak değerlendirildi. İmmünoaktivitenin şiddeti de aşağıdaki tabloya göre skorlandı.

Tablo 3.2.3.3. İmmünoaktivite şiddetleri ve temsili skorları.

Skor	İmmünoaktivitenin şiddeti
0	yok
1	Zayıf
2	Orta
3	kuvvetli

Tablo 3.2.3.4. İmmünoaktivite gösteren hücre sayıları ve temsili skorları.

Skor	İmmünoaktivite gösteren hücre sayısı (100 hücre için)
0	0-4
1	5-24
2	25-49
3	50-74
4	75-100

3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi

Çalışmada nitel veriler için sayı ve yüzde kullanıldı. Üç grupta boyanma yoğunluğu, şiddeti ve yüzdesinin karşılaştırmada Çapraz Tablo analizlerinden Ki-kare testi, koşullu Ki-kare testi ve Fisher Kesin testi kullanıldı. İstatistiksel analizlerin tümünde $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi. Verilerin analizi için SPSS for Windows 15.0 paket programı kullanıldı.

4. BULGULAR

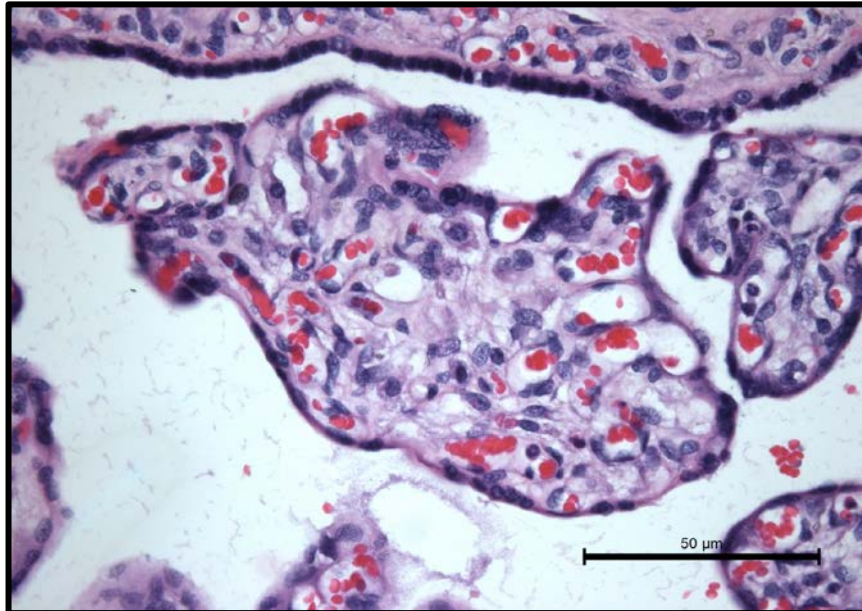
4.1. Histolojik Bulgular

4.1.1. Işık Mikroskobu Bulguları

Kontrol grubu (Grup 1), insülinle regüle GDM grubu (Grup 2) ve diyetle regüle GDM grubu (Grup 3) örneklerinde plasental villus yapıları incelendi.

4.1.1.a. Kontrol Grubu (Grup 1)

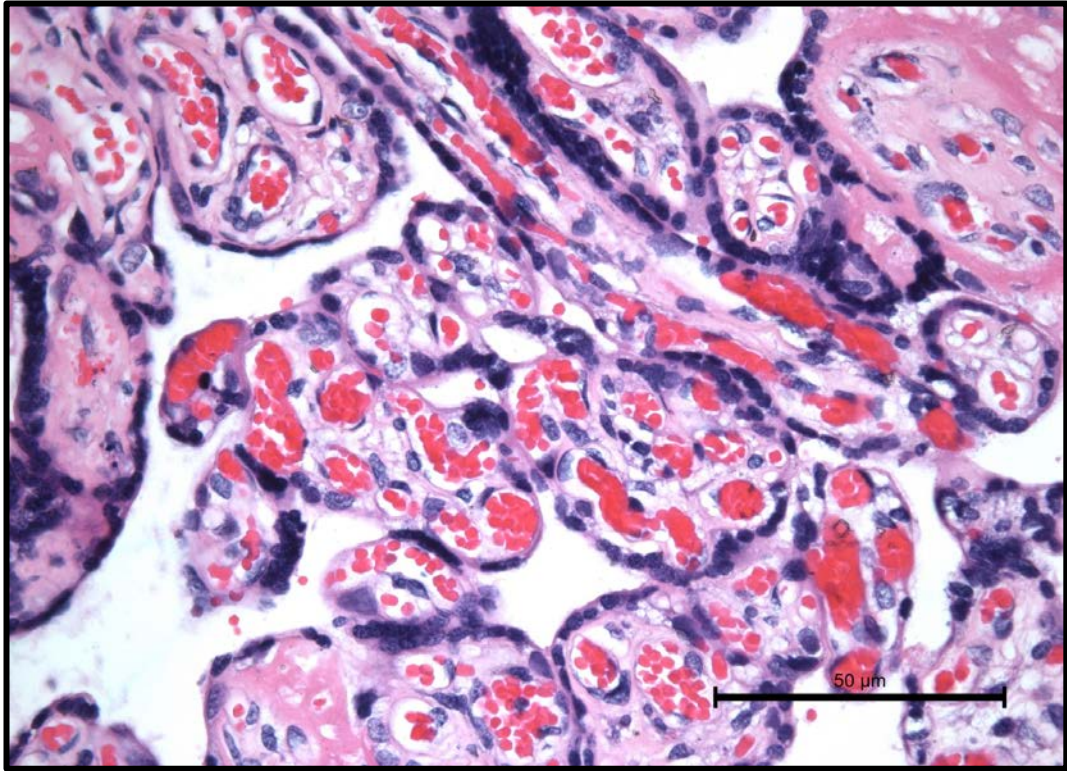
Kontrol grubunda 8 adet plasenta incelendi. Alınan doku örneklerinin hepsinde serbest (yüzen) villuslarda tek sıra halinde villusu çevreleyen sinsityotrofoblast hücre tabakası mevcuttu. Çalışmada kullanılan dokuların 38-40. hafta term plasentalardan elde edilmesi nedeniyle sinsityotrofoblast hücre tabakası altında devamlı bir sitotrofoblast hücre tabakası izlenmedi ancak yer yer sitorofoblast hücreleri gözlemlendi. Villus içi bağ dokusunda iğ biçimli mezenkimal hücreler ve villus içi makrofaj olarak bilinen Hofbauer hücreleri görüldü. Fetal kapillerler term plasentaların bir özelliği olarak villusun periferine doğru yerleşmiş ve yer yer sinsityotrofoblastlarla temas eder halde gözlemlendi (Şekil 4.1.1.a.1.).



Şekil 4.1.1.a.1 Kontrol grubu; plasental villuslar, sinsityotrofoblast hücre tabakası, Hofbauer hücreleri, villus içi bağ dokusu hücreleri, (H.E. X400).

4.1.1.b. İnsulinle Regüle GDM Grubu (Grup 2)

İnsulinle regüle GDM grubunda alınan doku örneklerinin hepsinde serbest (yüzen) villuslarda tek sıra halinde villusu çevreleyen sinsityotrofoblast hücre tabakası mevcuttu. Sinsityal düğümlerde artış mevcuttu ve villus içi kapiller sayısında artma gözlemlendi. Bazı intervillöz bölgelerde konjesyon gözlemlendi. Çalışmada kullanılan dokuların 38-40.hafta term plasentalar olması sebebiyle devamlı bir sitotrofoblast hücre tabakası izlenmedi ancak yer yer sitotrofoblast hücreleri gözlemlendi. Villus içi bağ dokusunda iğ biçimli mezenkimal hücreler ve villöz makrofaj olarak bilinen Hofbauer hücreleri görüldü. Fetal kapillerler yine term plasentaların bir özelliği olarak villusun periferine doğru yerleşmiş ve yer yer sinsityotrofoblast hücreleriyle temas eder halde gözlemlendi (Şekil 4.1.1.b.1.).



Şekil 4.1.1.b.1 İnsulinle regüle GDM grubu; plasental villuslar, yer yer plasental düğümler gözlenmektedir, (H.E. X400).

4.1.1.c. Diyetle Regüle GDM Grubu (Grup 3)

Diyetle Regüle GDM grubunda 10 adet plasenta incelendi. Alınan doku örneklerinin hepsinde serbest (yüzen) villuslarda tek sıra halinde villusu çevreleyen sinsityotrofoblast tabakası mevcuttu. Sinsityal düğümlerde artış mevcuttu ve villus içi kapiller sayısında artma gözlemlendi. Intervillöz bölgede ise yer yer konjesyon gözlemlendi. Çalışmada kullanılan dokular 38-40. haftalara ait term plasentalar olması sebebiyle devamlı bir sitotrofoblast hücre tabakası izlenmedi ancak sitorofoblast hücreleri sinsityotrofoblast hücrelerinin altında kesintili hücre dizisi olarak gözlemlendi. Villus içi bağ dokusunda iğ biçimli mezenkimal hücreler ve villöz makrofaj olarak bilinen Hofbauer hücreleri görüldü. Bu hücrelerde diğer gruplarla arasında sayısal farklılık belirlenmedi. Fetal kapillerler yine term plasentaların bir özelliği olarak villusun periferine doğru yerleşmiş ve zaman zaman sinsityotrofoblast hücre tabakasıyla temas eder halde gözlemlendi (Şekil 4.1.1.c.1.).



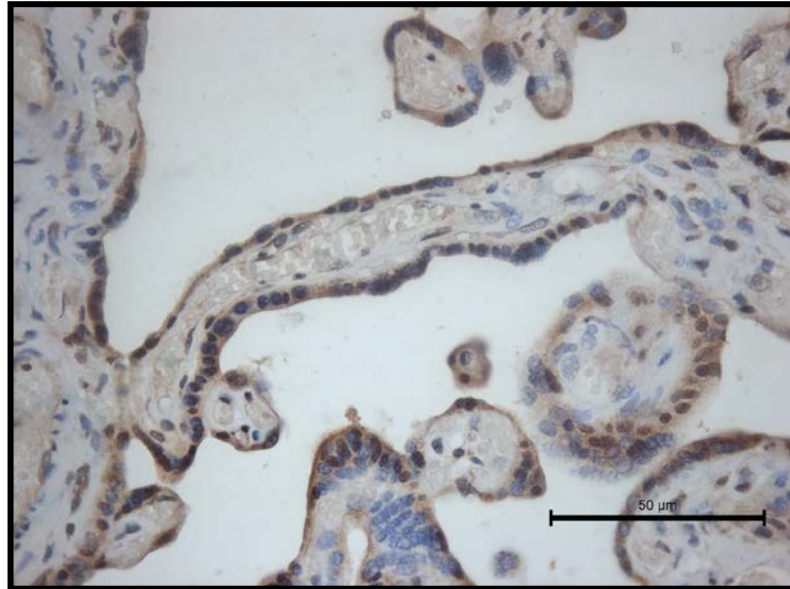
Şekil 4.1.1.c.1. Diyetle regüle GDM grubu; plasental villus içinde yoğun fetal kapillerler, (H.E. X400).

4.1.2. AQP8 İmmunohistokimyasal Bulguları

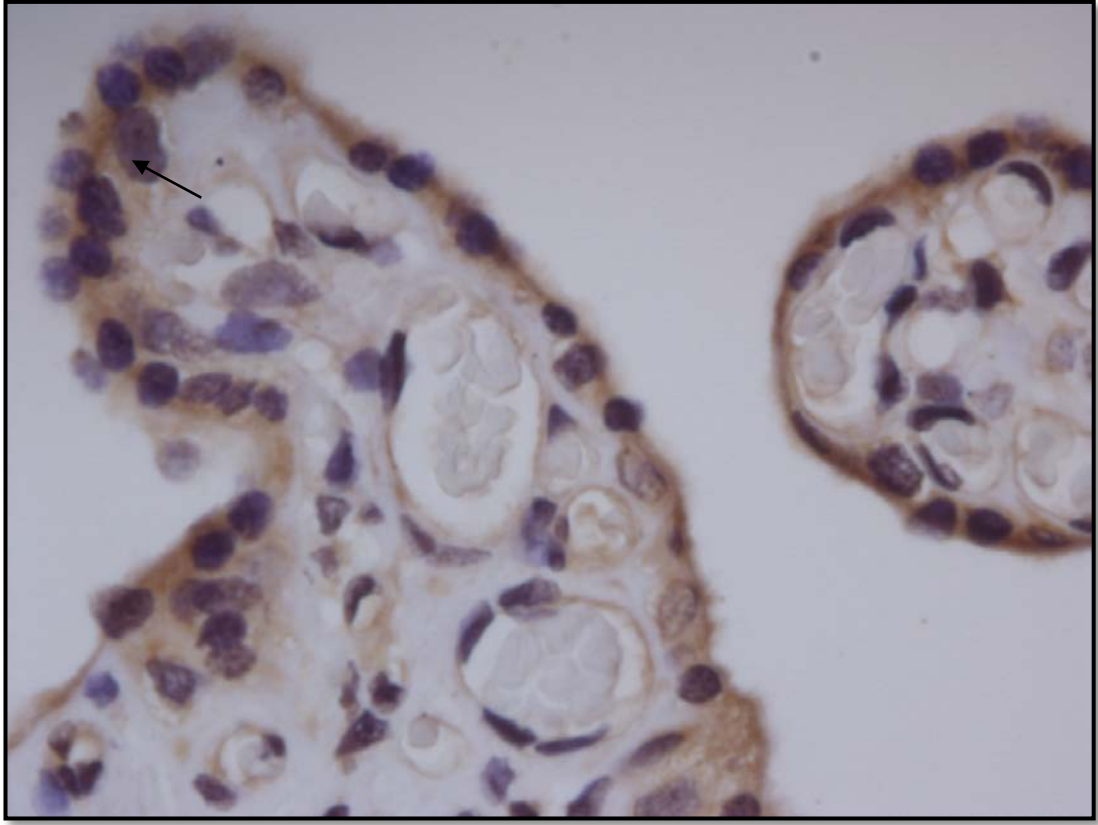
Kontrol, Diyetle Regüle GDM ve İnsülinle Regüle GDM gruplarında plasental villuslarda; sinsityotrofoblast hücreleri, Hofbauer hücreleri, villus içi bağ dokusu hücreleri ve fetal kapiller endotel hücreleri AQP8 immunreaktivitesi açısından incelenmiştir.

4.1.2.a. AQP8 Kontrol Grubu (Grup 1)

Kontrol grubundan alınan örneklerde koryon villuslarında AQP8 ile immunoreaktivite gösteren hücreler görüldü. Sinsityotrofoblast hücrelerinde orta şiddette sitoplazmik immunoreaktivite izlendi. Apikal-bazal mesafesi belirgin olan sinsityotrofoblast hücrelerinde immunoreaktivite çoğunlukla bazale lokalizeydi. Hofbauer hücrelerinde çoğunlukla orta şiddette olan ancak yer yer zayıflayan sitoplazmik immunoreaktivite gözlemlendi. immünoreaktivitenin bu hücrelerin sitoplazmasında homojen olduğu izlendi. Villus içi bağ dokusu hücreleri de çoğunlukla Hofbauer hücreleriyle aynı şiddette bir immunoreaktiviteye sahipti. Fetal kapiller endotel hücrelerinde de sitoplazmik ve sinsityotrofoblast hücreleriyle benzer şiddette bir boyanma gözlemlendi (Şekil 4.1.2.a.1.).



Şekil 4.1.2.a.1. AQP8 Kontrol Grubu; immünoreaktif sinsityotrofoblast hücre tabakası her villusun çevresinde görülmektedir, (ABC Yöntemi-Hematoksilen X400).

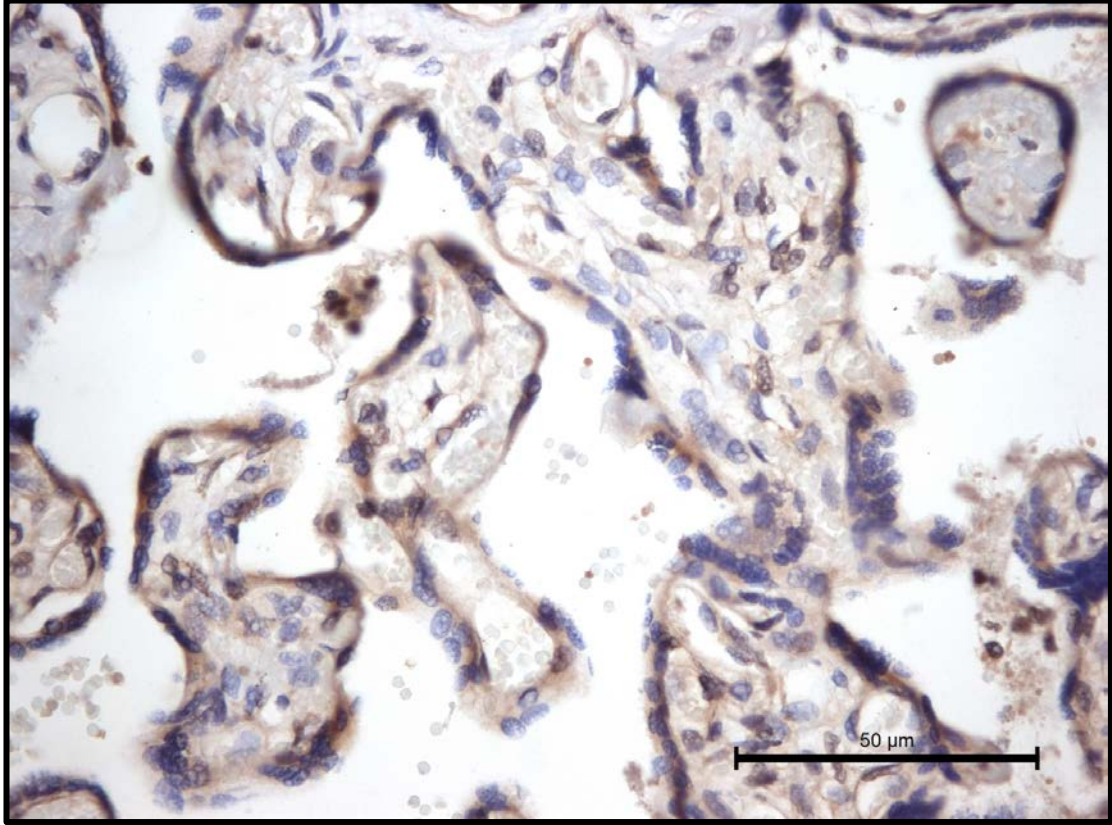


Şekil 4.1.2.a.2. AQP8 Kontrol Grubu. AQP8 immunoreaktivitesi gösteren sinsityotrofoblast hücre tabakasında ekspresyonun apikal-bazal mesafesi yüksek olan kısımlarda bazale lokalize olduğu görülüyor. Fetal kapiller endotel hücreleri de sinsityotrofoblast hücre tabakasıyla benzer şiddette bir immunoreaktiviteye sahip, (ABC Yöntemi, Hematoksilen X1000).

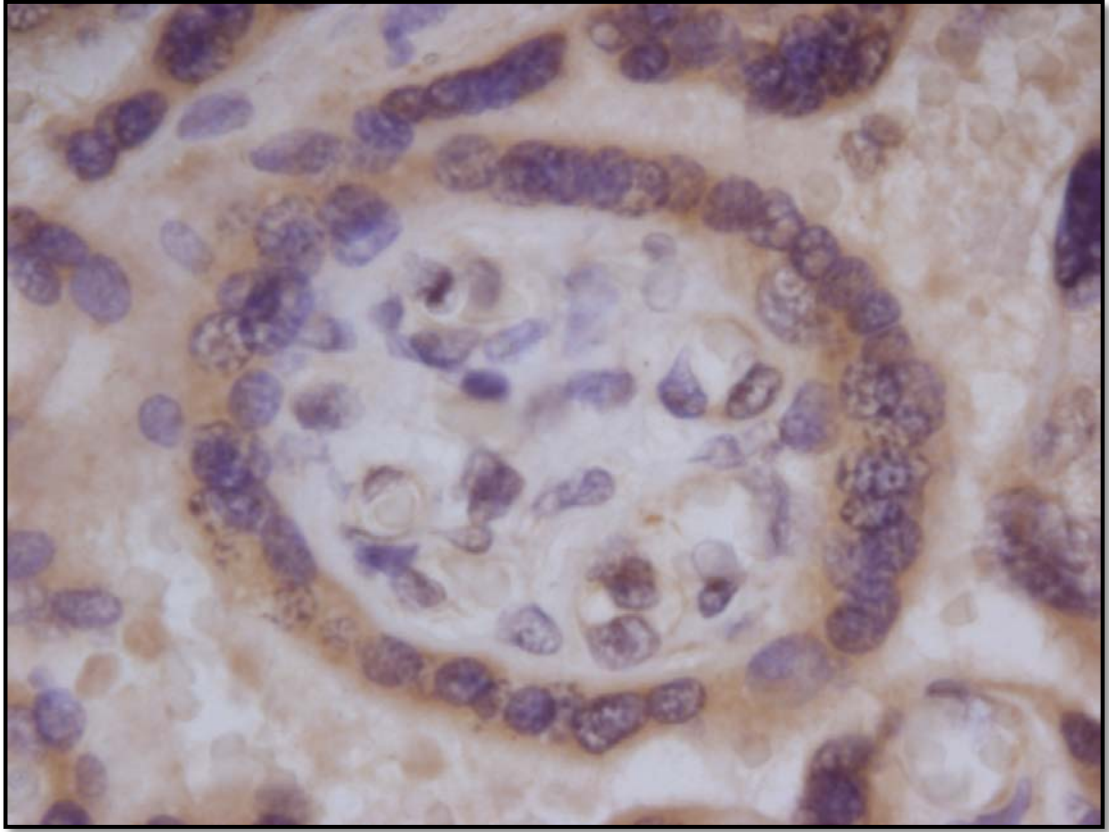
4.1.2.b. AQP8 İnsülinle Regüle GDM Grubu (Grup 2)

İnsülinle regüle GDM grubundan alınan örneklerde AQP8 ile immunreaktivite gösteren hücreler görüldü. Sinsityotrofoblastlar orta şiddette immunreaktivite gösterdi. Boyanma genel olarak homojen özellikteydi ve sitoplazmaya lokalizeydi. Hofbauer hücreleri, fetal kapiller endotel hücreleri de birbirine benzer, orta şiddette immunreaktivite gösterdiler. Bu grupta immunreaktivite gösteren hofbauer hücre sayısı diğer iki gruptan anlamlı olarak farklıydı ($p < 0.001$). çok daha az sayıda Hofbauer hücresi bu grupta immunreaktiviteye sahipti. Villus içi bağ dokusu hücreleri ise zayıf bir

immunoreaktivite sergilemekteydi ve immunoreaktivite şiddeti diğer gruplardan anlamlı olarak farklıydı ($p < 0.001$) (Şekil 4.1.2.b.1.).



Şekil 4.1.2.b.1. AQP8 İnsülin Grubu; immunoreaktif Hofbauer hücreleri, (ABC Yöntemi-Hematoksilen X400).

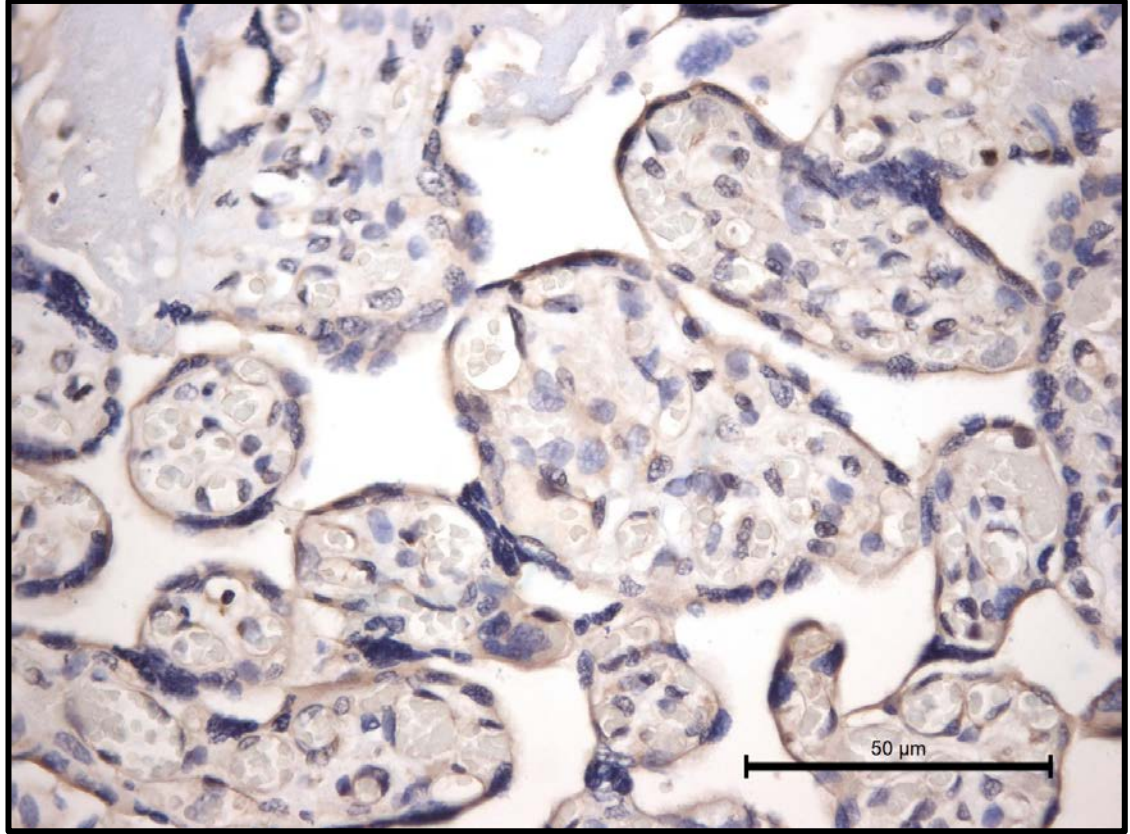


Şekil 4.1.2.b.2. AQP8 İnsülin Grubu; AQP8 immünoreaktivitesi gösteren bir villusun transvers kesiti. Villus içi bağ dokusu ödemli olduğundan Hofbauer hücreleri rahatça görülebilmekte. Hofbauer hücrelerinde yer yer nükleer immünoreaktivite görülüyor (ABC Yöntemi, Hematoksilen X1000).

4.1.2.c. AQP8 Diyetle Regüle GDM Grubu (Grup 3)

Diyetle regüle GDM grubundan alınan örneklerde AQP8 ile immunoreaktivite gösteren hücreler görüldü. Kontrol grubuna göre daha fazla sayıda sinsityotroblast orta şiddette immunoreaktivite gösterdi. Apikal-bazal mesafesi belirgin olan sinsityotroblastlarda immunoreaktivite çoğunlukla bazale lokalizeydi. Hofbauer hücrelerinde çoğunlukla orta şiddette olan ancak yer yer zayıflayan sitoplazmik immunoreaktivite gözlemlendi. İmmünoreaktivitenin Hofbauer hücre sitoplazmasında homojen bir dağılım gösterdiği izlendi. Villus içi bağ dokusu hücrelerinin de kontrol grubuna göre daha şiddetli immünoreaktivite gösterdiği izlendi. Fetal kapiller endotelinde de sitoplazmik ve sinsityotroblastlara benzer şiddette bir boyanma

gözlendi. Fetal kapiller endotel hücreleri bu grupta, immünoaktivitenin şiddeti ve sayısal yüzdeleri açısından diğer iki gruptan anlamlı olarak farklılık gösterdi ($p=0.005$, $p<0.001$). Bu hücreler diğer gruplara oranla daha az ve daha zayıf immünoaktivite göstermekteydi. (Resim 4.1.2.c.1.).



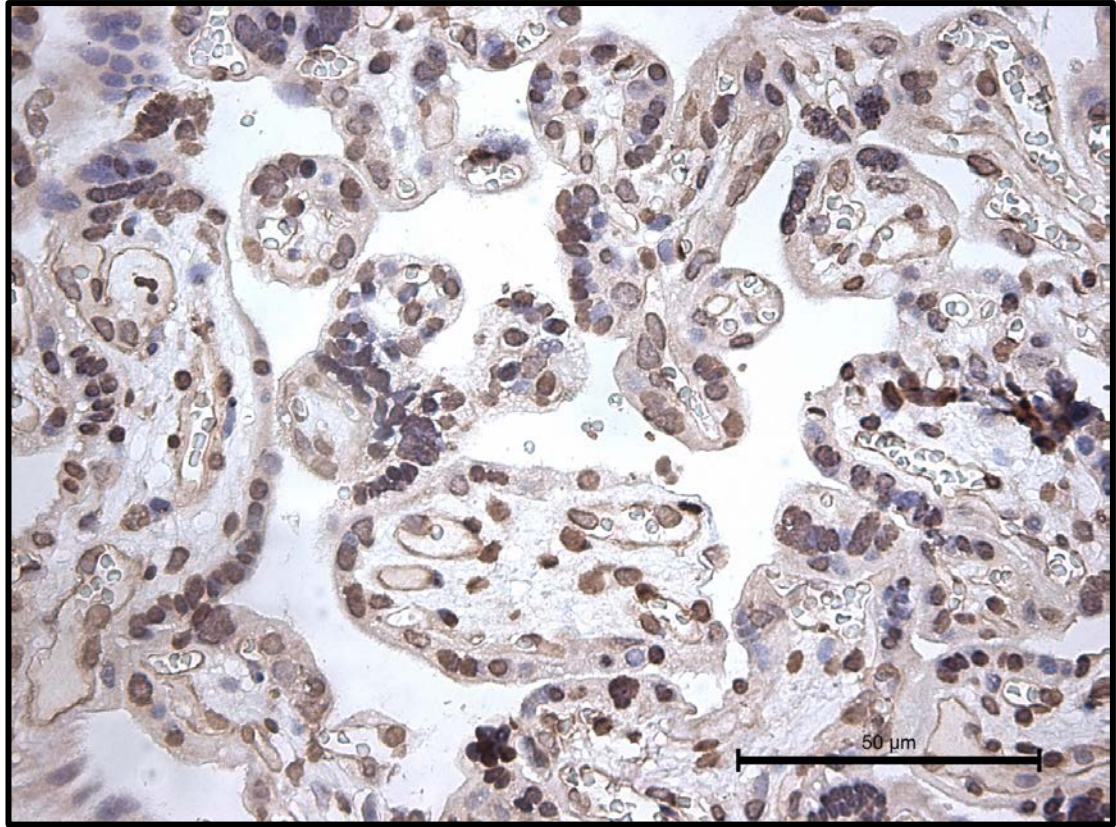
Şekil 4.1.2.c.1. AQP8 Diyet Grubu; fetal kapiller endotel hücreleri sitoplazmik olarak immünoaktivite gösteriyor, (ABC Yöntemi-Hematoksilen X400).

4.1.3. AQP9 İmmunohistokimyasal bulgular

Kontrol, diyetle regüle GDM ve insülinle regüle GDM gruplarında plasental villuslarda; sinsityotrofoblastlar, Hofbauer hücreleri, villus içi bağ dokusu hücreleri ve fetal kapiller endotel hücreleri AQP9 immünoaktivitesi açısından incelenmiştir.

4.1.3.a. AQP9 Kontrol Grubu (Grup 1)

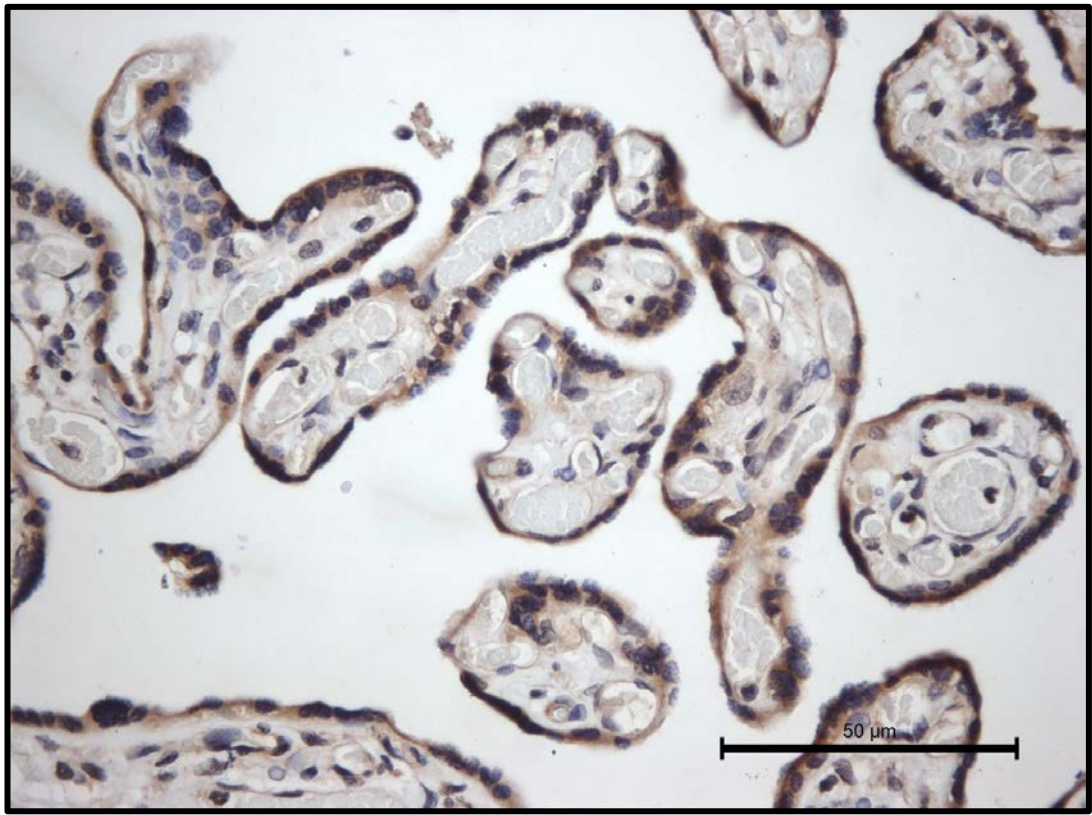
Kontrol grubundan alınan örneklerde koryon villuslarında AQP9 ile immunoreaktivite gösteren hücreler görüldü. Sinsityotrofoblast hücrelerinde kuvvetli sitoplazmik immunoreaktivite ve yer yer nükleer immünoreaktivite izlendi. Hofbauer hücreleri ve fetal kapiller endotelinde de sitoplazmik ve sinsityotrofoblastlara benzer şiddette bir boyanma gözlemlendi. İmmünoreaktivitenin sitoplazmada homojen bir dağılım gösterdiği izlendi. Villus içi bağ dokusu hücreleri diğer yapılardan farklı olarak daha düşük şiddette immunoreaktivite göstermekteydi ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.003$) (Şekil 4.1.3.a.1).



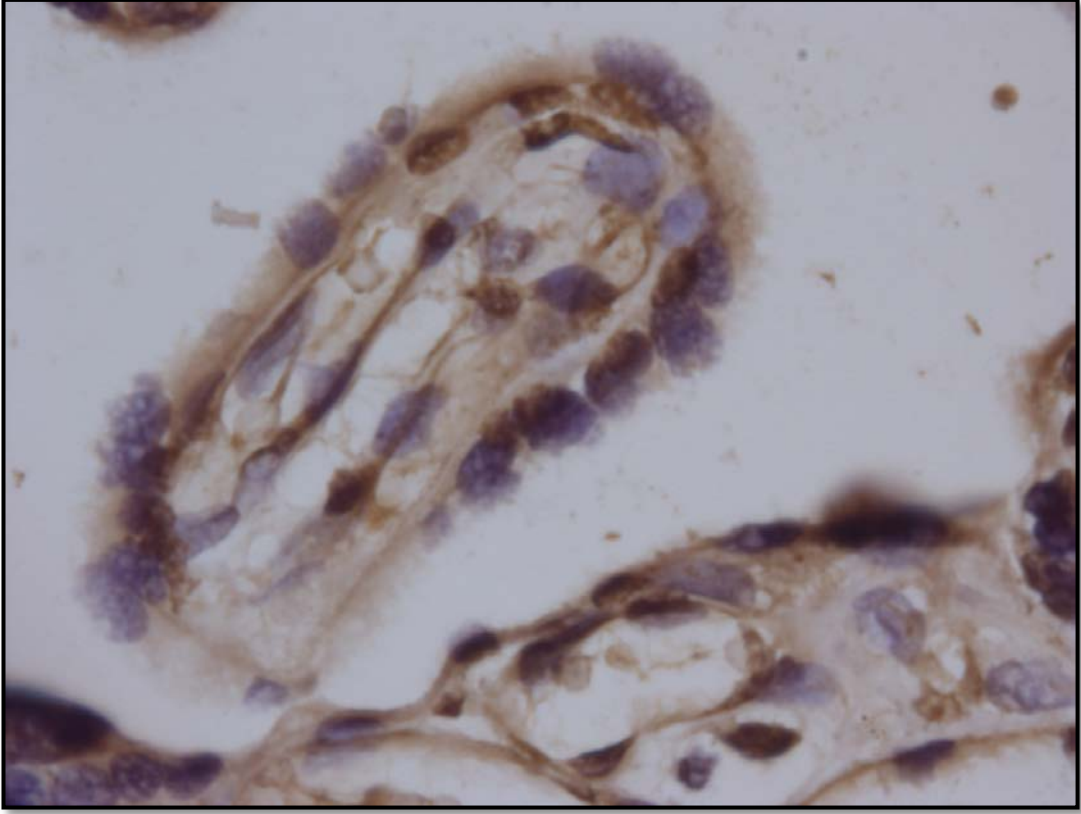
Şekil 4.1.3.a.1. AQP9 Kontrol Grubu; sinsityotrofoblast hücre tabakasında sitoplazmik ve nükleer immunoreaktivite, (ABC Yöntemi-Hematoksilen X400).

4.1.3.b. AQP9 İnsülinle Regüle GDM Grubu (Grup 2)

İnsülinle regüle GDM grubundan alınan örneklerde koryon villuslarında AQP9 ile immunoreaktivite gösteren hücreler görüldü. Sinsityotrofoblast hücrelerinde kuvvetli sitoplazmik immunoreaktivite izlendi. Hofbauer hücreleri ve fetal kapiller endotelinde de sitoplazmik ve sinsityotrofoblast hücrelerine benzer şiddette bir boyanma gözlemlendi. İmmünoreaktivitenin sitoplazmada homojen bir dağılım gösterdiği izlendi. Villus içi bağ dokusu hücreleri diğer yapılardan farklı olarak daha düşük şiddette immunoreaktivite göstermekteydi (Şekil 4.1.3.b.1.).



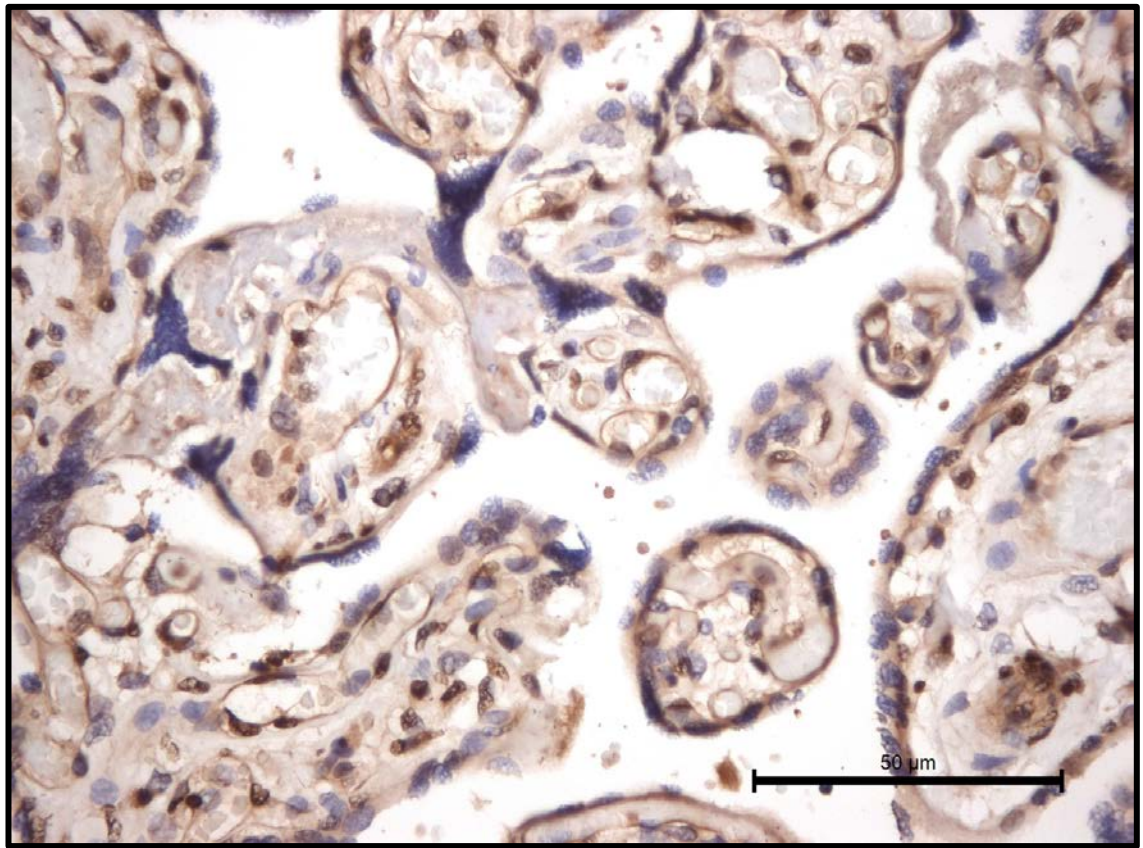
Şekil 4.1.3.b.1. AQP9 İnsülin Grubu; (ABC Yöntemi-Hematoksilen X400).



Şekil 4.1.3.b.2. İnsülin ile regüle GDM grubu; Sinsityotrofoblast hücre tabakasında bazale lokalize olmuş AQP9 immünoreaktivitesi ve villus içi bağ dokusu hücrelerinde yoğun sitoplazmik immünoreaktivite, (ABC Yöntemi, Hematoksilen X1000).

4.1.3.c. AQP9 Diyetle Regüle GDM Grubu (Grup 3)

Diyetle regüle GDM grubundan alınan örneklerde koryon villuslarında AQP9 ile immunreaktivite gösteren hücreler görüldü. Sinsityotrofoblastlar ve fetal kapiller endotel hücrelerinin kuvvetli immunreaktivite gösterdiği izlendi. Sinsityotrofoblastlarda immunreaktiviteninin yer yer bazale lokalize olduğu gözlemlendi. Hofbauer hücreleri de şiddetli sitoplazmik immunreaktivite göstermekteydi. Villus içi bağ dokusu hücreleri ise orta ve zayıf şiddette immunreaktivite göstermekteydi (Şekil 4.1.3.c.1.).



Şekil 4.1.3.c.1. AQP9 Diyet Grubu; sinsityotrofoblast hücre tabakasında bazalde yoğunlaşan immunreaktivite gözlenmekte, (ABC Yöntemi-Hematoksilen X400).

4.2. İstatistik Bulguları

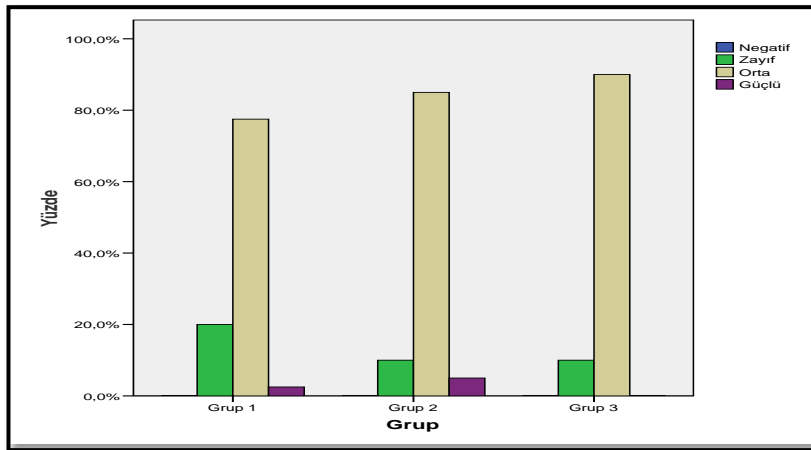
Çalışmada nitel veriler için sayı ve yüzde kullanıldı. Üç grupta boyanma yoğunluğu, şiddeti ve yüzdesinin karşılaştırmada Çapraz Tablo analizlerinden Ki-kare testi, koşullu Ki-kare testi ve Fisher Kesin testi kullanıldı. İstatistiksel analizlerin tümünde $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4.2.1. AQP8 İstatistik Bulguları

- Sinsityotroblastlarda AQP8 ekspresyonu, immünoreaktivitenin şiddeti ya da sayısal yüzdesi açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermedi ($p > 0.05$).

Tablo 4.2.1.1. AQP8 eksprese eden sinsityotroblast hücrelerinin immünoreaktivite şiddetleri

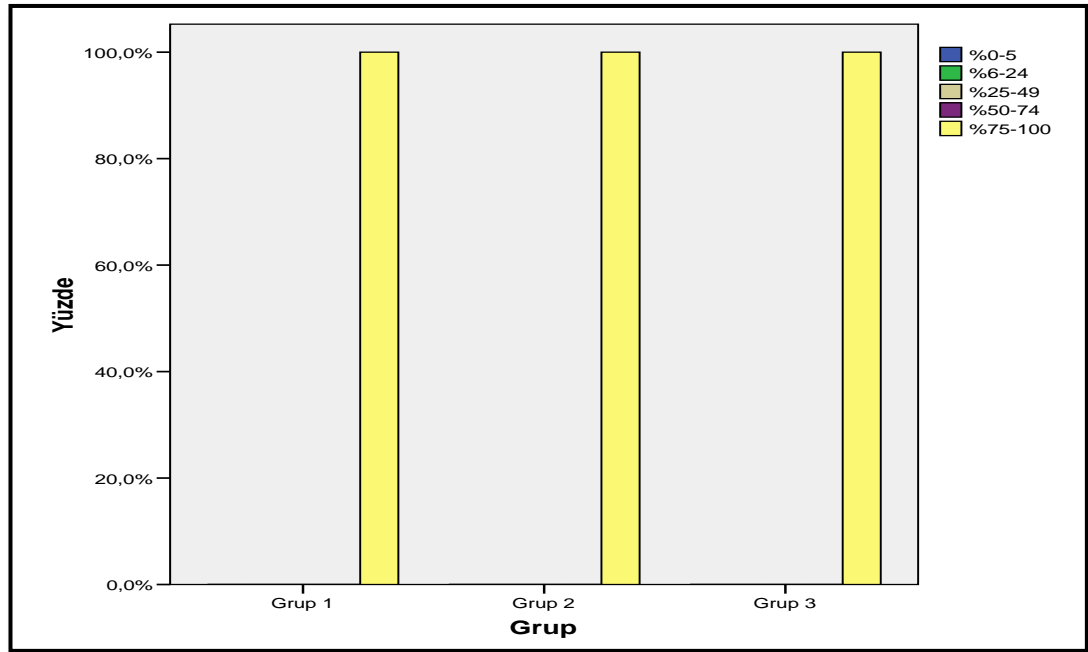
		Sinsityotroblast/şiddet			Toplam	
		zayıf	orta	güçlü		
Grup	Grup1	Sayı	8	31	1	40
		% within Grup	20,0%	77,5%	2,5%	100,0%
	Grup2	Sayı	2	17	1	20
		% within Grup	10,0%	85,0%	5,0%	100,0%
	Grup3	Sayı	5	45	0	50
		% within Grup	10,0%	90,0%	,0%	100,0%
Toplam		Sayı	15	93	2	110
		% within Grup	13,6%	84,5%	1,8%	100,0%



Grafik 4.2.1.1. Gruplara ait sinsityotroblastların AQP8 immünoreaktivite şiddetleri.

Tablo 4.2.1.2. AQP8 immünoaktivitesi gösteren sinsityotrofoblast hücrelerinin sayıları.

			Sinsityotrofoblast yüzde %75-100	Toplam
Grup	Grup 1	Sayı	40	40
		% Grup içi	100,0%	100,0%
	Grup 2	Sayı	20	20
		% Grup içi	100,0%	100,0%
	Grup 3	Sayı	50	50
		% Grup içi	100,0%	100,0%
Toplam		Sayı	110	110
		% Grup içi	100,0%	100,0%

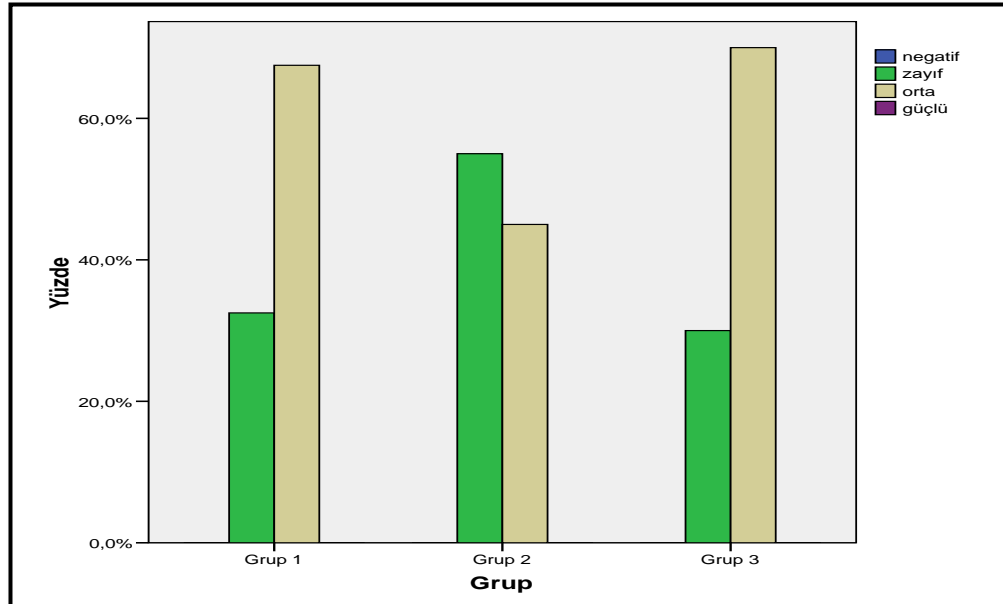


Grafik 4.2.1.2. AQP8 eksprese eden sinsityotrofoblast hücrelerinin sayısal değerleri.

- Hofbauer hücreleri, insülinle regüle GDM grubunda (Grup 2) immünoreaktivite gösteren hücre sayısı açısından anlamlı olarak farklıydı ($p < 0.05$). immünoreaktivite şiddeti açısından hofbauer hücreleri gruplar arasında anlamlı bir fark göstermedi ($p > 0.05$).

Tablo 4.2.1.3. AQP8 eksprese eden Hofbauer Hücrelerinin immünoreaktivite şiddetleri

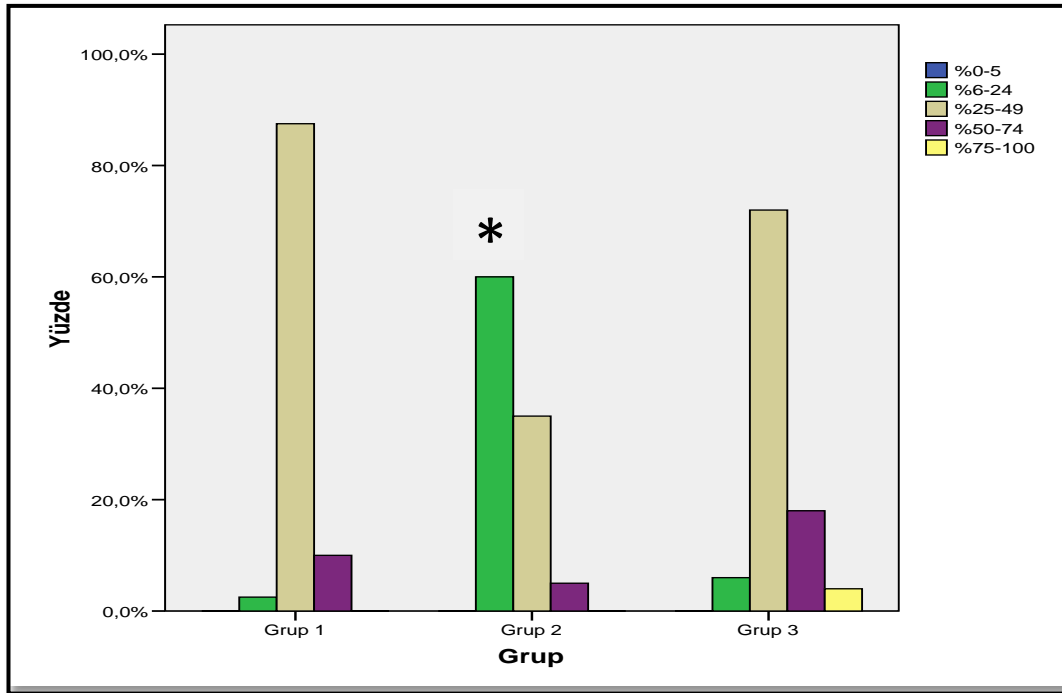
			Hofbauer hücresi/ şiddet				Toplam
			%6-24	%25-49	%50-74	%75-100	
Grup 1	Sayı	1	35	4	0	40	
	% Grup içi	2,5%	87,5%	10,0%	,0%	100,0%	
Grup 2	Sayı	12	7	1	0	20	
	% Grup içi	60,0%	35,0%	5,0%	,0%	100,0%	
Grup 3	Sayı	3	36	9	2	50	
	% Grup içi	6,0%	72,0%	18,0%	4,0%	100,0%	
Toplam	Sayı	16	78	14	2	110	
	% Grup içi	14,5%	70,9%	12,7%	1,8%	100,0%	



Grafik 4.2.1.3. AQP8 eksprese eden hofbauer hücrelerinin immünoreaktivite şiddetleri.

Tablo 4.2.1.4. AQP8 immünoaktivitesi gösteren Hofbauer Hücrelerinin sayıları.

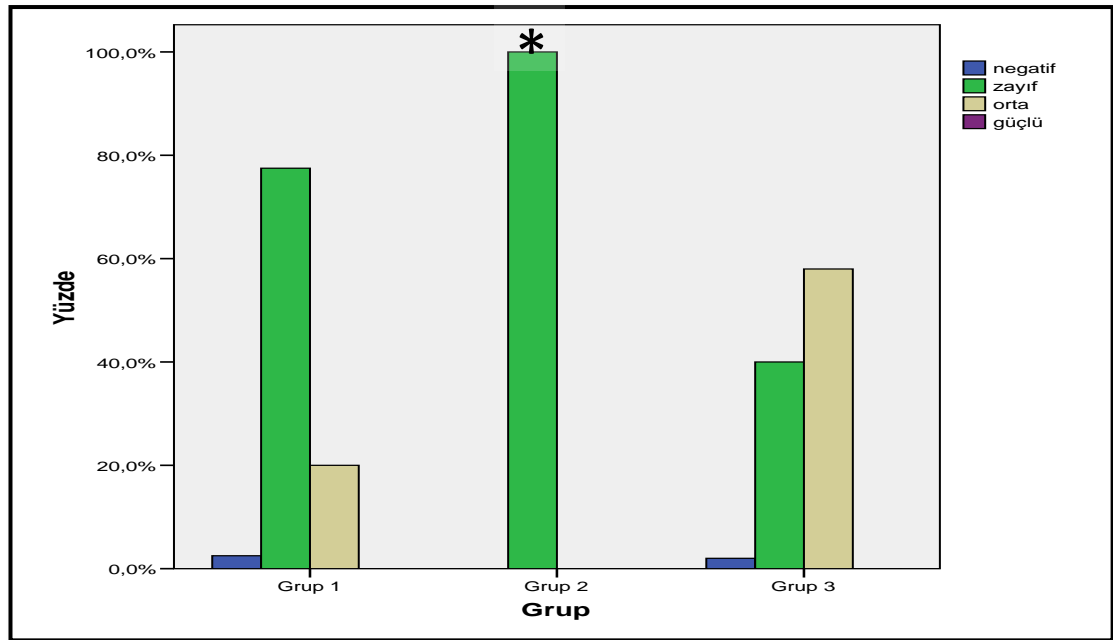
			Hofbauer hücresi/yüzde				Toplam
			%6-24	%25-49	%50-74	%75-100	%6-24
Grup 1	Grup	Sayı	1	35	4	0	40
		% Grup içi	2,5%	87,5%	10,0%	,0%	100,0%
Grup 2	Grup	Sayı	12	7	1	0	20
		% Grup içi	60,0%	35,0%	5,0%	,0%	100,0%
Grup 3	Grup	Sayı	3	36	9	2	50
		% Grup içi	6,0%	72,0%	18,0%	4,0%	100,0%
Toplam	Grup	Sayı	16	78	14	2	110
		% Grup içi	14,5%	70,9%	12,7%	1,8%	100,0%

**Grafik 4.2.1.4.** AQP8 eksprese eden Hofbauer hücrelerinin sayısal değerleri.

- Villus içi bağ dokusu hücrelerinde; insülinle regüle GDM grubunda (Grup 2) immünoreaktivitenin şiddeti açısından anlamlı olarak farklıydı ($p < 0.001$) hücreler her üç grupta da sayısal olarak yakın değerlere sahiptiler ve aralarında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Tablo 4.2.1.5. AQP8 eksprese eden Villus İçi Bağ Dokusu Hücrelerinin immünoreaktivite şiddetleri

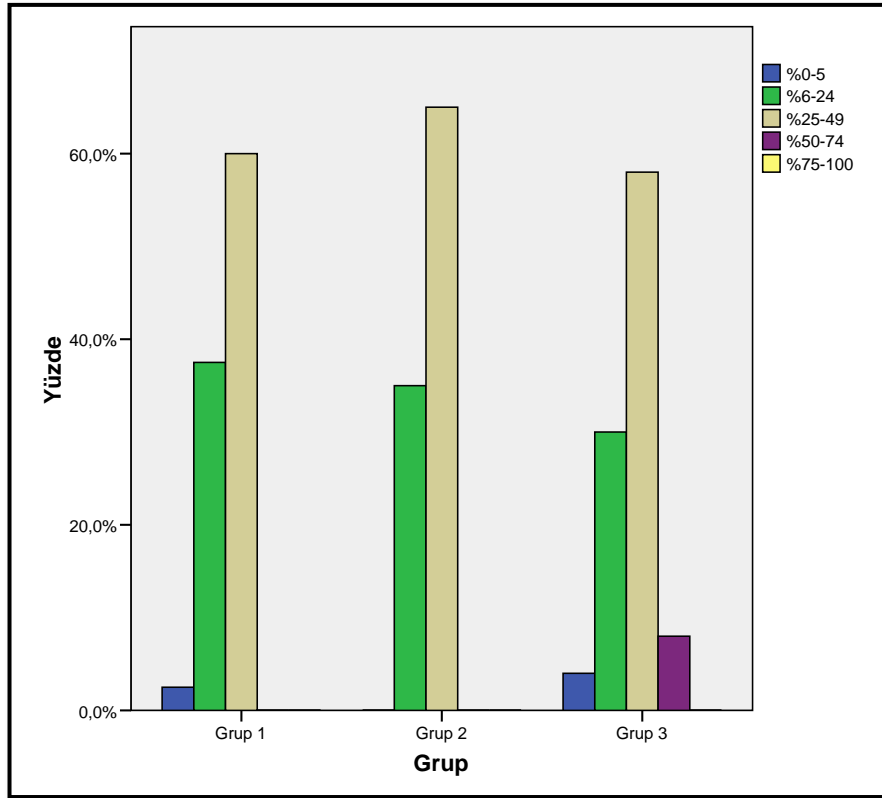
	Stromal hücre/şiddet			Toplam	
	yok	zayıf	orta	yok	
Grup 1	Sayı	1	31	8	40
	% Grup içi	2,5%	77,5%	20,0%	100,0%
Grup 2	Sayı	0	20	0	20
	% Grup içi	,0%	100,0%	,0%	100,0%
Grup 3	Sayı	1	20	29	50
	% Grup içi	2,0%	40,0%	58,0%	100,0%
Total	Sayı	2	71	37	110
	% Grup içi	1,8%	64,5%	33,6%	100,0%



Grafik 4.2.1.5. Gruplara ait villus içi bağ dokusu hücrelerinin AQP8 immünoreaktivite şiddetleri.

Tablo 4.2.1.6. AQP8 immünoaktivitesi gösteren villus içi bağ dokusu hücrelerinin sayıları.

			Stromal hücre/yüzde				Toplam
			%0-5	%6-24	%25-49	%50-74	%0-5
Grup	Grup	Sayı	1	15	24	0	40
	1	% Grup içi	2,5%	37,5%	60,0%	,0%	100,0%
	Grup	Sayı	0	7	13	0	20
	2	% Grup içi	,0%	35,0%	65,0%	,0%	100,0%
	Grup	Sayı	2	15	29	4	50
	3	% Grup içi	4,0%	30,0%	58,0%	8,0%	100,0%
Toplam		Sayı	3	37	66	4	110
		% Grup içi	2,7%	33,6%	60,0%	3,6%	100,0%

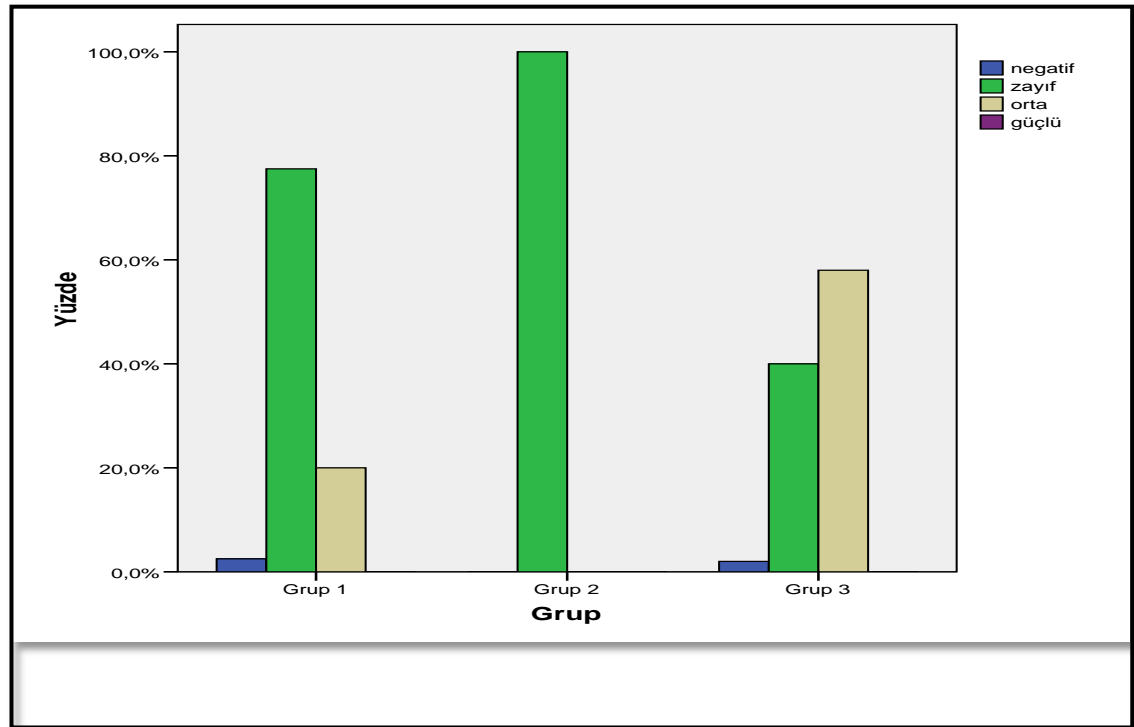


Grafik 4.2.1.6. AQP8 eksprese eden villus içi bağ dokusu hücrelerinin sayısal değerleri.

- Fetal kapiller endotel hücrelerinde immünoaktivitenin şiddeti ve sayısal yoğunluğu, diyetle regüle GDM grubunda (Grup 3) diğer gruplardan anlamlı olarak farklıydı ($p=0.005$, $p<0.001$).

Tablo 4.2.1.7. AQP8 eksprese eden Fetal Kapiller Endotel Hücrelerinin immünoaktivite şiddetleri.

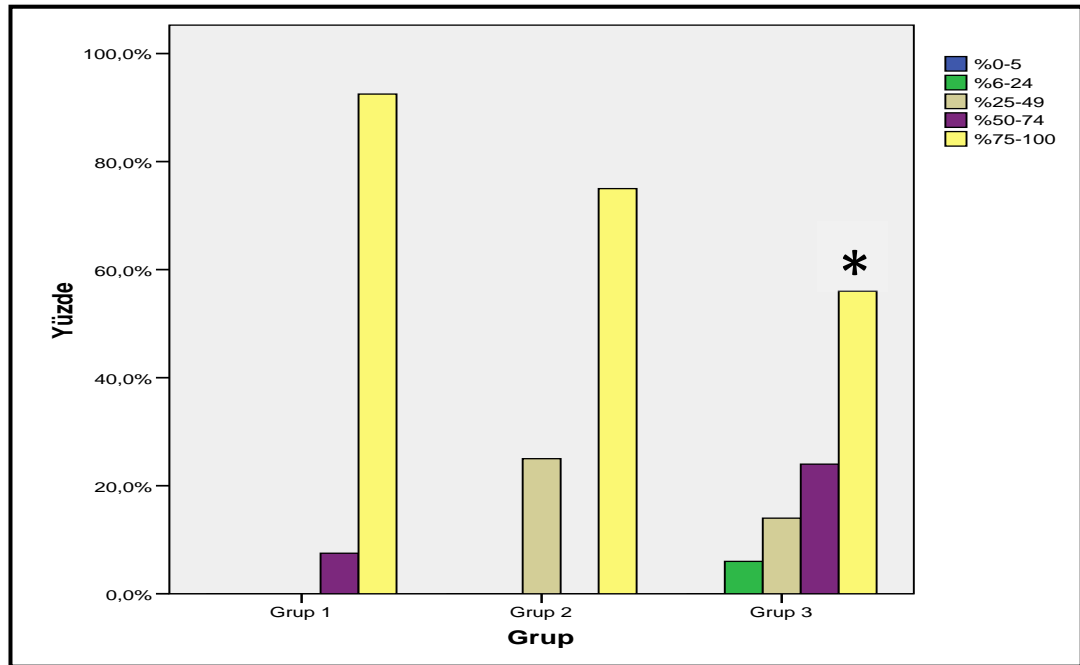
			Endotel hücresi/şiddet			Toplam
			zayıf	orta	güçlü	
Grup	Grup 1	Sayı	11	28	1	40
		% Grup içi	27,5%	70,0%	2,5%	100,0%
	Grup 2	Sayı	10	10	0	20
		% Grup içi	50,0%	50,0%	,0%	100,0%
	Grup 3	Sayı	6	44	0	50
		% Grup içi	12,0%	88,0%	,0%	100,0%
Toplam		Sayı	27	82	1	110
		% Grup içi	24,5%	74,5%	,9%	100,0%



Grafik 4.2.1.7. Gruplara ait fetal kapiller endotel hücrelerinin AQP8 immünoaktivite şiddetleri.

Tablo 4.2.1.8. AQP8 immünoaktivitesi gösteren fetal kapiller endotel hücrelerinin sayıları.

			Endotel hücresi/yüzde				toplam
			%6-24	%25-49	%50-74	%75-100	
Grup	Grup	Sayı	0	0	3	37	40
	1	% Grup içi	,0%	,0%	7,5%	92,5%	100,0%
	Grup	Sayı	0	5	0	15	20
	2	% Grup içi	,0%	25,0%	,0%	75,0%	100,0%
	Grup	Sayı	3	7	12	28	50
	3	% Grup içi	6,0%	14,0%	24,0%	56,0%	100,0%
Toplam		Sayı	3	12	15	80	110
		% Grup içi	2,7%	10,9%	13,6%	72,7%	100,0%



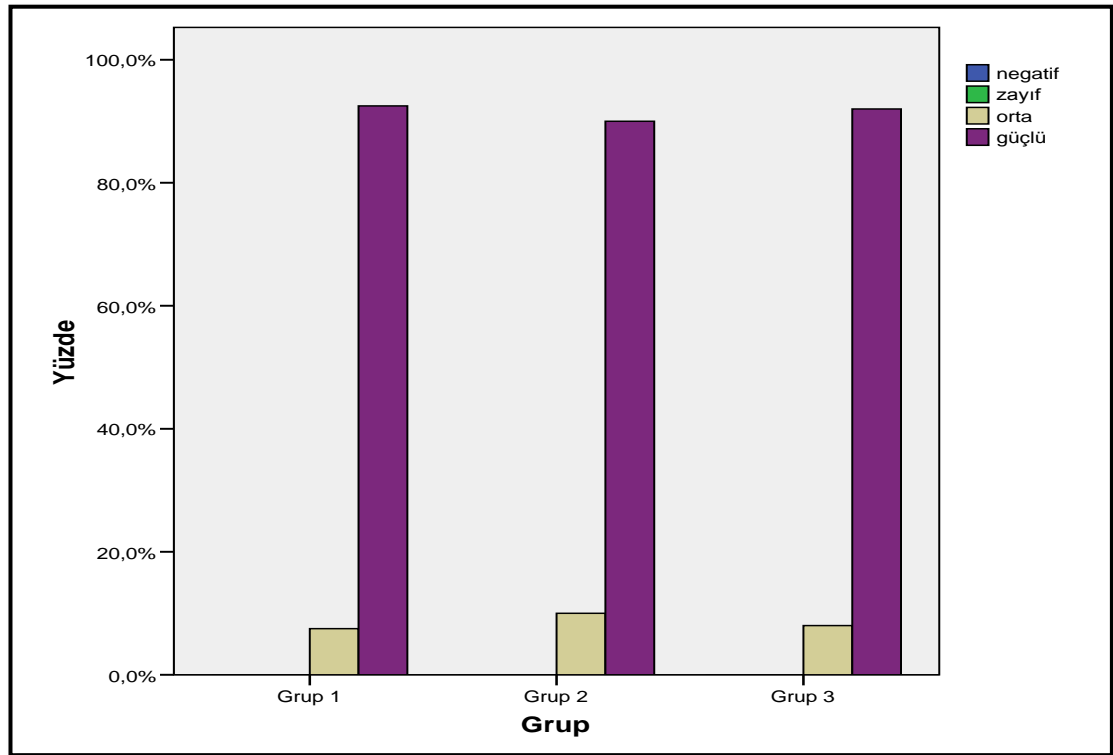
Grafik 4.2.1.8. AQP8 eksprese eden fetal kapiller endotel hücrelerinin sayısal değerleri.

4.2.2. AQP9 İstatistik Bulguları

AQP9 immünoaktivitesi için yapılan istatistiksel analizlerde, immünoaktivitenin şiddeti ve sayısal yüzdeleri açısından sinsityotrofoblast hücrelerinde, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 4.2.2.1. AQP9 eksprese eden sinsityotrofoblast hücrelerinin immunoreaktivite şiddetleri

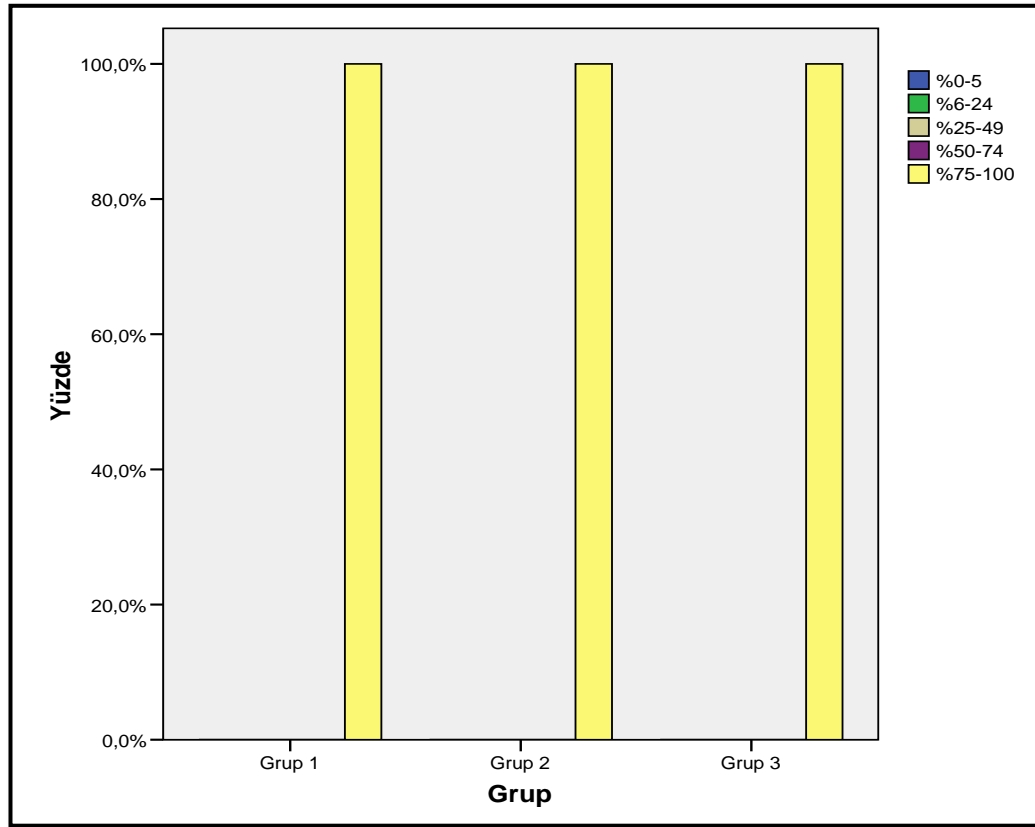
			Sinsityotrofoblast/şiddet		Toplam
			orta	güçlü	
Grup	Grup 1	Sayı	3	37	40
		% Grup içi	7,5%	92,5%	100,0%
	Grup 2	Sayı	2	18	20
		% Grup içi	10,0%	90,0%	100,0%
	Grup 3	Sayı	4	46	50
		% Grup içi	8,0%	92,0%	100,0%
Toplam		Sayı	9	101	110
		% Grup içi	8,2%	91,8%	100,0%



Grafik 4.2.2.1. Gruplara ait sinsityotrofoblast hücrelerinin immunoreaktivite şiddetleri.

Tablo 4.2.2.2. AQP9 immünoaktivitesi gösteren sinsityotrofoblast hücrelerinin sayıları.

			Sinsityotrofoblast/şiddet	Toplam
			%75-100	
Grup	Grup 1	Sayı	40	40
		% Grup içi	100,0%	100,0%
	Grup 2	Sayı	20	20
		% Grup içi	100,0%	100,0%
	Grup 3	Sayı	50	50
		% Grup içi	100,0%	100,0%
Toplam		Sayı	110	110
		% Grup içi	100,0%	100,0%

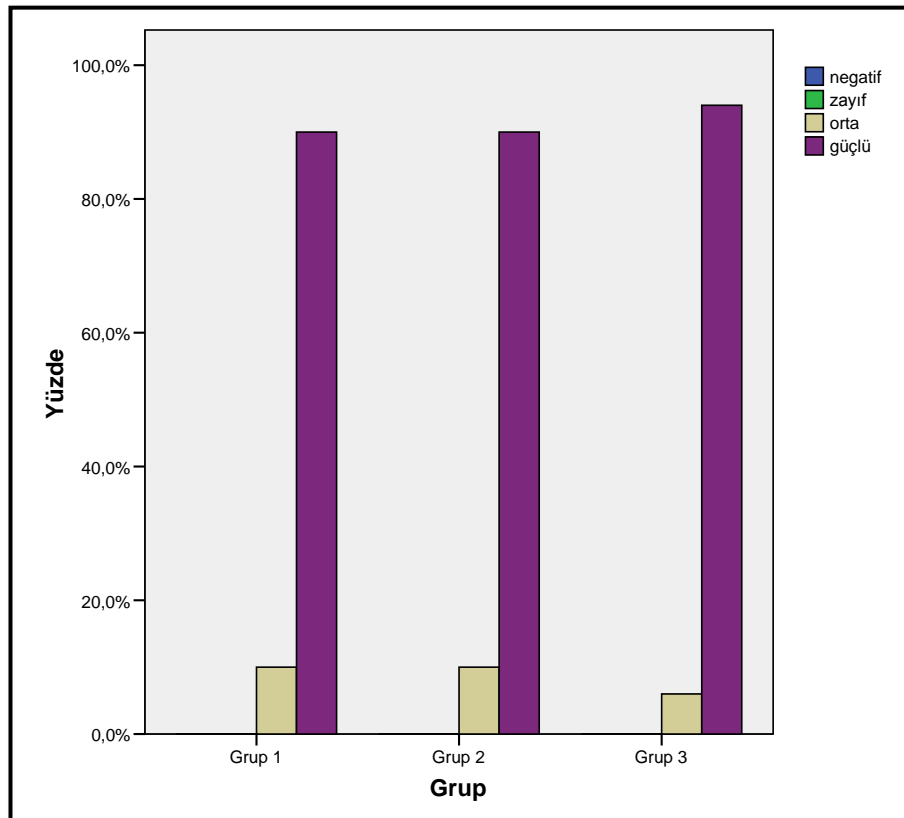


Grafik 4.2.2.2. AQP9 eksprese eden sinsityotrofoblast hücrelerinin sayısal değerleri.

- AQP9 immünoreaktivitesi için yapılan istatistiksel analizlerde, immünoreaktivitenin şiddeti ve sayısal yüzdeleri açısından Hofbauer hücrelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 4.2.2.3. AQP9 eksprese eden Hofbauer Hücrelerinin immünoreaktivite şiddetleri.

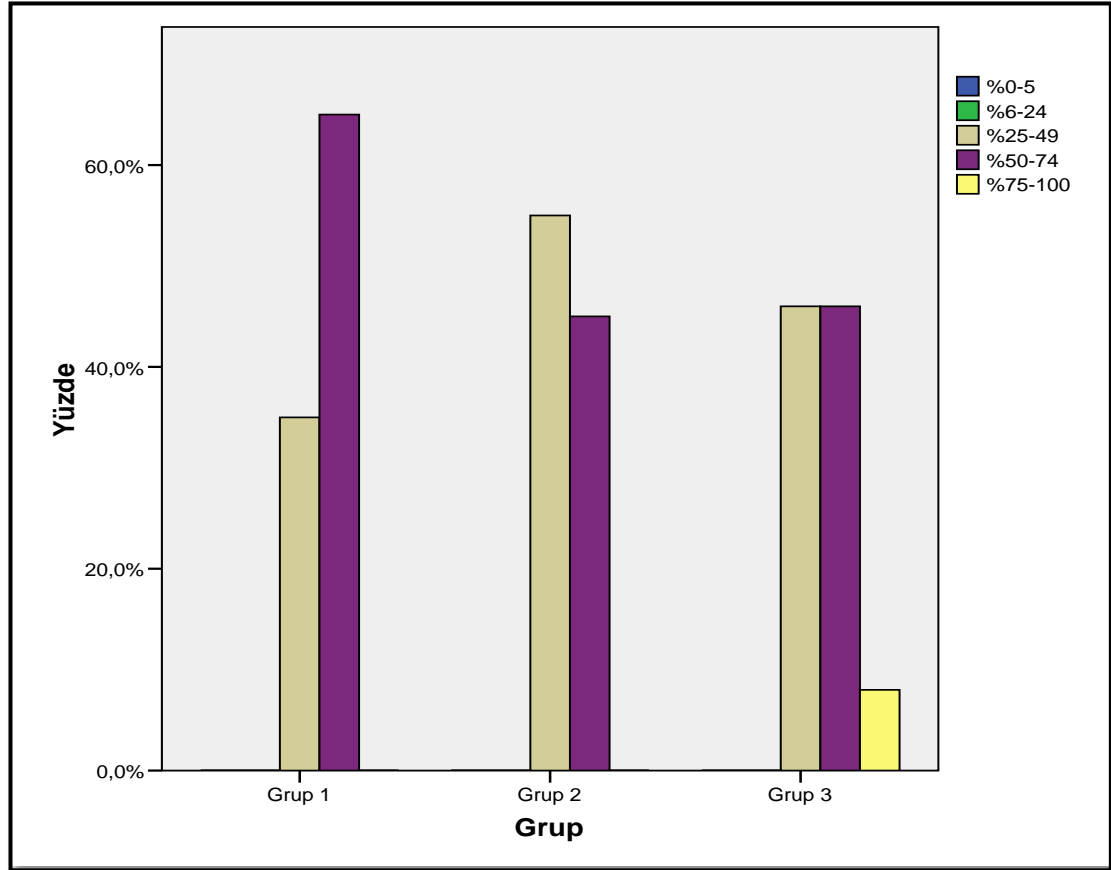
			Hofbauer hücresi/şiddet		Toplam
			orta	güçlü	
Grup	Grup 1	Sayı	4	36	40
		% Grup içi	10,0%	90,0%	100,0%
	Grup 2	Sayı	2	18	20
		% Grup içi	10,0%	90,0%	100,0%
	Grup 3	Sayı	3	47	50
		% Grup içi	6,0%	94,0%	100,0%
Toplam		Sayı	9	101	110
		% Grup içi	8,2%	91,8%	100,0%



Grafik 4.2.2.3. Gruplara ait Hofbauer hücrelerinin AQP9 immünoreaktivite şiddetleri.

Tablo 4.2.2.4. AQP9 immünoaktivitesi gösteren Hofbauer hücrelerinin sayıları.

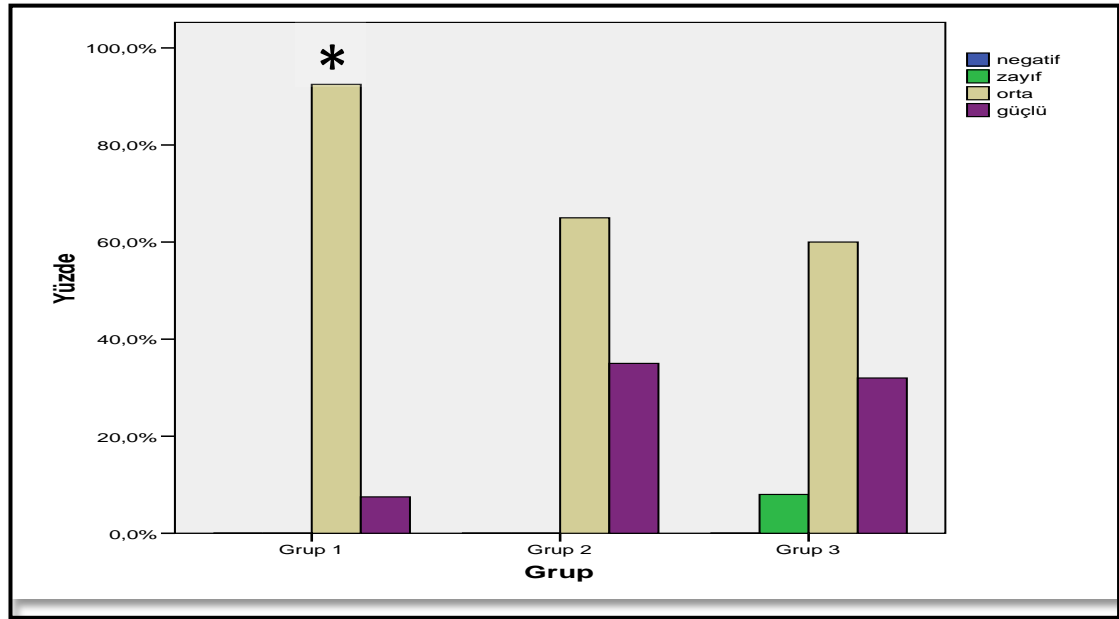
			Hofbauer hücresi/yüzde			Toplam
			%25-49	%50-74	%75-100	
Grup 1	Sayı	14	26	0	40	
	% Grup içi	35,0%	65,0%	,0%	100,0%	
Grup 2	Sayı	11	9	0	20	
	% Grup içi	55,0%	45,0%	,0%	100,0%	
Grup 3	Sayı	23	23	4	50	
	% Grup içi	46,0%	46,0%	8,0%	100,0%	
Toplam	Sayı	48	58	4	110	
	% Grup içi	43,6%	52,7%	3,6%	100,0%	

**Grafik 4.2.2.4.** AQP9 eksprese eden Hofbauer hücrelerinin sayısal değerleri.

- Villus içi bağ dokusu hücrelerinde; immünoreaktivitenin şiddeti açısından kontrol grubu (grup 1) diğer gruplardan anlamlı olarak farklıydı (p=0.003).

Tablo 4.2.2.5. AQP9 eksprese eden villus içi bağ dokusu hücrelerinin immünoreaktivite şiddetleri.

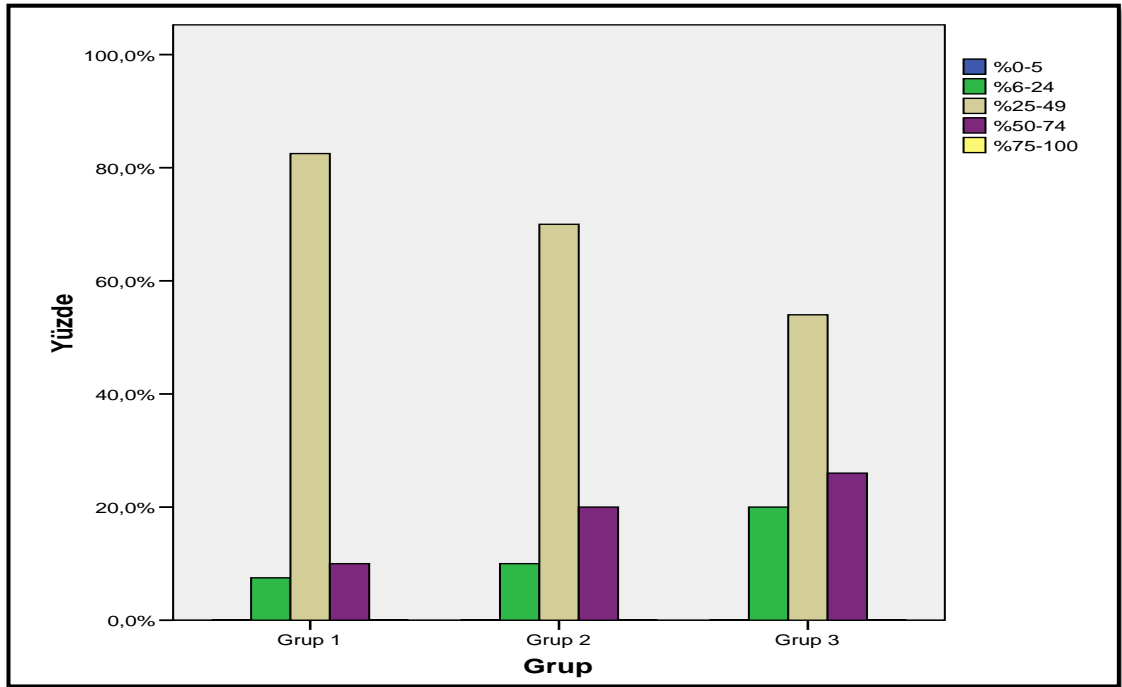
			Stromal hücre/şiddet			Toplam
			zayıf	orta	güçlü	
Grup 1	Sayı		0	37	3	40
	% Grup içi		,0%	92,5%	7,5%	100,0%
Grup 2	Sayı		0	13	7	20
	% Grup içi		,0%	65,0%	35,0%	100,0%
Grup 3	Sayı		4	30	16	50
	% Grup içi		8,0%	60,0%	32,0%	100,0%
Toplam	Sayı		4	80	26	110
	% Grup içi		3,6%	72,7%	23,6%	100,0%



Grafik 4.2.2.5. Gruplara ait villus içi bağ dokusu hücrelerinin immünoreaktivite şiddetleri.

Tablo 4.2.2.6. AQP9 immunoreaktivitesi gösteren villus içi bağ dokusu hücrelerinin sayıları.

			Stromal hücre/yüzde			Toplam
			%6-24	%25-49	%50-74	
Grup 1	Sayı		3	33	4	40
	% Grup içi		7,5%	82,5%	10,0%	100,0%
Grup 2	Sayı		2	14	4	20
	% Grup içi		10,0%	70,0%	20,0%	100,0%
Grup 3	Sayı		10	27	13	50
	% Grup içi		20,0%	54,0%	26,0%	100,0%
Toplam	Sayı		15	74	21	110
	% Grup içi		13,6%	67,3%	19,1%	100,0%

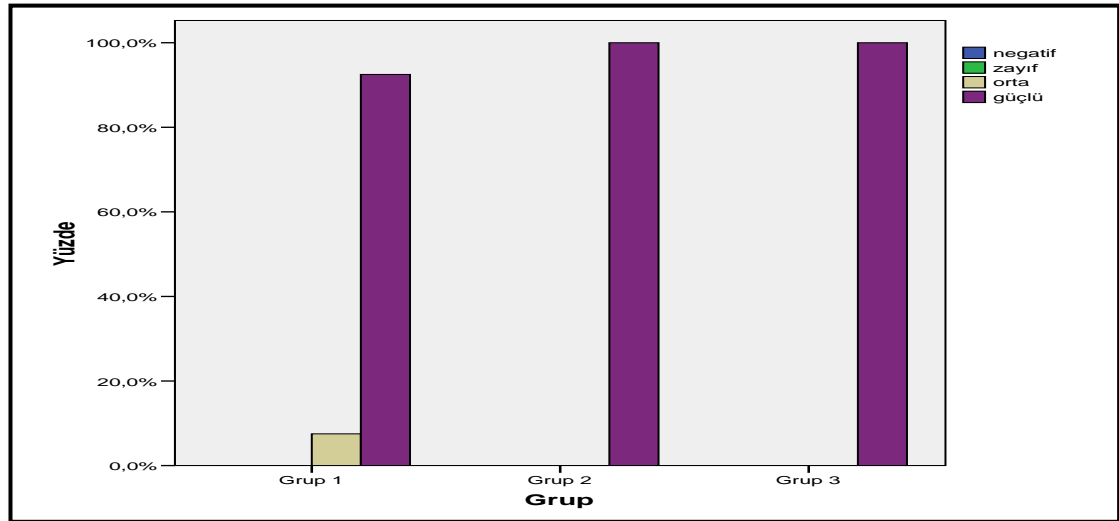


Grafik 4.2.2.6. AQP9 eksprese eden villus içi bağ dokusu hücrelerinin sayısal değerleri.

- İmmunoreaktivitenin şiddeti ve sayısal yüzdeleri açısından fetal kapiller endotel hücrelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 4.2.2.7. AQP9 eksprese eden fetal kapiller endotel hücrelerinin immunoreaktivite şiddetleri.

			Endotel/şiddet		Toplam
			orta	güçlü	
Grup	Grup 1	Sayı	3	37	40
		% Grup içi	7,5%	92,5%	100,0%
	Grup 2	Sayı	0	20	20
		% Grup içi	,0%	100,0%	100,0%
	Grup 3	Sayı	0	50	50
		% Grup içi	,0%	100,0%	100,0%
Toplam		Sayı	3	107	110
		% Grup içi	2,7%	97,3%	100,0%



Grafik 4.2.2.7. Gruplara ait fetal kapiller endotel hücrelerinin AQP9 immunoreaktivite şiddetleri.

Tablo 4.2.2.8. AQP9 immunoreaktivitesi gösteren fetal kapiller endotel hücrelerinin sayıları

			Endotel/yüzde %75-100	Toplam
Grup	Grup 1	Sayı	40	40
		% Grup içi	100,0%	100,0%
	Grup 2	Sayı	20	20
		% Grup içi	100,0%	100,0%
	Grup 3	Sayı	50	50
		% Grup içi	100,0%	100,0%
Toplam	Sayı		110	110
	% Grup içi		100,0%	100,0%



Grafik 4.2.2.8. AQP9 eksprese eden fetal kapiller endotel hücrelerinin sayısal değerleri.

5. TARTIŞMA

Akuaporinler bugün artık suyun yanında, yüksüz solütlere [2, 3] ve yüklü solütlere de [110, 111] geçirgen olduğu bilinen proteinlerdir. AQP8'in su yanında amonyum iyonu gibi yüklü moleküllere de geçirgen olduğu bilinmektedir [111]. AQP9 ise suyun yanında yüksüz moleküllere de geçirgendir ve bir akuagliseroprin olarak bilinir [112]. AQP8 ve AQP9'un plasentada sinsityotrofoblast hücrelerinde eksprese olduğu farklı gruplar tarafından bildirilmektedir [19, 109]. Damiano ve ark. preeklampitik plasentalarda yaptığı çalışmasında AQP9 kanalının geçirgenliğinin ekspresyonundan bağımsız olarak değiştirebildiğini, kanalın üre geçirgenliğinde anlamlı bir artış olduğunu gösterdi. Bu bilgi AQP9'un tanımını 'patolojik koşullarda ekspresyonunun yanında molekül yapısını da değiştirebilen bir akuagliseroprin' haline getirdi. Parodi ve ark. normal plasental eksplant kültürlerinde yaptıkları çalışmada insülin uygulamasının AQP9 ekspresyonunu azalttığını gösterdiler [6]. Aynı araştırmacı grubu, kültür ortamına insülin uygulaması öncesi TNF alfa uyguladığında insülinin yarattığı bu etkinin oluşmadığını gözlemledi. TNF alfa insülinin etkilerinin reseptör düzeyinde bloke eden, dolayısıyla reseptör düzeyinde insülin rezistansı meydana getiren bir moleküldür[22].

Gebelik, fizyolojik olarak diyabete yatkınlık yaratan bir durumdur. İlk ve ikinci trimesterin başlarında artan östrojen seviyeleri sebebiyle insüline duyarlılık artarken daha sonraları plasentadan salınan human plasental laktojen (hPL), kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH), prolaktin (PRL) ve kortizol etkisiyle periferik bir insülin rezistansı oluşmaktadır. Buradaki amaç fetusa daha fazla glukoz desteği sağlamaktır. [49].

Çalışmamızda diyetle regüle ya da insulinle regüle GDM hastalarının sinsityotrofoblast tabakasında AQP8 ve AQP9 ekspresyonu, kontrol gruplarıyla benzer bir dağılım gösterdi.

Bu bilgiler göz önüne alındığında, çalışmamızda kullandığımız gestasyonel diyabeti olan ve kan glukoz seviyeleri diyetle ya da insülinle regüle edilmiş dolayısıyla insülin rezistansının da kırılmış olduğu kabul edilen hastalarda AQP'lerin immünohistokimyasal ifadelerinin kontrol grubuyla benzer özellik göstermesi beklenmelidir ki sonuçlarımız da bu yöndedir.

Damiano ve ark. preeklampitik plasentalarla yaptığı çalışmada, AQP9 kanalının membran ekspresyonunun kontrol grubundan anlamlı bir farklılık göstermediği ancak kanalın üre geçirgenliğinde kontrol grubuna göre artış olduğunu bildirdiler [6]. Böyle bir fonksiyon değişikliği diyabetik plasentalar için de söz konusu olabilir. Bunun için immünohistokimya çalışmalarının yanında kanal geçirgenliğini de ölçen fonksiyon deneyleri de yapılmalıdır.

Akuaporinlerin plasentadaki rolleri, günümüzde halen farklı birçok grup tarafından çalışılan ve regülasyon mekanizmaları henüz tam anlaşılammış bir konudur. Ancak karaciğer ve yağ dokusunda AQP9 ve AQP7 nin enerji metabolizmasında belirgin roller üstlendiğine dair birçok veri mevcuttur.

Yağ dokusu enerji homeostazının devamı için açlık anında enerji desteğinde önemli bir rol oynar. Bunu da mevcut depo trigliseridlerini yıkıp dolaşıma yağ asidi ve gliserol sağlayarak gerçekleştirir. Dolaşıma geçen gliserol karaciğer tarafından alınır ve glukoneogenez ile enerji üretiminde kullanılacak form olan glukozu çevrilir. İşte bu işlem sırasında yağ dokusunda gliserolün kana geçişi AQP7 ile , kandan hepatosite geçişi ise AQP9 ile gerçekleşir. Beslenme sonrası ise yükselen kan şekeri seviyeleri sonucu yağ yıkımı durur(lipoliz) ve yağ yapımı başlar(lipogenez). Yağ dokusunda AQP7 mRNA seviyeleri azalırken, hepatositte AQP9 seviyeleri de dolaşımdaki gliserolün azalması sebebiyle baskılanır[113].

Uzamsız açlıkla periferik insülin rezistansı prensip olarak birbirine benzetilebilir. Uzun süreli açlıkta kan şekeri düşük olması sebebiyle dokulara yeterli glukoz sağlanamaz ve lipoliz oluşur. Periferik insülin rezistansında ise kan şekeri yüksektir ancak direnç sebebiyle dokular bu yüksek glukozdan faydalanamıyordu. İşte bu noktada plasental akuaporinler de tıpkı karaciğerdeki AQP9 gibi lipoliz sonucu oluşan gliserolü fetal dolaşıma katmak için bir gliserol kanalı gibi işlev görüyor olabilir.

GDM'de fetal hiperglisemi fetal hiperinsülinemiye yol açar[26]. Fetusun artmış insülin seviyeleri de plasental AQP8 ve AQP9 seviyelerini etkiliyor olabilir. Çalışmamızda sinsityotrofoblast hücre tabakasındaki immunoreaktivitenin çoğunlukla bazale lokalize olduğunu gözlemledik. Sinsityotrofoblast hücrelerinin bazal membranı villus içi bağ dokusuyla temas haldedir yani fetal kapillerlere bakan membran yüzüdür. Diyabetik plasentalarda villus içi ödem olmasından dolayı AQP8

ve AQP9 kanalları villus içindeki bu mevcut su fazlasını ortamdaki uzaklaştırmak için çoğunlukla bazale lokalize olmuş olabilirler.

Yaptığımız çalışmada; GDM hastalığında da AQP8 ve AQP9 ekspresyonlarının var olduğu belirgindir. Ancak ekspresyonlarındaki değişimleri daha sağlıklı değerlendirmek adına tamamen sağlıklı bir kontrol grubunun yanına regüle olmayan GDM'ye sahip bir grup daha oluşturmak oldukça faydalı olacaktır. Günümüzde GDM özellikle büyükşehirlerde oldukça iyi taranan bir hastalık olmasına rağmen kırsal kesimlerde halen düşük oranlarda da olsa kontrol altında olmayan vakalar mevcuttur. Bu vakalar makrozomik bebek, anlık kan şekeri ölçümü ve eşlik eden polihidramniyosla tanımlanabilir ve böyle bir grup uzun vadede oluşturulabilir. Diğer taraftan normal plasental eksplant kültürleri yerine GDM'li plasental kültürler kurmak plasental AQP8 ve AQP9'un insülin ile olan ilişkisini gerçeğe daha yakın bir model üzerinde çalışma imkanı yaratacaktır.

İnsülin rezistansı reseptör ya da post reseptör düzeyinde olabilir. İnsülinin hücre içi etkilerinden en bilineni olan glukozun hücre içine taşınımını inositol trifosfat kinaz yolağı üzerinden gerçekleştirmektedir. Bu yolak aktifleştğinde sitozolde bulunan GLUT4 hücre membranına transloke olur ve glukozun kandan hücre içine alımı arttırılır. Aynı mekanizma yağ dokusunda AQP7 için mevcuttur. Lipoliz esnasında plazma insülin seviyesinin azalması adipositlerde gliserol üretimini arttırır, eş zamanlı olarak sitozolde bulunan AQP7 membrana taşınır ve hücre içinden kana gliserol taşınımı gerçekleşir[101]. Aynı mekanizma plasental AQP8 ve AQP9 içinde geçerli olabilir. Bunun için, bu yolakta görevli olan insülin reseptörlerinin (IR1-IR2) ve insülin reseptör substratlarının protein düzeyindeki ekspresyonları da AQP8 ve AQP9 ile eş zamanlı olarak bakılmalıdır.

Hofbauer hücrelerinin gebeliğin 4.-5. ayından sonra terme doğru plasental olgunlaşma sırasında villoz stromanın yoğunlaşmasına bağlı olarak sıkışmalar ve diğer villöz bağ dokusu hücrelerinden ayırt edilemezler. Ancak diyabet gibi villus içi bağ dokusunun daha gevşek olduğu patolojilerde kolaylıkla ayırt edilebilirler[114].

Hofbauer hücrelerinin, diğer işlevlerini yanı sıra, stromal sıvı dengesinin düzenlenmesinden rol oynadığı düşünülmektedir. Bu hücrelerin, intrasitoplazmik vakuelleri ve büyük lamelli podları ile villus stromasında bulunan fetal serum proteinlerini azalttığı, bu sayede gebeliğin erken döneminde plasental su dengesinin

düzenlenmesine katkı sağladığı düşünülmektedir. Bu görev, plasentanın interstisyel alandaki proteinleri kan damar sistemine döndürecek bir lenfatik sistemi olmamasından kaynaklanıyor olabilir[115, 116].

Peritoneal makrofajlarda bir akuagliseroprin olan AQP3 ekspresyonu gösterilmiştir. AQP3 geni çıkarılmış farelerde makrofajlarının fagositik aktivitelerinin bozulduğu, hücre içi gliserol, su ve glukoz miktarlarının azaldığı gösterilmiştir. AQP3 antikoru ile yapılan immünofloresan işaretlemede immunoreaktivitenin bir eritrositi fagosite edeceği tarafta oluşturduğu fagositik çukurda (cup) daha yoğun olduğu bildirilmektedir. [108].

Çalışmamızda Hofbauer hücrelerinde hem AQP8 hem de AQP9 ekspresyonu gösterilmiştir. Literatürde insan dokusunda bulunan Hofbauer hücrelerinde herhangi bir akuaporin ekspresyonuna dair bir çalışma bulunmamaktadır. Daha önce AQP molekülleriyle insan plasentasında birçok çalışma yapılmıştır ancak hiçbirisinde hofbauer hücrelerinde AQP ekspresyonu rapor edilmemiştir. Bu durum akuaporin çalışılan plasentaların term ve sağlıklı plasentalar olması ve bu sebeple bu hücrelerin spesifik olarak ayırt edilememesi ya da patolojik plasentaların patolojileri gereği villus içi ödeminin olmamasından kaynaklanıyor olabilir.

6. SONUÇLAR

1. Normal (Grup 1), insülinle regüle gestasyonel diyabetes mellituslu (Grup 2) ve diyetle regüle gestasyonel diyabetes mellituslu (Grup 3) gebe plasentalarında; sınıtyotrofoblast hücrelerinde AQP8 ve AQP9 ekspresyonu mevcuttu.
2. Sınıtyotrofoblast hücrelerindeki bu ekspresyon, şiddeti ve sayısal yoğunluğu açısından gruplar arasında benzerlik göstermekteydi.
3. Sınıtyotrofoblast hücre tabakasındaki ekspresyon yer yer hücre tabakasının bazaline lokalizasyon göstermekteydi.
4. Hofbauer hücre sayısı; insülinle regüle GDM grubunda, AQP8 ekspresyonu açısından diğer iki gruptan daha azdı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı.
5. Villus içi bağ dokusu insülinle regüle GDM grubunda, diğer gruplardan daha zayıf bir AQP8 immunoreaktivitesine sahipti ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı.
6. Fetal kapiller endotel hücreleri diyetle regüle GDM grubunda, diğer gruplardan daha az sayıda ve daha az şiddette AQP8 immunoreaktivitesine sahiptiler ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı.
7. Villus içi bağ dokusu hücreleri; kontrol grubunda, diğer gruplardan daha az şiddette AQP9 ekspresyonuna sahiptiler ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı.
8. Hofbauer hücreleri ve fetal kapiller endotel hücreleri AQP9 ekspresyonu açısından gruplar arasında benzer özelliklere sahipti.

7. ÖNERİLER

1. Bu çalışmada akuaporinlerin plasentadaki regülasyonuna ışık tutmak amacıyla, gestasyonel diyabetli plasentalar AQP8 ve AQP9 ekspresyonu açısından taranmıştır. İmmunhistokimyasal ekspresyonun gen ve mRNA düzeyinde teyit edilmesi ve kantitatif verilere ulaşmak için çalışmaya bir sonraki aşamada blotlama yöntemlerinin eklenmesi elde edilen sonuçların güvenilirliğini arttırılabilir.
2. Plasental akuaporin - insülin ilişkisi kültür ortamında normal eksplant kültürlerinde çalışılmış, insülin rezistansı hücrelere TNF-alfa uygulanarak deneysel olarak oluşturulmuştur. Bir sonraki çalışmanın insülin rezistansı sebebi ile gestasyonel diyabet tanısı almış plasental eksplant kültürlerinde yapılması, durumun kültür ortamında gerçeğe daha yakın modellenmesini sağlamış olacaktır.
3. Çalışmaya sağlıklı bireylerden oluşmuş kontrol grubunun yanı sıra regüle olmayan GDM'li bir grubun eklenmesi, akuaporinlerin tedavi edilmemiş insülin rezistansında nasıl bir ekspresyon paterni sergileyeceğini göstermesi açısından faydalı olacaktır.
4. GDM, ülkemizde özellikle büyükşehirlerde oldukça iyi taranan ve tanı konulduktan sonra regülasyonu başarılı bir şekilde devam ettirilen bir hastalıktır. Ancak hastaların tedaviye uyum oranı özellikle kırsal kesimler düşmekte, nadir de olsa regüle olmayan GDM vakaları görülebilmektedir. Bu vakalar doğum anında makrozomik bebek, anlık kan şekeri ölçümü yüksekliği ve komplike olmuş polihidramniyosla tanınabilir ve planlanacak uzun vadeli bir çalışmada böyle bir grup oluşturulabilir.
5. Regüle olmayan GDM'de komplikasyon olarak görülen polihidramniyosun daha geniş bir çerçevede tartışılabilmesi için immünohistokimyasal değerlendirmeye amnion zarı da dahil edilmelidir.

8. KAYNAKLAR

1. Edwards, D., et al., *Paracellular permeability pathways in the human placenta: a quantitative and morphological study of maternal-fetal transfer of horseradish peroxidase*. Placenta, 1993. **14**(1): p. 63-73.
2. Agre, P., M. Bonhivers, and M.J. Borgnia, *The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems*. J Biol Chem, 1998. **273**(24): p. 14659-62.
3. Carbrey, J.M. and P. Agre, *Discovery of the aquaporins and development of the field*. Handb Exp Pharmacol, 2009(190): p. 3-28.
4. Ishibashi, K., et al., *Cloning and functional expression of a second new aquaporin abundantly expressed in testis*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **237**(3): p. 714-8.
5. Tsukaguchi, H., et al., *Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel*. J Biol Chem, 1998. **273**(38): p. 24737-43.
6. Damiano, A.E., E. Zotta, and C. Ibarra, *Functional and molecular expression of AQP9 channel and UT-A transporter in normal and preeclamptic human placentas*. Placenta, 2006. **27**(11-12): p. 1073-81.
7. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus ;Diabetes Care*. American Diabetes Association, 2010. **22**.
8. King, H., *Epidemiology of glucose intolerance and gestational diabetes in women of childbearing age*. Diabetes Care, 1998. **21 Suppl 2**: p. B9-13.
9. Catalano, P.M., et al., *Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus*. Am J Obstet Gynecol, 1999. **180**(4): p. 903-16.
10. Ryan, E.A. and L. Enns, *Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance*. J Clin Endocrinol Metab, 1988. **67**(2): p. 341-7.
11. Buchanan, T.A., et al., *What is gestational diabetes?* Diabetes Care, 2007. **30 Suppl 2**: p. S105-11.

12. Suzuki, K. and T. Kono, *Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(5): p. 2542-5.
13. O'Brien, R.M. and D.K. Granner, *Regulation of gene expression by insulin.* Biochem J, 1991. **278** (Pt 3): p. 609-19.
14. Challier, J.C., S. Hauguel, and V. Desmaizieres, *Effect of insulin on glucose uptake and metabolism in the human placenta.* J Clin Endocrinol Metab, 1986. **62**(5): p. 803-7.
15. Schmon, B., et al., *Insulin and glucose do not affect the glycogen content in isolated and cultured trophoblast cells of human term placenta.* J Clin Endocrinol Metab, 1991. **73**(4): p. 888-93.
16. Hochberg, Z., et al., *Insulin regulates placental lactogen and estradiol secretion by cultured human term trophoblast.* J Clin Endocrinol Metab, 1983. **57**(6): p. 1311-3.
17. Ren, S.G. and G.D. Braunstein, *Insulin stimulates synthesis and release of human chorionic gonadotropin by choriocarcinoma cell lines.* Endocrinology, 1991. **128**(3): p. 1623-9.
18. Nestler, J.E., *Insulin and insulin-like growth factor-I stimulate the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity of human placental cytotrophoblasts.* Endocrinology, 1989. **125**(4): p. 2127-33.
19. Wang, S., et al., *Expression of aquaporin-8 in human placenta and chorioamniotic membranes: evidence of molecular mechanism for intramembranous amniotic fluid resorption.* Am J Obstet Gynecol, 2001. **185**(5): p. 1226-31.
20. Wang, S., et al., *Expression of aquaporin 9 in human chorioamniotic membranes and placenta.* Am J Obstet Gynecol, 2004. **191**(6): p. 2160-7.
21. Marino, G.I., et al., *High levels of human chorionic gonadotropin (hCG) correlate with increased aquaporin-9 (AQP9) expression in explants from human preeclamptic placenta.* Reprod Sci, 2010. **17**(5): p. 444-53.

22. Castro Parodi, M., et al., *Evidence for insulin-mediated control of AQP9 expression in human placenta*. Placenta, 2011. **32**(12): p. 1050-6.
23. nelson-piercy, c., in *sistemik hastalıklar ve gebelik*. 2003, nobel tıp kitapevi. p. 82-99.
24. Junqueira, L.C., *dişi üreme sistemi*, in *Temel Histoloji*. 2009. p. 435-452.
25. Pijnenborg, R., et al., *trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals*. Placenta, 1981. **2**(1): p. 71-91.
26. Çiçek M.N, A.C., Çelik Ç, Haberal A., *Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*, G. Kitabevi, Editor. 2004. p. 487-491.
27. Demir, R., . *İnsan Gelişimi ve İmplantasyon Biyolojisi*, ed. Palme. 1995. 179-209.
28. Creasy, R.K., in *Maternal– Fetal Medicine.*, W.B. Saunders, Editor. 1999: Philadelphia, Pennsylvania. p. 1135-1140.
29. Moore, K., in *İnsan Embriyolojisi*. 2002, Nobel Tıp Kitabevi: İstanbul. p. 130-139.
30. Tekelioğlu, M., *Embriyonun dışında gelişen organlar, 'İnsanın Üremesi ve Gelişmesi'*. 1995, Ankara: Dumat Ofset. 105-116.
31. Sadler, T.W., *Langman's medikal embriyoloji*. 2005, China Lippincott. 113-143.
32. Lunghi, L., et al., *Control of human trophoblast function*. Reprod Biol Endocrinol, 2007. **5**: p. 6.
33. Gürsoy, E., *Embriyoloji Atlası*. Vol. 1. 1997, Sivas: Esnaf Ofset.
34. Kierszenbaum, A., *Histology and cell biology an introduction to pathology*. 2002: Elsevier.
35. Carlson, B.M., *Human Embryology and Developmental Biology*. Vol. 3. 2004: Elsevier.
36. Moore, K., *Before We Are Born*. 2009: Elsevier. 33-77.

37. Huppertz, B., *The anatomy of the normal placenta*. J Clin Pathol, 2008. **61**(12): p. 1296-302.
38. Moore, K.L., *The Developing Human, Clinically Oriented Embryology*. Vol. 8. 2008: Elsevier.
39. Sati, L., et al., *Cellular diversity of human placental stem villi: an ultrastructural and immunohistochemical study*. Acta Histochem, 2007. **109**(6): p. 468-79.
40. Battistelli, M., et al., *Ultrastructural study on human placenta from intrauterine growth retardation cases*. Microsc Res Tech, 2004. **65**(3): p. 150-8.
41. Gauster, M., et al., *Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia*. Placenta, 2009. **30 Suppl A**: p. S49-54.
42. Fauci, A.S.K., DL. Braunwald, E. , *Harrison's Principles of International Medicine*. 2008, New York: McGraw-Hill. p:2275.
43. Alemzadeh, R.B., RE. Kliegman, RM. Jenson, HB. , *Nelson Textbook of Pediatrics*. 2004, Pennsylvania: Elsevier Saunders.
44. Haller, M.J., M.A. Atkinson, and D. Schatz, *Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management*. Pediatr Clin North Am, 2005. **52**(6): p. 1553-78.
45. *Diabetes Mellitus Tanı, İzlem ve Tedavi Kılavuzu*. 2009: Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği.
46. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care 29, 2006. **1**: p. 8-43.
47. Association, A.D., *Standards of medical care in diabetes*. Diabetes Care. Vol. 33. 2010. 11-61.
48. Buchanan, T.A. and A.H. Xiang, *Gestational diabetes mellitus*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 485-91.

49. Kim, C., K.M. Newton, and R.H. Knopp, *Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review*. *Diabetes Care*, 2002. **25**(10): p. 1862-8.
50. Clausen, T.D., et al., *High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia*. *Diabetes Care*, 2008. **31**(2): p. 340-6.
51. Bellamy, L., et al., *Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis*. *Lancet*, 2009. **373**(9677): p. 1773-9.
52. Damm, P., et al., *Insulin receptor binding and tyrosine kinase activity in skeletal muscle from normal pregnant women and women with gestational diabetes*. *Obstet Gynecol*, 1993. **82**(2): p. 251-9.
53. Maresh, M., *Screening for gestational diabetes mellitus*. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2005. **10**(4): p. 317-23.
54. Casey, B.M., et al., *Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes compared with the general obstetric population*. *Obstet Gynecol*, 1997. **90**(6): p. 869-73.
55. Silverman, B.L., et al., *Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers*. *Diabetes*, 1991. **40 Suppl 2**: p. 121-5.
56. Coustan, D.R., *Making the diagnosis of gestational diabetes mellitus*. *Clin Obstet Gynecol*, 2000. **43**(1): p. 99-105.
57. Carpenter, M.W. and D.R. Coustan, *Criteria for screening tests for gestational diabetes*. *Am J Obstet Gynecol*, 1982. **144**(7): p. 768-73.
58. Gonen, T. and T. Walz, *The structure of aquaporins*. *Q Rev Biophys*, 2006. **39**(4): p. 361-96.
59. Yasui, M., et al., *Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin*. *Nature*, 1999. **402**(6758): p. 184-7.
60. Ishibashi, K., et al., *Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water*

- and urea, but not to glycerol*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **244**(1): p. 268-74.
61. Ishibashi, K., *New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12*. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(190): p. 251-62.
 62. Verkman, A.S., *Aquaporins in clinical medicine*. *Annu Rev Med*, 2012. **63**: p. 303-16.
 63. Verkman, A.S., *Dissecting the roles of aquaporins in renal pathophysiology using transgenic mice*. *Semin Nephrol*, 2008. **28**(3): p. 217-26.
 64. Holmes, P., *The role of renal water channels in health and disease*. *Molecular Aspects of Medicine*, 2012. **33**: p. 547-552.
 65. Noda, Y., et al., *Aquaporins in kidney pathophysiology*. *Nat Rev Nephrol*, 2010. **6**(3): p. 168-78.
 66. Ma, T., et al., *Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(8): p. 4386-91.
 67. Ma, T., et al., *Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(5): p. 957-62.
 68. Sohara, E., S. Uchida, and S. Sasaki, *Function of aquaporin-7 in the kidney and the male reproductive system*. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(190): p. 219-31.
 69. Ikeda, M., et al., *Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. Requirement of pore-lining residue threonine 63*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39873-9.
 70. Morishita, Y., et al., *Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(17): p. 7770-9.
 71. Tradtrantip, L., et al., *Aquaporin water channels in transepithelial fluid transport*. *J Med Invest*, 2009. **56 Suppl**: p. 179-84.

72. Gresz, V., et al., *Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(1): p. G247-54.
73. Wellner, R.B., et al., *Further evidence for AQP8 expression in the myoepithelium of rat submandibular and parotid glands*. Pflugers Arch, 2006. **451**(5): p. 642-5.
74. Koyama, Y., et al., *Molecular cloning of a new aquaporin from rat pancreas and liver*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30329-33.
75. Benga, O. and V.J. Huber, *Brain water channel proteins in health and disease*. Mol Aspects Med, 2012. **33**(5-6): p. 562-78.
76. Benga, G., *Water channel proteins: from their discovery in 1985 in Cluj-Napoca, Romania, to the 2003 Nobel Prize in Chemistry*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2006. **52**(7): p. 10-9.
77. Albertini, R. and R. Bianchi, *Aquaporins and glia*. Curr Neuropharmacol, 2010. **8**(2): p. 84-91.
78. Buffoli, B., *Aquaporin biology and nervous system*. Curr Neuropharmacol, 2010. **8**(2): p. 97-104.
79. Rezzani, R. and L.F. Rodella, *Aquaporins and the nervous system: from bench to bedside*. Curr Neuropharmacol, 2010. **8**(2): p. 83.
80. Longatti, P.L., et al., *Choroid plexus and aquaporin-1: a novel explanation of cerebrospinal fluid production*. Pediatr Neurosurg, 2004. **40**(6): p. 277-83.
81. Oshio, K., et al., *Expression of the aquaporin-1 water channel in human glial tumors*. Neurosurgery, 2005. **56**(2): p. 375-81; discussion 375-81.
82. Nielsen, S., et al., *Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain*. J Neurosci, 1997. **17**(1): p. 171-80.
83. Papadopoulos, M.C. and A.S. Verkman, *Aquaporin-4 and brain edema*. Pediatr Nephrol, 2007. **22**(6): p. 778-84.

84. Verkman, A.S., J. Ruiz-Ederra, and M.H. Levin, *Functions of aquaporins in the eye*. *Prog Retin Eye Res*, 2008. **27**(4): p. 420-33.
85. Hara-Chikuma, M. and A.S. Verkman, *Roles of aquaporin-3 in the epidermis*. *J Invest Dermatol*, 2008. **128**(9): p. 2145-51.
86. Calamita, G., et al., *Cloning, structural organization and chromosomal localization of the mouse aquaporin-8 water channel gene (Aqp8)*. *Cytogenet Cell Genet*, 1999. **85**(3-4): p. 237-41.
87. Ma, T., B. Yang, and A.S. Verkman, *Cloning of a novel water and urea-permeable aquaporin from mouse expressed strongly in colon, placenta, liver, and heart*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **240**(2): p. 324-8.
88. Koyama, N., et al., *Cloning and functional expression of human aquaporin8 cDNA and analysis of its gene*. *Genomics*, 1998. **54**(1): p. 169-72.
89. Hurley, P.T., et al., *Expression and immunolocalization of aquaporin water channels in rat exocrine pancreas*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **280**(4): p. G701-9.
90. Saparov, S.M., et al., *Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(8): p. 5296-301.
91. Rojek, A., et al., *A current view of the mammalian aquaglyceroporins*. *Annu Rev Physiol*, 2008. **70**: p. 301-27.
92. Elkjaer, M.L., et al., *Immunolocalization of aquaporin-8 in rat kidney, gastrointestinal tract, testis, and airways*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **281**(6): p. F1047-57.
93. Garcia, F., et al., *The water channel aquaporin-8 is mainly intracellular in rat hepatocytes, and its plasma membrane insertion is stimulated by cyclic AMP*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(15): p. 12147-52.
94. Calamita, G., et al., *Triiodothyronine modulates the expression of aquaporin-8 in rat liver mitochondria*. *J Endocrinol*, 2007. **192**(1): p. 111-20.

95. Badran, H.H. and L.S. Hermo, *Expression and regulation of aquaporins 1, 8, and 9 in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats and during postnatal development*. J Androl, 2002. **23**(3): p. 358-73.
96. Caperna, T.J., et al., *Identification and characterization of aquaporin-9 (AQP9) in porcine hepatic tissue and hepatocytes in monolayer culture*. Domest Anim Endocrinol, 2007. **32**(4): p. 273-86.
97. Boury-Jamot, M., et al., *Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis*. Handb Exp Pharmacol, 2009(190): p. 205-17.
98. Carbrey, J.M., et al., *Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2945-50.
99. Ko, S.B., et al., *Cloning and functional expression of rAQP9L a new member of aquaporin family from rat liver*. Biochem Mol Biol Int, 1999. **47**(2): p. 309-18.
100. Tsukaguchi, H., et al., *Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9*. Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 2): p. F685-96.
101. Kuriyama, H., et al., *Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 2915-21.
102. Lee, D.H., et al., *The effects of thiazolidinedione treatment on the regulations of aquaglyceroporins and glycerol kinase in OLETF rats*. Metabolism, 2005. **54**(10): p. 1282-9.
103. Mann, S.E., et al., *Expression and localization of aquaporin 1 and 3 in human fetal membranes*. Am J Obstet Gynecol, 2002. **187**(4): p. 902-7.
104. Zhu, X.Q., et al., *Expression of aquaporin 1 and aquaporin 3 in fetal membranes and placenta in human term pregnancies with oligohydramnios*. Placenta, 2009. **30**(8): p. 670-6.

105. Wang, S., et al., *Aquaporin 3 expression in human fetal membranes and its up-regulation by cyclic adenosine monophosphate in amnion epithelial cell culture*. J Soc Gynecol Investig, 2006. **13**(3): p. 181-5.
106. De Falco, M., et al., *Down-regulation of aquaporin 4 in human placenta throughout pregnancy*. In Vivo, 2007. **21**(5): p. 813-7.
107. Mann, S.E., et al., *Steady-state levels of aquaporin 1 mRNA expression are increased in idiopathic polyhydramnios*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **194**(3): p. 884-7.
108. Zhu, X., et al., *The expression of aquaporin 8 and aquaporin 9 in fetal membranes and placenta in term pregnancies complicated by idiopathic polyhydramnios*. Early Hum Dev, 2010. **86**(10): p. 657-63.
109. Damiano, A., et al., *Water channel proteins AQP3 and AQP9 are present in syncytiotrophoblast of human term placenta*. Placenta, 2001. **22**(8-9): p. 776-81.
110. Jahn, T.P., et al., *Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia*. FEBS Lett, 2004. **574**(1-3): p. 31-6.
111. Holm, L.M., et al., *NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin-expressing Xenopus oocytes*. Pflugers Arch, 2005. **450**(6): p. 415-28.
112. Ishibashi, K., et al., *Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20782-6.
113. Miranda, M., et al., *Gene expression of paired abdominal adipose AQP7 and liver AQP9 in patients with morbid obesity: relationship with glucose abnormalities*. Metabolism, 2009. **58**(12): p. 1762-8.
114. Fox, H., *The incidence and significance of Hofbauer cells in the mature human placenta*. J Pathol Bacteriol, 1967. **93**(2): p. 710-7.
115. Castellucci, M. and D. Zaccheo, *The Hofbauer cells of the human placenta: morphological and immunological aspects*. Prog Clin Biol Res, 1989. **296**: p. 443-51.

116. Demir, R. and T. Erbençi, *Some new findings about Hofbauer cells in the chorionic villi of the human placenta*. Acta Anat (Basel), 1984. **119**(1): p. 18-26.