



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



GESTASYONEL DİABET OLAN VE OLMAYAN HASTALARIN
PLASENTALARINDA EZRİN-RADİXİN-MOESİN PROTEİNLERİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYA VE WESTERN BLOT YÖNTEMLERİYLE
EXPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

MUHAMMET ERDAL SAK
DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Murat AKKUŞ

DİYARBAKIR

2020



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



GESTASYONEL DİABET OLAN VE OLMAYAN HASTALARIN
PLASENTALARINDA EZRİN-RADİXİN-MOESİN PROTEİNLERİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYA VE WESTERN BLOT YÖNTEMLERİYLE
EXPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

MUHAMMET ERDAL SAK
DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Murat AKKUŞ

DİYARBAKIR

2020

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı (DÜBAP) tarafından **TIP.19.003** Numaralı proje ile desteklenmiştir.



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DICLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı** doktora öğrencisi **Muhammet Erdal SAK**'ın hazırladığı “**Gestasyonel Diabet Olan ve Olmayan Hastaların Plasentalarında Ezrin-Radixin-Moesin Proteinlerinin İmmunohistokimya ve Western Blot Yöntemleriyle Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi**” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

02/07/2020

İmza

Danışman: **Prof. Dr. Murat AKKUŞ**

Jüri üyeleri

Jüri başkanı	Prof. Dr. Murat Akkuş	
Üye	Prof. Dr. Engin Deveci	
Üye	Prof. Dr. Yusuf Nergiz	
Üye	Prof. Dr. Leyla Canpolat	
Üye	Doç. Dr. Tuncay Kuloğlu	

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../.../ve... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.../.../...

Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN

Dicle Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DICLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

07.10/2020

Muhammet Erdal SAK

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi, birikim ve deneyimlerini hiçbir zaman eksik etmeyen, tezimin şekillenmesinden sonuçlandırılmasına kadar her zaman yanımda olan ve katkılarını eksik etmeyen saygıdeğer danışman hocam Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Murat Akkuş başta olmak üzere,

Bilgi ve birikimleriyle her zaman yanımda olan desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bölüm hocalarım Prof.Dr. Yusuf Nergiz'e, Prof.Dr. Engin Deveci'ye, Prof.Dr. Sevdâ SÖKER'e, Prof.Dr. Ayfer AKTAŞ'a, Doç.Dr. Selçuk TUNİK'e, Doç.Dr. Cenap Ekinci'ye dokularımın değerlendirmesinde bana yardım eden Tıbbi Biyoloji ve Genetik Öğretim üyesi Doç. Dr. Sevgi İrtegin Kandemir'e,

Tez çalışmamda desteğini eksik etmeyen bütün laboratuvar ve tez yazım aşamasında tecrübelerini paylaşan Uğur Şeker'e, Fırat AŞIR'a,

Yaşamımın her alanında bana desteğini, güvenini, sabrını ve sevgilerini eksiltmeyen, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, hiçbir zaman haklarını ödeyemeyeceğim kıymetli anne babam ve aileme, bu zorlu, yorucu süreçte her zaman yanımda olan ve tüm hayatımı zorluklarına rağmen güzelleştiren hayatımın her sürecince en büyük destekçim olan hayat arkadaşım, eşim Sibel Sak'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
RESİMLER LİSTESİ	viii
1.1. TÜRKÇE ÖZET	1
1.2. ABSTRACT	2
2. GİRİŞ ve AMAÇ	3
3. GENEL BİLGİLER	5
3.1. Plasenta Hakkında Bilgi	5
3.1.1. Giriş ve tanım	5
3.1.2. Plasentanın gelişimi	6
3.1.3. Erken plasenta gelişimi - prelaküner aşamaları	7
3.1.4. Erken villöz aşaması	8
3.1.5. Plasental villus ağacı	8
3.1.6. Maternal plasenta	9
3.1.7. Fötal plasenta	10
3.1.8. İnsan Plasentanda vaskülojenez ve anjiyogenezis	11
3.1.9. Desidualizasyon	12
3.2. Gestasyonel Diyabetes Mellitus	13
3.3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus'ta plasental anjiyogenez	14
3.4. Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Protein Ailesi	14
4. GEREÇ VE YÖNTEM	17
4.1. Plasentaların Elde Edilmesi	17
4.2. Rutin Histolojik Doku Takibi	17
4.3. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü	17
4.4. Ezrin, Radixin ve Moesin proteinleri İmmun Boyama Protokolü	18

4.5.	Western blot ve protein konsantrasyon tayini	18
4.5.1.	Dokuların işlenmesi ve lizat total protein miktarının belirlenmesi.....	18
4.5.2.	Western blot protokolü	19
5.	BULGULAR.....	21
5.1.	Histopatolojik Bulgular	21
5.2.	İmmünohistokimyasal Bulgular	24
5.3.	Western blot Bulguları.....	32
6.	TARTIŞMA	33
7.	SONUÇ	37
8.	KAYNAKLAR	38
9.	ÖZGEÇMİŞ	49
10.	EKLER.....	51
10.1.	Etik kurul onayı.....	51
11.	ORİJİNALLİK RAPORU	52
12.	HASTA ONAM FORMU.....	54

KISALTMALAR VE SİMGELER

GDM	:	Gestasyonel Diabetes Mellitus
PGDM	:	Pregestasyonel Diabetes Mellitus
ERM	:	Ezrin, Radiksin ve Moesin Protein Ailesi
Rho	:	Rho faktörü
GTP	:	Guanozin trifosfat
GDP	:	Guanozin difosfat
CD43	:	Sialophorin
CD44	:	Hücre-hücre etkileşimine katılan yüzey glikoproteini
CD95	:	Fas Reseptörü
CD146	:	Başkalaşım kümesi 146
ICAM-2	:	Hücreler arası adhezyon molekülü-2
BCA	:	Bisinkonik asit tahlili
TEMED	:	Tetrametiletildiamin
PBS	:	Fosfat buffered salin
µm	:	Mikrometre
kDa	:	Kilodalton
DAB	:	Diaminobenzidin
MMP	:	Matriks metalloproteinaz
TNF-α	:	Tümör nekroz faktör - alfa
COOH	:	Karboksilik asit
ERMBMPs	:	ERM bağlayıcı protein
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
NH₂	:	Amin
p.c.	:	Konsepsiyon sonrası
PLGF	:	Plasental büyüme faktörü
VEGF	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
FGF	:	Fibroblast büyüme faktörü

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1: Term bir plasentanın fetal kısmı (sol taraf) ve maternal kısmı (sağ) makroskopik görüntüsü	6
Şekil 2: Plasentasyonda ve gebeliğin ileri döneminde oluşan villuslar.	7
Şekil 3: Postimplantasyon erken dönemde villusların gelişimi	8
Şekil 4: Maternal plasentanın ilustrasyonu	10
Şekil 5: Plasental dolaşım	12
Şekil 6: ERM ailesi üyesi proteinlerin yapısı	16
Şekil 7: ERM ailesi proteinlerinin fosforilasyon ve aktivasyonu	17

RESİMLER LİSTESİ

	Sayfa No
Resim 1: Kontrol plasentalarında fetal yüzey serbest villuslarının mikroskopik görüntüsü.	23
Resim 2: Kontrol plasentalarında maternal yüzeyde desidua ve villusların mikroskopik görüntüsü.	23
Resim 3: GDM'li plasentada serbest villusların mikroskopik görüntüsü.	24
Resim 4: GDM'li plasentada desidua'nın mikroskopik görüntüsü.	24
Resim 5: Kontrol grubu serbest villuslarda ezrin ekspresyon pozitif morfolojik bölgeler.	26
Resim 6: Kontrol grubu maternal desidua ve maternal yüzeye yakın villuslarda ezrin ekspresyonu izlenen bölgeler.	27
Resim 7: Kontrol grubu serbest villuslarında radiksin ekspresyon bölgeleri.	27
Resim 8: Kontrol grubu desidua ve villuslarında radiksin pozitivite.	28
Resim 9: Kontrol grubu serbest villuslarda moesin ekspresyonunun mikroskopik görüntüsü.	28
Resim 10: Kontrol grubu desiduada moesin immunohistokimya alanları.	29
Resim 11: GDM grubu serbest villuslarda ezrin ekspresyonunun mikroskopik görüntüsü.	29
Resim 12: GDM grubu serbest villuslarda ezrin ekspresyonunun mikroskopik görüntüsü.	30
Resim 13: GDM grubu serbest villuslarda radiksin ekspresyonunun mikroskopik görüntüsü.	30
Resim 14: GDM grubu villus ve desidua da radiksin ekspresyonunun mikroskopik görüntüsü.	31
Resim 15: GDM grubu serbest villuslarda moesin pozitif alanlar.	31
Resim 16: GDM plasentalarında moesin immunohistokimya.	32

1.1. TÜRKÇE ÖZET

Gestasyonel Diabet Olan ve Olmayan Hastaların Plasentalarında Ezrin-Radixin-Moesin Proteinlerinin İmmunohistokimya ve Western Blot Yöntemleriyle Expresyonlarının Değerlendirilmesi

Öğrencinin adı ve soyadı: Muhammet Erdal SAK

Danışman: AKKUŞ Murat, PhD,Professor

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Amaç: Bu çalışmada gestasyonel diyabetli olan ve normal gebeliklerde term plasentalarda ERM protein ailesi olarak bilinen hücre membran proteinlerinden ezrin, radixin ve moesin'in plasental ekspresyon düzeylerinin immunohistokimyasal ve western blot yöntemleriyle incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine doğum sebebiyle başvuran 20 kontrol, 20 GDM'li hastanın plasentaları kullanılmıştır. Elde edilen plasentalar disseksiyonu takiben rutin histolojik takibe alınmıştır. Ayrıca dissekiye edilen plasenta örneklerinin bir kısmı da western blot analizi için -80°C'de muhafaza edilmiştir. Rutin protokoller sonrası rutin hematoksilin & eozin ile boyanmış ve histopatolojik inceleme yapılmıştır. Ayrıca plasentada ezrin, radixin ve moesin ekspresyon düzey ve lokalizasyonları western blot ve immunohistokimya yöntemleriyle değerlendirilmiştir.

Bulgular: Hematoksilin ve eozin boyanan örneklerde kontrol grubunda normal morfoloji izlenmesine karşın GDM'li plasentalarda yoğun patoloji izlendi. Ezrin, radixin ve moesin immunohistokimya analizinde bu proteinlerin başta trofoblastik ve kısmen fetal kapiller endotelleri olmak üzere çeşitli bölgelerde değişen düzeylerde eksprese edildiği görüldü. Hem kontrol hem de GDM'li plasentalarda bu proteinlerin mevcudiyeti western blot analiziyle konfirme edildi. Ancak GDM'li hastalarda her üç protein'in de ekspresyon düzeylerinde azalma olduğu görüldü.

Sonuç: Genellikle hücre aktin iskeletiyle ilişkili olan ERM protein ailesi üyelerinin GDM'li hastalarda ekspresyon düzeyi azalmaktadır. Bu durumun GDM'nin fizyopatolojisinde rol alabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Plasenta, Ezrin, Radixin, Moesin, GDM

Evaluation of the Expression of Ezrin-Radixin-Moesin Proteins in the Placenta of Pregnant Women with and without Gestational Diabetes by Immunohistochemistry and Western Blot Methods

Student's surname and name: SAK Muhammet Erdal

Advisor: Prof. Dr. Murat AKKUŞ

Department: Histology and Embryology

1.2. ABSTRACT

Aim: In this study, we aimed to investigate the placental expression levels of ezrin, radixin and moesin, that are known as members of ERM protein family in gestational diabetes mellitus and normotensive term placenta by immunohistochemical and western blot analyses.

Materials and Methods: In this study, placentas of 20 normotensive and 20 GDM mothers whom applied to Dicle University Medical Faculty Hospital due to birth were used. Placentas were dissected and routine histological tissue processing protocol was performed. Also, some tissue samples were kept at -80°C for western blot analysis. Following routine protocols, histological samples stained with H&E and examined under light microscope. In addition, the expression levels and localizations of ezrin, radixin and moesin in the placenta were evaluated by western blot and immunohistochemistry methods.

Results: Besides normal histology in kontrol placentas, severe histopathological degenerations and morphological abnormalities were observed in GDM placenta. When we evaluated expression of ezrin, radixin and moesin, we observed immunpositivity of these proteins in various parts of the placenta, mainly at trophoblast cells and endothelial cells of fetal capilleries. Expression of these proteins were confirmed with western blot analyses both in control and GDM placenta. However, it was obvious that expression of ezrin, radixin and moesin was reduced in GDM placenta.

Conclusion: The expression level of the members of ERM protein family, that are generally involved to the actin skeleton structure, decreases in GDM placenta. We believe this cellular abnormality may play a key role in pathophysiology of GDM.

Keywords: Placenta, Ezrin, Radixin, Moesin, GDM

2. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde hemen hemen bütün gebeliklerin %3-10'unda diyabet tanısı konmaktadır. Gebelik diyabeti şikâyeti bulunan kişilerin %90'ına gestasyonel diabetes mellitus (GDM), %10'una ise pregestasyonel diabetes mellitus (PGDM) tanısı konmaktadır. Tüm dünya genelinde gebelik çağındaki kişilerde diyabet sıklığı her geçen gün artış göstermektedir. Bu artışın başlıca sebepleri; diyet alışkanlıklarındaki değişimler, sedanter yaşam tarzı ve obezite sıklığındaki artış ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. İnsülin hormonu'nun keşfedilmesine kadar diyabetli gebelerde mortalite oranı %30'larda ve infant mortalite oranı ise %90'larda iken, bu hastalığın patogenezi'nin daha iyi ve doğru anlaşılması, ayrıca gelişmekte olan tedavi ve takip yöntemlerinin sayesinde perinatal mortalite, genel nüfusta yakın düzeylere ulaşmıştır (1-3).

Plasenta, gebelik süresince anne ile fetüs arasında fonksiyonel ve fiziki ilişkinin sağlanmasında rol alan ve gebelik sürecine ait olan özel bir organ olarak tanımlanır. Gebelik boyunca plasentada oluşan değişiklikler, fetal gelişim için elzem olan; oksijen ve besin'in fetüse iletimi, metabolik artık maddelerin fetustan uzaklaştırılması, hormon üretimi ve fetüsü fiziksel koruma gibi fonksiyonlarla uyum göstermelidir (4).

GDM hem fetus hem de annede kısa ve uzun vadede çeşitli komplikasyonlara neden olmaktadır. Takibi iyi yapılmayan diyabette konjenital malformasyonlar, fetal makrozomi ve intrauterin gelişim geriliği gözlenebilmektedir (5). Diyabetik gebeliklerde plasenta genellikle normal boyutlarından daha büyük olmaktadır.

Ayrıca GDM, plasenta üzerinde hem fizyolojik hem de morfolojik yönden çeşitli patolojilerle kendisini göstermektedir (6). Maternal kökenli hiperglisemi, plasentada fibrinoid nekroz, villus immatürasyonu, anjiyogenezde artış gibi histopatolojik durumlara neden olur. Villöz immatürasyonun dışında mikroskobik düzeyde GDM'li plasentada vaskülosinsityal membranda kalınlaşma, sinsityal düğümlerin sayısında artış ve villöz nekroz gibi patolojilere de rastlanmaktadır (7-10). Diyabet ile ilişkili olan bu anormalliklerin düzeyi maruz kalınan glukoz miktarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (11).

Günümüze kadar GDM ile plasental proteinlerin fonksiyon, yapı ve miktarındaki değişiklikler arasında sayısız çalışma yapılmıştır. Vasküler disfonksiyon ve anjiyogenik sinyal yollarındaki aksaklıklar ve GDM arasında birçok bulgu sunulmuştur (12). Ayrıca GDM'li plasentada MMP aktivitesinde, apoptotik sinyal mekanizmasında ve inflamasyonda anormallikle daha önceki çalışmalarla tanımlanmıştır (13,14).

Her ne kadar patogenezi tam olarak açıklanmamış olsa dahi, morfolojik bozuklukların varlığı, GDM'nin şekillenmesinde birçoğu proteinin fonksiyon ve yapısında bozukluklar olabileceği ihtimalini düşündürmektedir.

Bugüne kadar yapılmış plasental araştırmalarda ERM protein ailesi üyeleri detaylı şekilde araştırılmamıştır. Hücre aktin iskeleti ile doğrudan ilişki içerisinde bulunan bu proteinlerin fonksiyon ve yapısal değişiklikleriyle GDM kaynaklı plasental patoloji arasında bir bağlantı olabileceğini düşünöyoruz.

Bu sebeple bu çalışmada GDM'li ve kontrol gebelerin plasentalarında ezrin, radixin ve moesin proteinlerinin ekspresyon düzeylerini ve immün lokalizasyonlarını araştırmayı amaçladık.

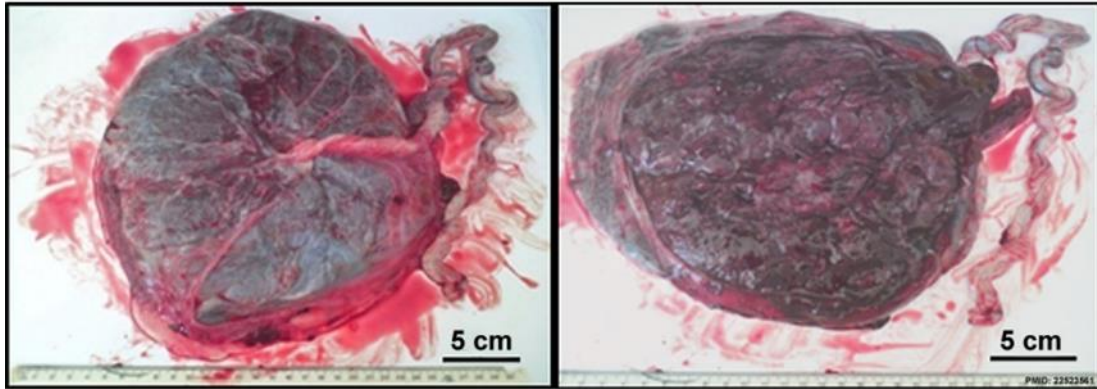


3. GENEL BİLGİLER

3.1. Plasenta Hakkında Bilgi

3.1.1. Giriş ve tanım

Plasenta çoğunlukla fetal orjinli olup fetal büyüme döneminde birden çok karmaşık fonksiyonu üstlenen bir organdır. Gelişen embriyodan köken alan bir fetal kısmı ve annenin uterusundan köken alan bir anne kısmı olmak üzere iki kısmı vardır. Gestasyonel dönemde, beslenme, gaz değişimi, artıkların atılması, endokrin, immun desteği ve özel bir dolaşım sistemi gibi fonksiyonlarla fetüs gelişimine destek olur (15). Plasenta metabolik ürünlerin değişimine izin veren ve villus olarak adlandırılan birçok sayıda fonksiyonel birimlerden oluşur. Plasenta mavimsi renkte, diskoid şekilli, 15-22 cm çapında, 2-4 cm kalınlığında yaklaşık 400-600 gram ağırlığında bir yapıdır. Maternal yüzünde lobulasyon görülür ve bunlara kotiledon adı verilir (16). Kotiledonların yapısından dolayı maternal yüz girintili çıkıntılı iken fetal yüz parlak, gri ve geniş opak damarları içerir. Maternal yüz venöz kandan dolayı koyu kırmızıdır (Şekil 1). Plasenta anne kanındaki tüm oksijen ve glikozun üçte birini kullanır ve protein sentezi karaciğerden daha yüksektir. Plasenta doğum sırasında uterus duvarından kopar ve doğumdan sonraki yaklaşık 25-30 dakika sonra uterustan dışarıya atılır (17).



Şekil 1: Full Term bir plasentanın fetal kısmı (sol taraf) ve maternal kısmı (sağ) makroskopik görüntüsü

Erişim linki:

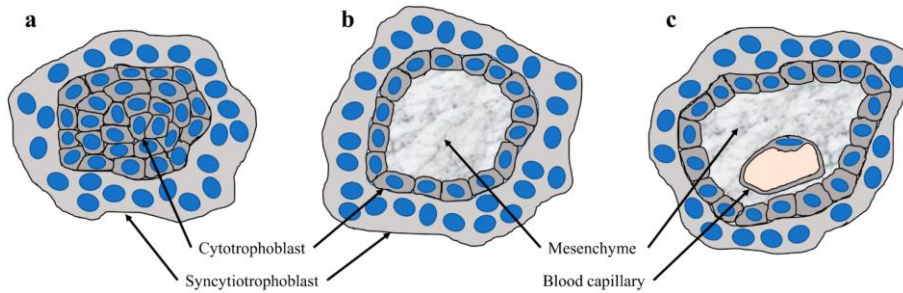
https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/BGDA_Practical_-_Placenta_and_Fetal_Membranes#/media/File:Placenta_term_anatomy_01.jpg

Erişim tarihi: 17.06.2020

3.1.2. Plasentanın gelişimi

Morula evresindeki ovum uterusu doğru olan yolculuğunda içine sürekli sıvı alır ve blastokisit oluşturur. Uterusa değeri değmez morulanın dış hücre topluluğu çoğalarak sitotrofoblast ve sinsityotrofoblast olarak iki tabakaya ayrılır (18). Ovumun uterusu implante olduğu endometriyum artık desidua adını alır (19). Konseptusun yedinci gününde döllenmiş ovumu dışardan kaplayan bir trofoblastik hücre kitlesi ve embriyoyu oluşturacak olan iç hücre kitlesini oluşturur. Trofoblast hücreleri plasentanın çoğunu oluşturur ve aynı zamanda embriyo için besin kaynağıdır. Sitotrofoblastlar farklılaşarak sinsityotrofoblastları oluşturur ve böylece villöz trofoblastlarda her iki hücre tipi bulunur (20).

Onikinci günde, sitotrofoblastlar koryonik plakadan proliferasyon olarak fetal plasentanın trabekülleri içine invaze olur ve primer villusları (Şekil 2) meydana getirir. Primer villuslar (Şekil 3) maternal kanı lakünelara kadar taşır ve on beşinci günde ekstraembriyonik mezoderm tabakası villusların arasına girer. Böylece sekonder villuslar da oluşmuş olur. On dokuzuncu günde sekonder villusların vaskularize olmasıyla tersiyer villuslar da oluşmuş olur ve bu villuslar hamileliğin bitimine kadar devam eder (21). Yaklaşık yirmi birinci günde embriyonik kan villöz dolaşıma katılır ve embriyo saran koryon sekizinci haftada aynı tip villuslar kaplanır ve desidua kapsülaris tarafından bu bölge düzleştirilir. Placenta gelişen fetusun gereksinimleri karşılamak birtakım değişimler geçirir. Yüzey alanı genişler, permeabilite artar, madde alışveriş mesafesi azalır, villus sayısı artar ancak yüzey alanları azalır. Placentada vaskulogenez artar ve vasküler lümenler genişler (22).



Şekil 2: Plasentasyonda ve gebeliğin ileri döneminde oluşan villuslar. Primer (a), sekonder (b) ve tersiyer (c) villuslar ve onları oluşturan yapılar gösterilmiştir (23).

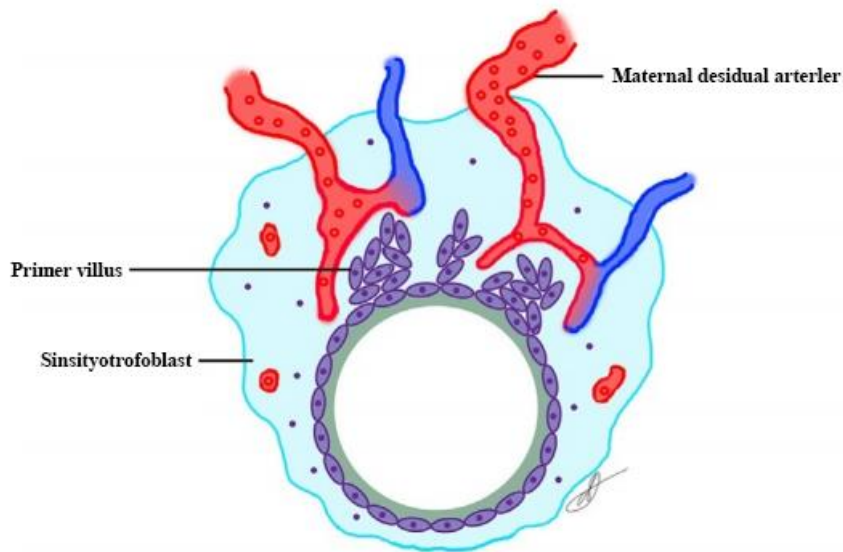
Dallanan bu villuslar villöz ağaç olarak adlandırılır ve boş alanların çoğunu bu ağaç işgal eder. Villöz ağaç, fetal trofoblastik kabuğu ve desidua bazalis sınırlanmıştır. Fetal placenta ya da diğer adıyla koryon frondozum buradan gelişirken maternal placenta ise endometriyumun desidua bazalisinden gelişir. Bu iki tabaka arasında bulunan kök villuslar

maternal kanla yıkanan boşluğa doğru dallanır ve septumlar genişler. Plasentanın maternal yüzünde kabartı şeklinde görülen 10-40 tane kotiledon adı verilen yapılar oluşur. Kotiledonlar koryonik tabaka ile temas etmezler ancak birbirlerine yakındırlar. Yaklaşık olarak on dördüncü haftada full term plasenta oluşur ve enine büyüme durur. Yirminci hafta itibari ile 10 cm çapında olan plasenta doğuma yakın 2-4 cm genişliğinde ve yaklaşık 500 gram ağırlığında olur (22).

3.1.3. Erken plasenta gelişimi - prelaküner aşamaları

Plasentanın gelişimi geç blastokistin endometriyuma temas etmesiyle yaklaşık altıncı ile yedinci günde başlar. Geç blastokist daha önceden de bahsedildiği gibi dış tarafta plasentayı oluşturacak olan trofoblastlar ve iç tarafta embriyoyu oluşturacak olan embriyoblastlardan meydana gelmiştir. Döllenmeden sonraki sekiz ila on ikinci günler arasında trofoblastlar endometriyumla temas eder etmez sitotrofoblast ve sinsityotrofoblastlar olmak üzere iki farklı tabakaya ayrılırlar (24,25).

Bu aşamada laküner sıvı ile dolu olup izole iken birleşip geniş laküner ağı meydana getirir. Böylece trofoblast tabakası endometriyuma komşu olan dış trofoblastik, laküner ağı ve embriyoya bakan ve ekstraembriyonik mezoderm ve iç trofoblast hücrelerinin meydana getirdiği primer koryonik plak. Laküner birleşerek intervillöz boşluğu ve ankorin villuslarını oluştururken, primer koryonik plak koryonik plakayı, trofoblastik kabuk ise bazal plakayı oluşturur. On ikinci günde sitotrofoblastlar sinsityotrofoblastları aşarak endometriyumun derinlere kadar invaze olup ekstra villöz trofoblast olarak adlandırılırlar (26).



Şekil 3: Postimplantasyon erken dönemde villusların gelişimi (27).

3.1.4. Erken villöz aşaması

Sitotrofoblast hücreleri çoğalarak on üçüncü güne kadar yan dalları oluşturarak lakünelara doğru uzanırlar. Buradan gelişen ilk dallara primer villus, bu villusların içine ekstraembriyonik mezodermin girmesiyle sekonder villuslar oluşur (28,29). Mezodermin içinde hemanjiyoblastların farklılaşmasıyla ilk fetal kılcak damarları oluştururlar. Sekonder villusların kanlanmasıyla tersiyer villuslar oluşur ve trabeküllerin dallanması devam eder. Plasenta gelişimine devam ederken mezenşimal villuslar ve bunların yüzeyinde köken alan villuslar villöz ağacın gelişimine katkı sağlar. Kök villuslar olgunlaşmamış intermediyer villuslarından gelişir. Gebeliğin yirminci haftasına kadar on ila yirmi villus dallanması daha gerçekleşir. Olgunlaşmamış ara villusların yapımı yirmi dördüncü haftaya kadar devam ederken villus ağı da gaz değişimi yapabilme yeteneğini kazanır (30).

3.1.5. Plasental villus ağacı

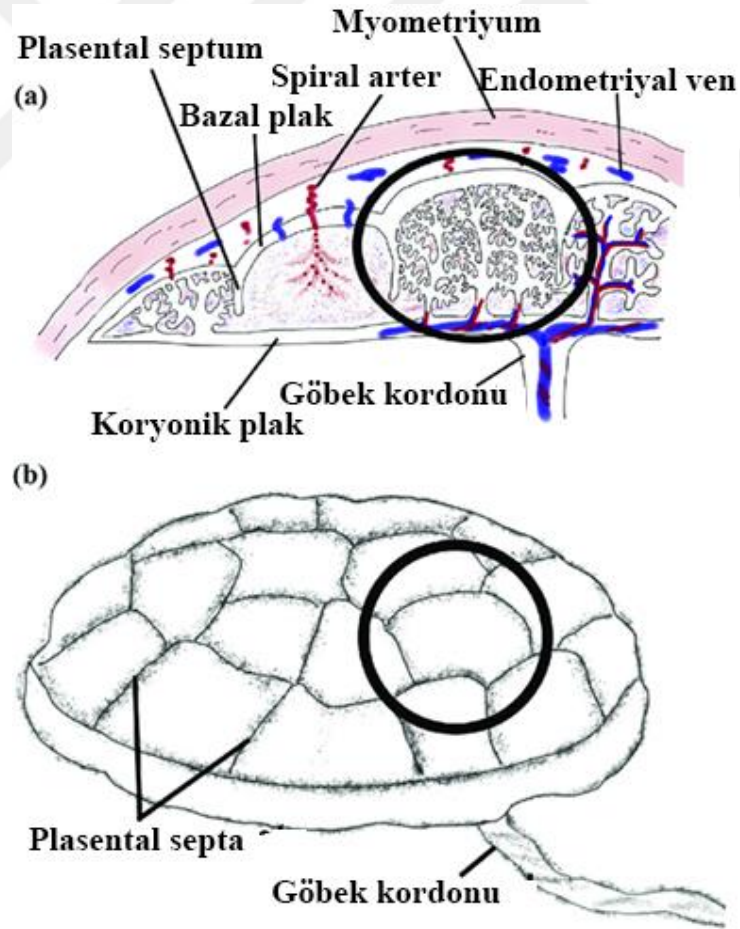
Yukarıda da değinildiği gibi plasenta gelişirken bir villöz ağaç gelişir. Villöz ağaç sürekli anne kanıyla yıkanır ve fetoplasental dolaşımı sağladığı için vaskülarizasyon oldukça iyi gelişmiştir. Maternal kanın fetal kanla karışması için aşması gereken villöz duvar dıştan içe doğru sinsityotrofoblastlar, sitotrofoblastlar, mezenkimal bağ dokusu ve hücreleri ve fetal kapiller endotelinden oluşur. Villöz ağacın gestasyonel dönemdeki görünümüne ve özelliklerine göre beş gruba ayrılır (31).

Mezenkimal villuslar 100-250 µm çapında, mezenşim hücrelerinden fakir, vasküler lümeni olmayan ve gelişen damarlarla bağlantılı villuslardır. Bu villuslar mezenşimal villuslara farklıdır ve gestasyonun ilk dönemlerinde gözlenirler. Nonmatür intermediyer villuslar, mezenşim villuslarından gelişen, 100-400 µm çapında, farklı büyüklükteki bulböz villuslardır. Sekiz ila yirmi ikinci hafta arasında yoğun olarak görünen bu villuslar zengin stromaları ve uzun prosesleri ile karakterizedir. Olgunlaşmamış intermediyer villuslar kök villuslara farklıdır. Nonmatür intermediyer villuslardan gelişen kök villuslar 80 µm-500 µm çapında villuslardır. İyi gelişmiş stromalarında yoğun kollajen liflerinin yanında arterler, venler, fibroblastlar ve plasental makrofajlar izlenir. Kalın bir sinsityotrofoblast tabakası ile çevrili olduklarından madde alışverişinden çok villus ağacına fiziksel destek görevi görürler. Matür intermediyer villuslar kök villusların bölünmesi sonucu oluşan, çapları 80-120 µm arasında, ince ve hafifçe kıvrık villuslardır. Stromalarında çok hücre içermeyen ve küçük kan damarları ile tanınabilir. Terminal villuslar olgun ara villuslardan gelişir ve villus ağacının son bulunduğu yapılarıdır. 80µm-100µm çapında, kısa, kalın ve yüksek vaskülarizasyon gösteren

villuslardır. Histolojik kesitlerde stromal alanın yarısından fazlası damarlar tarafından işgal edilmiş olarak gözlenir (32).

3.1.6. Maternal plasenta

Uterusun endometriyumundan köken alan ve trofoblastlar, septum ve bazal plaktan meydana gelen plasentanın maternal kısmıdır. Maternal plasentanın yüzeyinde 10-40 adet çıkıntı şeklinde görülen plasentanın fonksiyonel birimi kabul edilen kotiledonlar izlenir (33). Bazal plakata büyüme uterusundan daha fazla olduğu için bazal plaklarda katlantılar oluşarak plasental septa adı verilen bazal plaktan köken alan ancak koryonik plağa ulaşamayan ve villöz ağacı tam bölmeyen düzensiz yapılar oluşur (Şekil 4). Bu yapılar gestasyonun altıncı-sekizinci haftalarında itibaren gelişir. Plasental septalarda fibrinoid, sitotrofoblast, desidual hücreler ile septaların üst kenarlarına tutunmuş, ankorung villuslar ve onların sito- ve sinsityotrofoblast hücreleri bulunur (34).

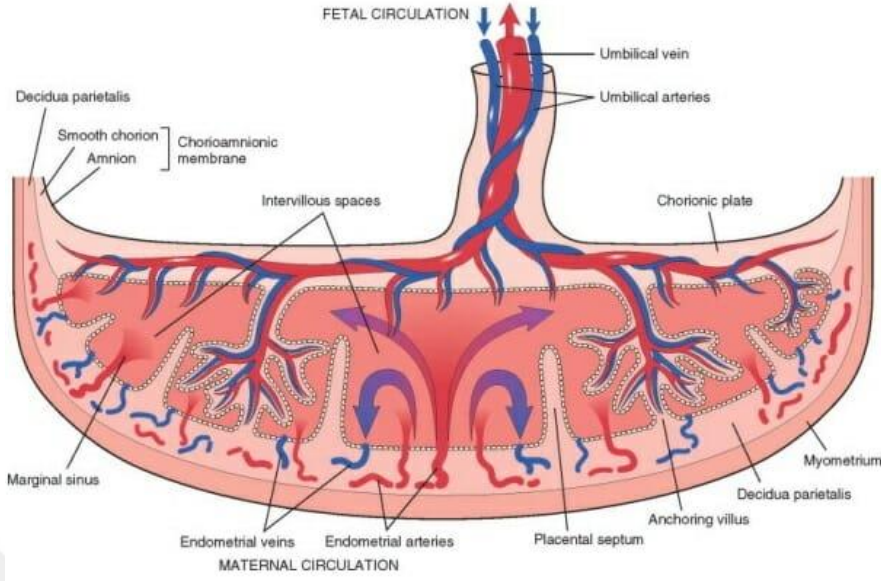


Şekil 4: Maternal plasentanın illüstrasyonu (35)

3.1.7. Fötal plasenta

Plasentanın fetal kısmı koryon frondozumdan gelişir ve koryon villuslarından oluşur. Fetusa bakan tarafı amniyon zarı ile sarılı iken intravillöz boşluk tarafı ise sitotrofoblastlar ve sinsityotrofoblastlar ile işgal edilmiştir. Amniyon zarı tek katlı kübik veya prizmatik epitelden oluşur. Epitel tabakasının altında amniyon mezodermi ince retiküler bir tabaka şeklinde komşu koryonun mezoderm tabakası içine invaze olur. Bu yarık şeklinde yapıların son kısımlarında fibrinoid bulunur (33). Fibrinoid, plasental fibrin ve diğre fetal ve maternal artıkların oluştuğu, histolojik olarak eozinofilik boyanan, asellüler homojen bir maddedir. Fibrinoid plasentada, koryonik plakta, villuslar içinde ve arasında, uteroplasental damarlarda ve villus ağacında bulunabilir. Fibrinoid madde plasentada belirli bir düzeyde bulunur ancak normalden fazla olursa patolojik bir durumu gösterir. İki alt türü bulunur: perivillöz ve intravillöz fibrinoid. (15)

Koryon plağından çıkan kök villuslar villus ağacının ilk dallanmasını oluşturur. Villus ağacının kalınlığı 2-4 cm arası değışir. En kalın bölge göbek kordonunun koryon plağıyla kesiştiğı yerdeki kök villusların ana dallarıdır. Histolojik kesitlerde bu dalların kas duvarları fibröz stroma ile çevrilmiş olup vasküler yapılardan zengin görünürler. Koryon ağacında bir arter ve bir venden oluşan kapalı bir dolaşım sistemi vardır. Maternal oksijene kan uterusun spiral arterleri ile bazal plağı geçerek belirli zaman aralıklarında intervillöz boşluklara açılırlar. Arterlerin boşluklara açıldığı yerde lümenleri daralır ve yüksek basınçla gelen oksijene maternal kan küçük villusları yıkar ve villustaki kanın ileri doğru itilmesi sağlanır (Şekil 5) (33).



Şekil 5: Plasental dolaşım

Erişim linki: <https://biologydictionary.net/wp-content/uploads/2017/07/Placenta.jpg>.

Erişim tarihi: 18.06.2020

3.1.8. İnsan Plasentanda vaskülojenez ve anjiyogenezis

Plasenta gelişen fetusun besin ve oksijen ihtiyacını karşılayabilmek için gebeliğin ilerleyen dönemiyle doğru orantılı olarak hacmini ve kan damarlarının sayısını, kapiller uzantılarını düzenli artırır. İnsan plasentasında vasküler gelişim üç basamaktan oluşur, bunlar; 1) VEGF tarafından parakrin olarak düzenlenen hemanjiyojenik kök hücre kaynaklı sitotrophoblast farklılaşması ile vaskülojenezin başlaması, 2) Anjiyogenez I (aktivasyon) süreci. Bu basamak prevasküler bir aşamadır ve sitotrofoblast ve hofbauer hücreleri tarafından üretilen büyüme faktörlerinin etkisinde gerçekleşir. 3) Anjiyogenez II (yeniden modellenme) perivasküler hücrelerin (perisit ve myofibroblast benzeri hücreler) kontraktıl damarları oluşturacak şekilde farklılaşması (19). Plasentada kan damarlarının *de novo* oluşumu, mezodermden göç eden öncül hücreler tarafından başlatılır. Plasental vaskülojenez ilk villusların oluşmaya başladığı, olgunlaşmanın intermedier villuslardan mezenkimal villusların şekillendiği döneme denk gelen, yaklaşık p.c. 18'nci gün ile 35'nci gün arasında gerçekleşir. Vaskülojenez sürecinde, öncül primitive kapillerler, pluripotent mezenkimal hücrelerden ayrılan hemanjiyojenik kök hücrelerin *in situ* farklılaşmasıyla gerçekleşir. Hemanjiyojenik kök hücreler daha sonra hemanjiyoblastik kök hücrelere (hematopoetik progenitor hücreler) farklılaşır (36,37). Öncül endotelial tüpçükler p.c. 21 ve 32'nci günler arasında oluşur. İnsan plasentadaki vaskülojenez, embriyonik damarların

çıkıntılar oluşturarak plasentayı damarlandırması yerine, plasental villuslardaki mezenkimal precursor hücrelerin de novo kapillerlere dönüşmesiyle gerçekleşir. Anjiyogenez, daha önce var olan bir damardan yeni kan damarlarının oluşturulduğu fizyolojik bir süreçtir. Plasental kan damarlarının gelişimi p.c. 21'nci gün gibi erken bir dönemde başlar ve gestasyon boyunca devam eder. İlk plasental villuslar oluştuğunda, sitotrofoblast hücre kümesi kalın bir sinsityotrofoblast ile çevrilidir. Sekonder villusların gelişmesiyle, hücre kümeleri düzensiz bir şekilde ortadan kaybolur, bağ dokusu hücreleri sitotrofoblastın altında homojen bir şekilde organize olur. Gestasyonun 6. haftasında, villöz damarlarda bazal membran seçilebilir hale gelir. Hemanjiyoplastik hücrelerden villöz kapillerlerin oluşması gestasyonun 10-12. haftalarına kadar gözlenebilir. On ikinci hafta geçilirken, kapillerler, halka halini alır, sinuzoidler oluşturur ve trofoblastik tabakaya doğru sinsityokapiller membranı oluşturmak üzere çıkıntı yapar. Gebeliğin ikinci yarısında net bir yeni damar oluşumu belirtileri gözlenirse de bazı kılcal filizler izlenebilir. P.c. 32. gün civarında, villöz endotel tüpler birbirleriyle ve öncül umbilical korda ile bağlantı kurmaya başlar. Bu şekilde öncül bir fetoplasental bir dolaşım sistemi kurulmuş olur (Resim 6). Bu günden itibaren, vaskülojenik de novo ile başlayan süreci villöz vasküler sistemi oluşturacak olan ve doğuma kadar devam edecek olan anjiyogenik ilerleme takip eder. Plasental anjiyogenezis 32'nci günden doğuma kadar döngü halindeki üç basamak halinde gözlenir. Bunlar; p.c. 32'nci günden 25'nci haftaya kadar anjiyogenik dalların dağılımının etkisiyle ağ oluşturulması, Periferik kapiller ağların gerilemesi ve santral kök damarlarının p.c. 15 ve 32. haftalar arasında oluşumu ve dallanmayan damarların kendi üzerlerine katlanmasıyla terminal kapillerlerin oluşumu şeklindedir. Plasental damarlanma VEGF, FGF ve PLGF'nin de içinde yer aldığı birçok sinyal tarafından düzenlenir (22).

3.1.9. Desidualizasyon

Döllenmeden sonra gebelik korpus lutemü progesteron salgılar ve implantasyona hazırlanmak için uterus endometriyumu sekresyon fazına geçer. Geç blastokistin endometriyuma tutunmasıyla trofoblastlar sito ve sinsityotrofoblastlar olmak üzere iki farklı tabakaya ayrılır. Sinsityotrofoblastlar endometriyuma invaze olurlar ve böylece endometriyumun stromal hücreleri de trofoblastların hormonal ve mekanik etkilerine bağlı olarak morfolojik değişikliklere uğrarlar. Endometriyumun implantasyona yanıt olarak gerçekleştirdiği bu değişikliklere desidual reaksiyon, bu dönemdeki endometriyuma desidua, bu olaya ise desidualizasyon denir. Desidual hücreler de hipertrofiye uğrayarak hacimce büyür, irileşir ve poligonal bir görünüm kazanırlar. Hücreler lipid ve glikojen biriktirerek şişerler. Desidua üç kısımdan oluşur. Desidua bazalis koryon frondozumun üzerinde yer alan ve desidual hücreleri

içeren kısımdır. Buradaki hücreler glikojen ve lipidden zengin olup iri ve yuvarlak hücrelerdir. Maternal plasentanın bazal plakasını oluşturur. Desidua kapsülaris ise embriyonun karşı kutbunda embriyoyu kuşatan desidua tabakasıdır. Az sayıda kan damarı ve bez içerir ve uterusun boşluğuna bakar. Koryon boşluğu ve amniyon kesesinin büyümesi sonucu oluşan basınçla bu tabaka atrofiye uğrar. Gestasyonun on ikinci haftasında bu tabakanın kalınlığı 1 milimetreye kadar azalır. Desidua pariyetalis ise uterusun implantasyon bölgesi dışında kalan kısma adı verilir. 12. haftanın sonunda desidua kapsülaris ve pariyetalis birbirinden ince bir yarık ile ayrıdır. Fetüs büyüdükçe, bu iki tabaka birbiriyle temas ederek kaynaşır ve uterus boşluğu ortadan kalkarak koryoamniyotik membran oluşmuş olur (15.38.39).

3.2. Gestasyonel Diyabetes Mellitus

İlk defa gebelik döneminde fark edilen veya bu dönemde başlamış olan glukoz düzeyindeki tolerans bozukluğu Gestasyonel diyabetes mellitus (GDM) olarak tanımlanır. Hiperglisemi'nin farklı düzeyleri bu dönemde gözlenir. Bu hiperglisemik durum, annede ve bebekte bazı komplikasyonların şekillenmesine neden olabilmektedir. Annede hipertansiyon görülürken, bu durum gebelik sonrası diyabetine neden olabilmektedir. Bebekte ise bu hastalığın mevcudiyeti, makrozomi ve çeşitli konjenital malformasyonlara neden olabilmektedir. Gebelikle beraber ortaya çıkan ve ilerleyebildiği bilinen insülin direnci, gebeliğin orta döneminde şekillenmeye ve üçüncü trimestıra kadar ilerleyişini sürdürür. Gebelikle beraber insülin direncinin şekillenmesinde olanı sebepler plasentada bulunmakta olan hormonal salgılar, tumor nekroz factor α (TNF- α), adipokinler, insan plasental büyüme hormone ve insan plasental laktojen gibi faktörlerin etkisiyle şekillendiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra, gebelik döneminde progesteron, östrojen ve kortizol gibi moleküllerin düzeyindeki artış glukoz-insülin balansının ortadan kalkmasına neden olmaktadır (40). Gestasyon süresince periferik insülin direnci'nin ortadan kalkması için pankreas tarafından insülin salgılanması artış gösterir. Pankreas, bu durumda insülin direncinin baskısını ortadan kaldırabilmek için yeterli düzeyde insülin üretemez ve GDM şekillenir (40). GDM'li hastaların az sayıdaki bir kısmında glukoz intoleransının sebebi gebelik öncesi oluşan tip-2 diyabet olmasına rağmen, büyük bir çoğunluğunda glukoz intoleransı gebelik sırasında şekillenmektedir (41). GDM, genel olarak doğum sonrasında ortadan kalkmaktadır ayrıca kan şekeri düzeyi normal seviyelere gerilemektedir. Doğum sonrası diyabetik durumun kalıcılığı %5 civarında olmaktadır. Doğum sonrası Tip 2 diyabetin 5 yıl içerisinde şekillenme olasılığı

%50'dir (42). Daha sonraki gebelik dönemlerinde hastanın tekrar GDM şekillendirmesi ihtimali %45'tir (43).

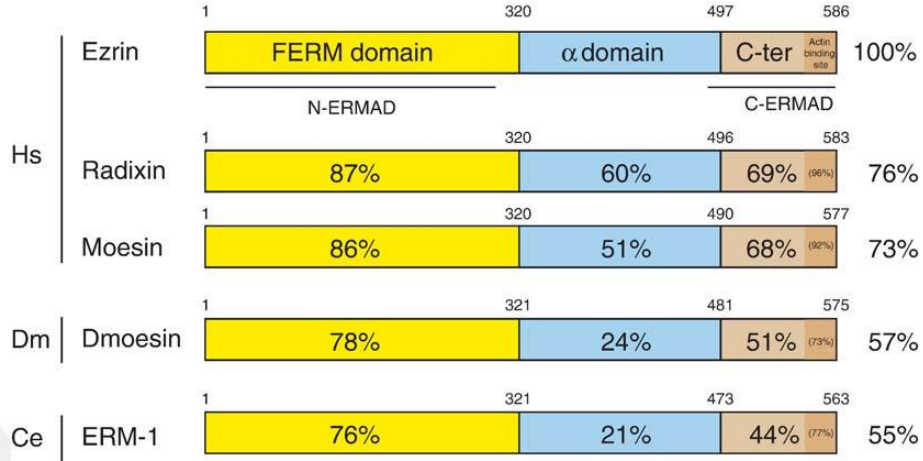
3.3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus'ta plasental anjiyogenez

Diyabetik metabolizmanın şekillenmesiyle beraber GDM, gebeliğin ikinci döneminden sonra plasentada hasar oluşturmaya başlar. Gestasyonel diyabetes mellitus'tan etkilenmekte olan vasküler değişimlerin büyük bir kısmı gelişimsel anjiyogenez ve mikro-vasküler remodelleme üzerinde gözlenebilir (44). Bu durum, gebelikten önceki süreçte diyabet'in etkisinin vasküler gelişme üzerinde gestasyonel diyabetes mellitus'tan daha farklı bir etkilenmeye sahip olabileceğini göstermektedir. Gestasyonel diyabetes mellitus, gebeliğin erken döneminde plasenta gelişiminde bozulmalara neden olur ayrıca plasenta vaskülarizasyonun ise azalmasına sebep olur. Bu patolojik durum, istenmeyen sonuçlara neden olmakta ve çalışmalarda azalan veya artan plasental damar gelişimi raporlanmıştır. Gestasyonel diyabetes mellitus plasentalarında, serbest ve kök villuslar'ın kılcacal yapılarında çeşitli düzeylerde artış gözlenir (45). Villus stromasında kollajen lif üretiminde azalış, sinsityotroblast hücre tabakalarında yoğun vakuol benzeri oluşumlar gözlenir. Tüm villusların stroması vasküler yapılar tarafından sarılır. Gestasyonel diyabetes mellitus plasentasında vasküler endotel hücre direncinde oluşan değişimlerin yanında hiper vaskülarizasyona yönelme de gözlenmiştir. Plasentanın vaskülarizasyonundaki bu değişim sadece annenin değil, fetüsün de üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Damarlarda şekillenen değişimler sebebiyle retinopati ve kardiyovasküler komplikasyonların oluşma riski daha yüksektir (46).

3.4. Ezrin/Radiksin/Moesin (ERM) Protein Ailesi

ERM protein ailesi, birbirleriyle ilişki içerisinde bulunan 3 proteinden oluşmaktadır ve bunlar; ezrin, radiksin, moesin (47). ERM protein ailesi üyeleri, plazma membranında bulunan proteinler ve aktin hücre iskeleti arasında bağlantıyı sağlar. Bu aileye ait proteinler, mikrovilluslarda, membranların kırılma bölgelerinde (membrane ruffles), hücrelerin birleşme ve bölünmeleri esnasında yoğunlaşmaktadır (48). ERM protein ailesi *Caenorhabditis elegans* ve insan da dâhil olmak birçok canlı ve ökaryotik hücrelerde bulunur. ERM ailesinin üzerinden ezrin, ilk izole edildiğinde bağırsak mikrovillus hücre iskeletinde küçük bir bileşen olarak tarif edilmiştir (49). Radiksin ise ilk olarak farelerde karaciğer hücrelerinde hücre yan yüzey bağlantılarında yer alan bir protein olarak tanımlanmıştır (50). Moesin'in ilk tanımlandığı yer ise sıgırların uteruslarında yer alan düz kas hücreleridir ve bu hücrelerde

moesin'in heparin bağlayıcı bir protein olarak görev aldığı gösterilmiştir (51). Bu aileye ait üç proteinin aminoasit sekansları birbirleriyle oldukça benzerlik (%70-85) göstermektedir (Şekil 6). Fonksiyonel ve yapısal özelliklerinden ötürü bu proteinler ERM protein ailesi olarak adlandırılmaktadır.

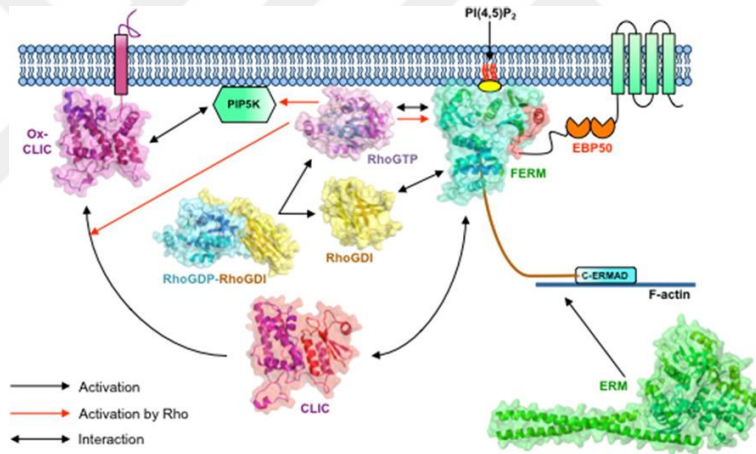


Şekil 6: ERM ailesi üyesi proteinlerin yapısı (52)

ERM protein ailesinden ezrin, midede, ince bağırsakta, böbrekler ve akciğerde yüksek düzeyde eksprese olurken, radiksin ince bağırsak ve karaciğerde, moesin ise dalak ve akciğerde bulunur (53). Fosforile olmayan durumlarda ERM proteinleri monomerler halinde bulunurlar ve molekül içi bağlantılarından dolayı diğer moleküllerle etkileşim için uygun konuma sahip değildirler. ERM protein ailesi üyelerinin aktif formları hücrelerdeki birçok olayda görev almaktadır. Ezrin'in insan plasental sinsityotrofoblast hücrelerine ait mikrovilluslarda yüksek düzeyde eksprese olduğu tespit edilmiştir. Ancak, radiksin'in lokalizasyonu ezrin ve moesin'den kısmen farklılıklar gösterir. Radiksin, ERM ailesi üyesi diğer iki protein'in aksine adherent bağlanmada rol alan proteinler şeklinde tanımlanmaktadır (48). Bu proteinler, hücre şeklinde oluşan değişiklikler, hücre adhezyonu ve tutunmada görev alır (54). Ezrin'in yaraların iyileşme süreci, hücre migrasyonu ve kortikal hücre iskelet şeklinin organizasyonunda rol alır. Ayrıca, mide bezlerinde yer alan pariyetal hücrelerdeki mide asidinin salgılanmasında rol alır. Radiksin ise membranda transportunda ve kanal organizasyonlarının şekillendirilmesinde ayrıca membranla hücre aktin filamentlerinin tutunmasını sağlamaktadır. Radiksinin kortikal tabakanın düzenlenmesinde de gerekliliği tanımlanmıştır. Moesin'in insanlarda nötrofil, monosit ve lenfositlerde diğer ERM ailesi üyelerinden daha yüksek düzeyde bulunmaktadır (55). Ezrin, kanser tiplerinin bazılarında oldukça yüksek düzeyde eksprese olmaktadır. Daha önce yapılmış in vitro çalışmalarda, ezrinin, kanser hücrelerinin invazyonu, migrasyonu, adhezyonu ve proliferasyonunda rolü

olduğu tespit edilmiştir (56). Ezrinin, overde şekillenen epitel kanserinde yoğun düzeydeki ekspresyonu tanımlanmıştır. Buna karşın, kolon kanserinde normal dokuyla karşılaştırıldığında tümör gelişen dokularda bu proteinin çok düşük düzeylerde eksprese edildiği görülmüştür. Radiksin ve moesin'in ise akciğer adenokanserlerin tanısında çok düşük düzeylerde eksprese olduğu bildirilmiştir (57).

Daha önceki çalışmalar doğrultusunda ERM aktivasyonunun Rho sinyal yolağı ile gerçekleştiği belirtilmiştir. Küçük bir GTP bağlayıcı protein olan Rho, plazma zarında ERM'nin lokalizasyonu için gereklidir (58). ERM'nin RhoA'ya bağımlı fosforilasyonu, membrana translokasyondan önce meydana gelir (59). ERM proteinleri aktin sitoskeletonunun reorganizasyonu sürecinde Rho'yu indirger (60,61). Rho CD44 ve ERM arasındaki ilişkiyi düzenler (62). RhoGDI (Rho GDP ayrışma inhibitörü) ERM proteinlerinin amino grup terminal alanına bağlanır (63). In vivo olarak ERM'nin RhoA bağımlı fosforilasyonu ve bunun sonucunda mikrovillus oluşumu PI4P5K kinaz aktivitesiyle gerçekleşir (Şekil 7) (61).



Şekil 7: ERM ailesi proteinlerinin fosforilasyon ve aktivasyonu (64).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Plasentaların Elde Edilmesi

Çalışmaya başlamak için Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 209 sayılı ve tarihli etik kurul onayı alındı. Tüm hastalar hasta veri gizliliği ve veri paylaşımı hakkında bilgilendirilip hastalardan plasenta temini için onam formu onayı alındı. Yirmi adet gestasyonel diabetes mellitus (GDM) ve yirmi GDM'li olmayan hastanın doğum sonrası plasentaları Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nden temin edildi. Çalışmada yaş aralığı 25-30 olarak tutuldu. Klinik olarak 04.07.2018 kriterlerini taşıyan hastalar GDM olarak değerlendirildi. Ameliyathaneden alınan plasentalar serum fizyolojik ile yıkadıktan sonra doku takibi için uygun koşullar altında %10'luk tamponlanmış nötral formaline alınarak Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı İmmunohistokimya Araştırma Laboratuvarına getirildi.

4.2. Rutin Histolojik Doku Takibi

Plasentalardan doku takibi için histolojik incelemeye uygun boyutlarda kesitler alındı. Alınan kesitler, içinde %10'luk nötral tamponlanmış formalin çözeltisi bulunan hastanın adı, protokol numarası ve tanısı yazılarak flakonlara koyuldu. Daha sonra örnekler fiksasyon solüsyonunda tespit işlemi için 18 saat bekletildi. Tespit aşamasından sonra doku parçaları formalin solüsyonundan alınıp çeşme suyu altında yıkandı. Örnekler %50, %70, %80, %90, %96'lık artan alkol serilerinden geçirildi. Kesitlerde 2x30 dakika tutulan örnekler alkolden uzaklaştırıldı. İnfiltrasyon için 60°C etüvde 3x45 dakika tutulan kesitler son olarak bloklara gömüldü. Parafin bloklardan yarı otomatik, rotari mikrotom (katalog no: Leica RM2265, Wetzlar, Germany) yardımıyla 5µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler ilk olarak Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyandı. Diğer kesitlere Ezrin, Radixin ve Moesin antikorları ile immün boyama uygulandı. Preparatlar Zeiss Imager A2 ve Zen 3.00 yazılım programı kullanılarak ışık mikroskopunda incelendi.

4.3. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Parafin bloklardan elde edilen kesitler ilk olarak 2x30 dakika deparafinize edildi. Kesitler %96, %90, %80, %70'lik azalan alkol serilerinde 15'er dakika bekletildi. Distile suya getirilen kesitler Hematoksilen boyasında 8 dakika bekletildi. Daha sonra kesitler çeşme suyu altında 5 dakika süreyle akan su ile yıkandı. Fazla suyu alınan kesitler Eosin boyamada 4 dakika süreyle sitoplazmik boyamaya tabi tutuldu. Artan alkol serilerinden (%70,%80) hızlı bir şekilde geçirilen kesitler %90, %96 ve %99'luk alkolde 1'er dakika bekletildikten sonra

şeffaflandırma işlemi için 3x15 dakika ksilende bekletildi. Şeffaflanan kesitler entellan ile kapatıldı.

4.4. Ezrin, Radixin ve Moesin proteinleri İmmun Boyama Protokolü

Parafin bloklardan alınan kesitler parafin depolimerizasyonu ve deparafinizasyonuna tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidre edildi ve distile suya getirildi. Antijen retrieval işlemi için kesitler Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonuna alınıp mikrodalga fırında 3x6 dakika ısıtıldı. Mikrodalga fırından alınan kesitler, soğuma işlemi için 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Kesitler daha sonra tamponlanmış fosfat salin (PBS) çözeltisine alındı. Bu sırada immunohistokimya barı hazırlanıp kesitlerin kurumaması için nemli bir ortam sağlandı. Kesitlerdeki dokular hidrofobik kalemle çizildi ve bara dizildi. Hidrojen peroksit (katalog no: TA-015-HP, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) solüsyonu kesitlere damlatılıp 20 dakika bekletildi. Kesitler PBS'e alındı ve 3x5 dakika süreyle yıkandı. Bara dizilen kesitlere Blocking solüsyonu (katalog no: TA-015-UB, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) damlatıldı ve 8 dakika beklendi. Kesitlerin üzerindeki solüsyon drene edilip primer antikolar 1:100 dilusyonda ezrin (katalog no: ab40839, abcam), radixin (katalog no: ab52495, abcam) ve moesin (katalog no: ab151542, abcam) damlatıldı ve +4°C degece boyunca inkubasyona bırakıldı. Ertesi gün kesitler +40C'den oda ısısına alınıp 30-60 dakika kadar beklenildi. Kesitler PBS' de 3x5 dakika yıkandıktan sonra bara dizilip Biotinli sekonder antikor (katalog no: TP-015-BN, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) ile 14 dakika boyunca reaksiyona tutuldu. Kesitler PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra Streptavidin-peroksidaz (katalog no: TS-015-HR, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) damlatılarak 15 dakika bekletildi. PBS ile 3x5 dakika yıkanan kesitlere 3,3'diaminobenzidine (DAB, katalog no: TA-001-HCX, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) damlatılıp 5-10 dakika boyunca bekletildi. Kesitler PBS ile 3x5 dakika bekletildi ve Hhematoksilen ile 45 saniye kadar zıt boyama yapıldı. Çeşme suyunda 5 dakika kadar yıkanan kesitler artan alkol serisinden hızlı geçirilip, ksilolde 3x20 dakika kadar bekletilip entellan (katalog no:107961, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) ile kapatıldı.

4.5. Western blot ve protein konsantrasyon tayini

4.5.1. Dokuların işlenmesi ve lizat total protein miktarının belirlenmesi

Doğumhaneden temin edilip dissekiye edilen plasenta örnekleri küçük parçalar haline getirildi ve maternal ve fötal yüzeyi içerisine alacak şekilde küp halindeki plasenta örnekleri şoklanarak donduruldu ve analizler gerçekleştirilene kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Blotlama gerçekleştirilmeden önce plasenta örnekleri sıvı azot içerisinde dövülerek

homojenize edildi. Elde edilen homojenatlardan 60 mg tartıldı ve 300 µl hacimdeki Proteaz kokteyli ve MMP inhibitörü içeren Ripa Buffer'a aktarıldı. Buz içerisinde 1 saat bekletilen örnekler protein konsantrasyon tayini için şoklandı ve -80 °C'ye aktarıldı. Protein konsantrasyon tayini için Bikinkoninik asit (BCA) metodu kullanıldı. Konsantrasyon tayini yapılırken SMARTTM BCA Protein Assay Kit (Intron Biotechnology) kullanıldı. Tüm basamaklar üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Protein konsantrasyon tayini gerçekleştirilirken mikropate metoduna göre yapıldı ve absorbans değerleri 562 nm'de ölçüldü. Standart olarak kit içeriğinde yer alan 2 mg/ml konsantrasyondaki BSA kullanıldı. Absorbans ölçümünü takiben konsantrasyonun standart eğrisi sınırları içerisindeki düzeye ulaşılan dek aynı işlemler tekrarlandı ve dilüsyon amacıyla proteaz kokteyli ve MMP inhibitörü içeren Ripa buffer ile bu işlem gerçekleştirildi. Eppendorflarda konsantrasyonları dengelenen örnekler elektroforez'e alınmak üzere -80 °C'de muhafaza edildi.

4.5.2. Western blot protokolü

Hazırlanan lizatlar elektroforezde yürütülmeden önce SDS-Page hazırlandı. Resolver ve stacker jeller hazırlanırken TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solution (BioRad) kiti kullanıldı. Kit içeriğinde bulunmayan APS ve TEMED en son eklendi. Stacker jel yükleme tankına aktarılırken 15'lik tarak jelin içerisine yerleştirildi. Her jel hazırlanırken bir önceki jelin polimerize olması için 30 dakika süreyle oda ısısında bekletildi. Jellerin polimerize olmasını takiben tarak çıkartıldı ve ilk kuyucuğa 4µl marker, diğer kuyucuklara 25 µg total protein yüklendi. Proteinlerin jel kuyucuklarına yüklenmesini takiben 20 dakika jelde yürütme işlemi gerçekleştirildi. Elektroforez sonrası jelde yer alan protein metanolde aktifleştirilen PVDF membrana aktarıldı. Membrana aktarım için TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions (BioRad) kiti kullanıldı. Transfer işlemi yarı ıslak yöntemi ile gerçekleştirildi ve aktarım Trans-Blot Turbo transfer sistemi ile gerçekleştirildi. Membrana transfer sonrası örnekler PBST'de 1x15 ve 3x5'er dakika süreyle yıkandı. Yıkama sonrası 1 saat süreyle 5% yağsız süt tozu ile blokaj yapıldı. Bloklama sonrası membran, β-actin, Ezrin Radiksin ve Moesin antikoları 1:1000 oranında dilüe edildi ve membran oda ısısında 2 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Daha sonra membran PBST'de 1x15 ve 3x5'er dakika süreyle yıkandı. Yıkama sonrası membran anti-Rabbit 1:10000 dilüsyonda sekonder antibody ile oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Sekonder antikor uygulaması sonrası membran PBST'de 1x15 ve 3x5'er dakika süreyle yıkandı. Bantların tespiti için membran ECL substrat ile 4 dakika süreyle inkübe edildi ve cihazda okuma gerçekleştirildi. Görüntüleme yapılan bantların

resimleri çekildi. Ayrıca her primer antikor uygulaması öncesinde NaOH içerisinde stripleme gerçekleştirildi.

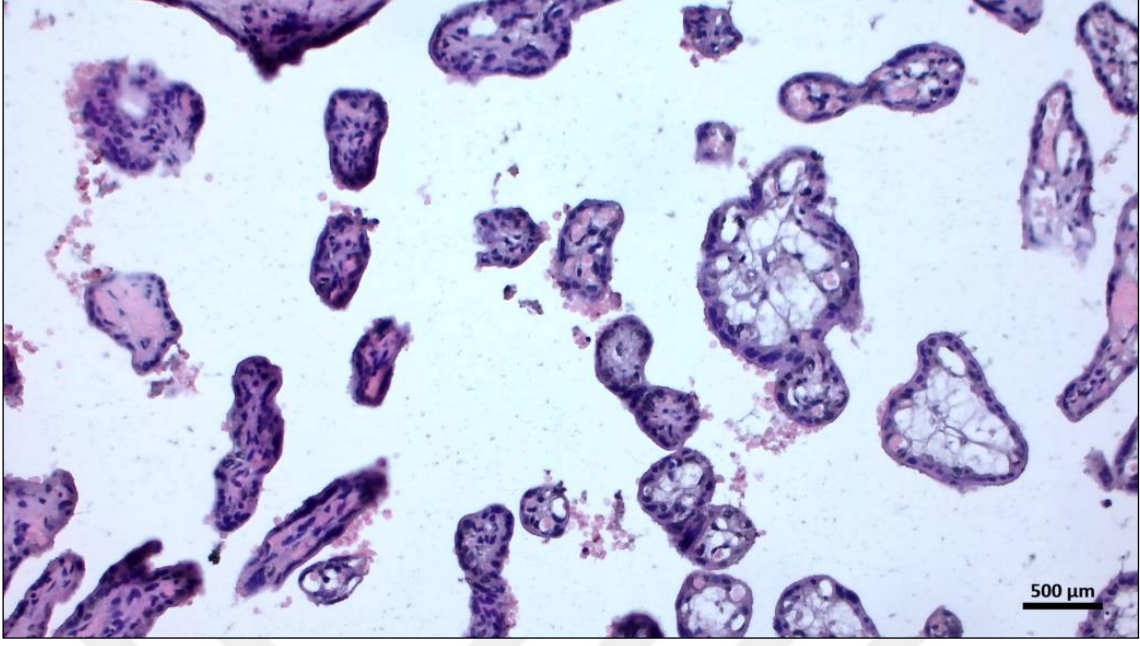


5. BULGULAR

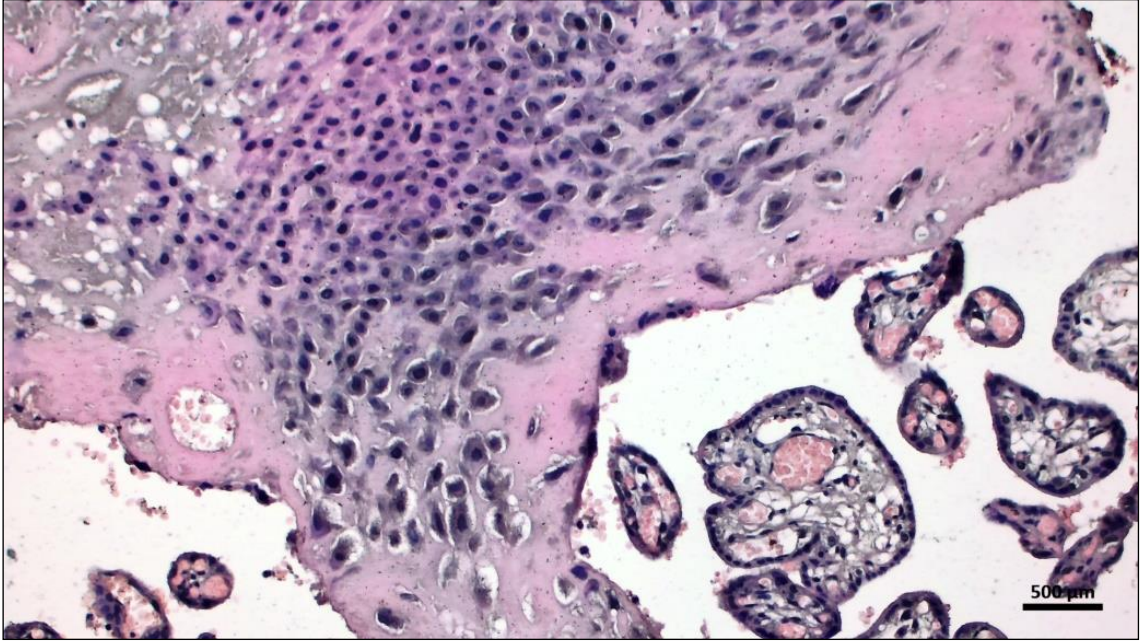
5.1. Histopatolojik Bulgular

Çalışmamızda temin ettiğimiz GDM'li olmayan annelerin plasentalarında histolojik yapının normal olduğu izlendi (Resim 1 ve 2). Bu plasentaların kesitlerinde plasental villusların, desidua'nın trofoblastik hücrelerin normal yerlerinde bulunduğu tespit edildi. Farklı boyutlardaki villöz stromada fetal kapillerler ve bağ dokusu içerisinde yer yer Hofbauer hücrelerinin varlığı görüldü. Sinsityotrofoblast hücrelerinin normal yerlerinde bulunduğu ve villusların fetal plasentadan maternal yüzeye doğru çıkıntı yaptığı görüldü. Villusların normal düzeyde sinsityal köprüler ve düğümler oluşturduğu tespit edildi. Desidual plak hücrelerinin normal şekliyle glikojen depo artığı olarak vakuoler bir görüntüde olduğu görüldü. Bu yönleriyle incelendiğinde GDM'li olmayan plasentalarda patolojik bir durum olmadığı görüldü.

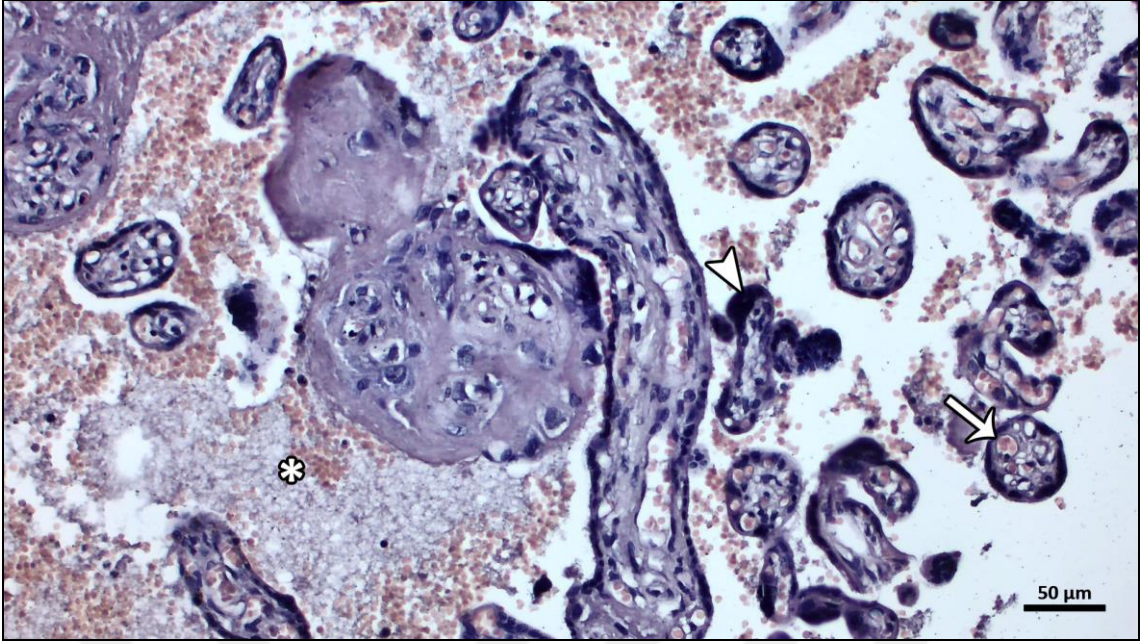
Işık mikroskopik incelememizde GDM'li plasentalarda ise yoğun patoloji ve morfolojik yapıda bozunumalar olduğu izlendi (Resim 3 ve 4). İntervillöz alandaki yoğun hemoraji GDM plasentaların önemli bulgularından biriydi. Ayrıca, villusların stromasında Hofbauer hücrelerinin sayısında artış olduğu ve villöz stromanın genel yapısının harabiyete uğradığı görüldü. Yer yer villusların sinsityotrofoblast hücrelerinin tamamen ortadan kalktığı, sinsityal köprü ve düğümlerin sayısında gözle görülür bir artış olduğu izlendi. Villöz kapillerlerde kısmi konjesyon ve dilatasyonun yoğun varlığı göze çarpıyordu. Hem sinsityotrofoblast hücrelerde hem de maternal desiduada yer alan hücrelerin çekirdeklerinin normal görüntünün dışına çıktığı ve şekillerinin deformeye uğradığı görüldü.



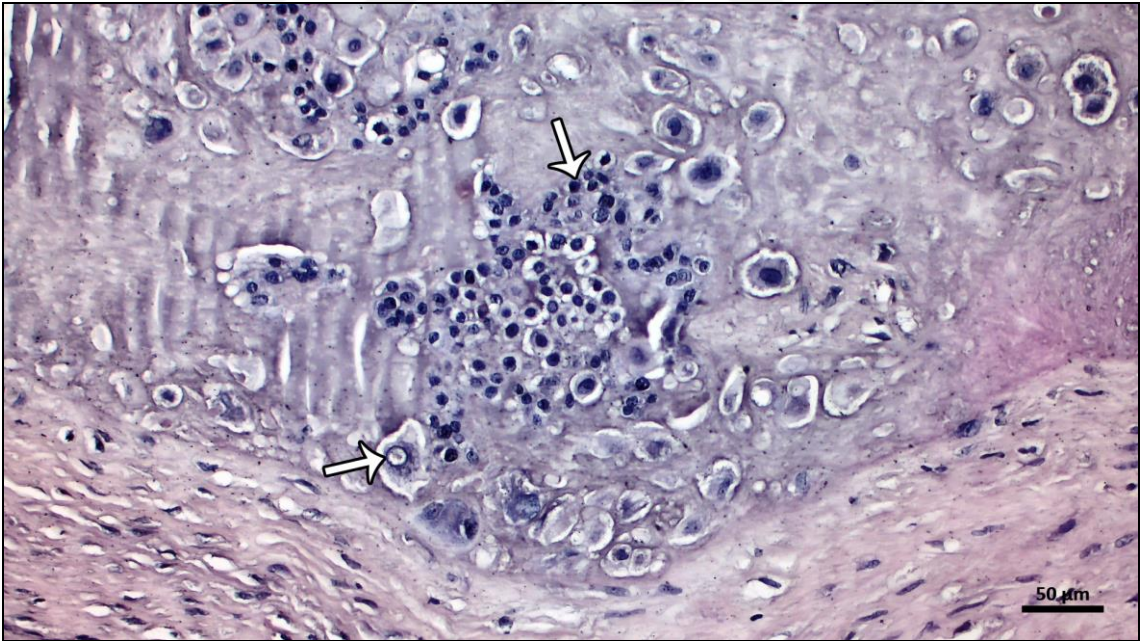
Resim 1: Kontrol plasentalarında f3tal y3zey serbest villuslarının mikroskopik g3r3nt3s3. (H&E, Bar: 500 µm).



Resim 2: Kontrol plasentalarında maternal y3zeyde desidua ve villusların mikroskopik g3r3nt3s3. (H&E, Bar: 500 µm).



Resim 3: GDM'li plasentada serbest villusların mikroskopik görüntüsü. Intervillöz alanda yoğun hemoraji (*), villöz kapillerlerde yer yer dilatasyon ve konjesyon (→), sinsityal düğüm ve köprülerin sayısında belirgin artış (∧).(H&E, Bar: 50 μm).



Resim 4: GDM'li plasentada desidua'nın mikroskopik görüntüsü. Bazal desiduada yer alan hücrelerde dejenerasyon ve hücre nükleuslarında piknotik görünüm (→).(H&E, Bar: 50 μm).

5.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

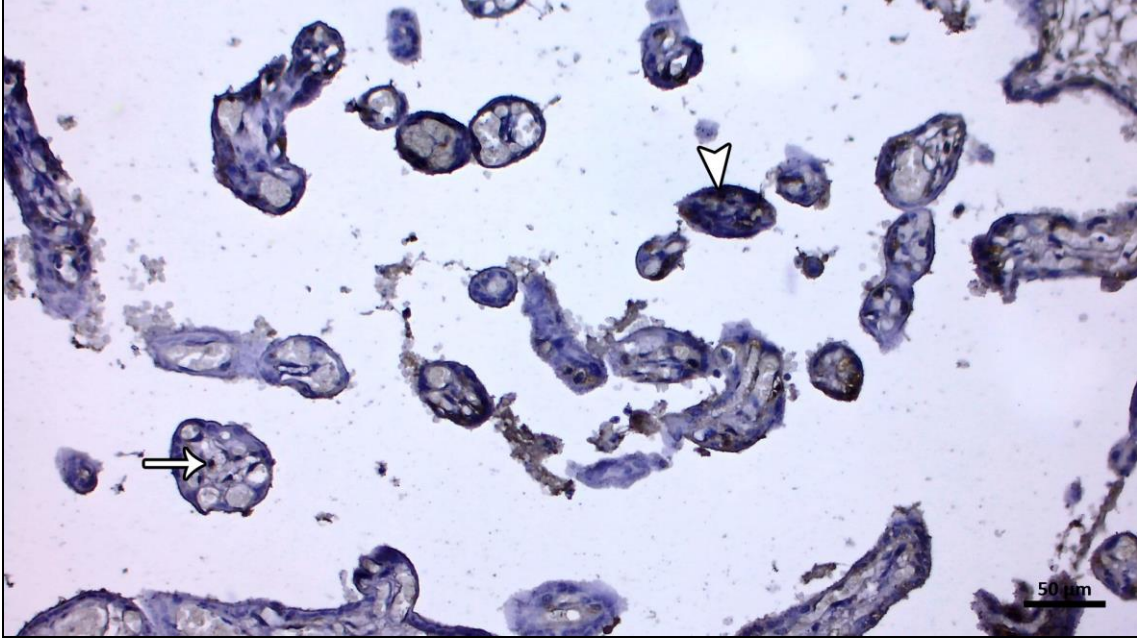
Plasenta örneklerinde yaptığımız Ezrin, Radiksin ve Moesin immunohistokimya boyama sonucunda gruplar arasında ekspresyon düzeylerinde gözle görülür farklılıklar olduğunu tespit ettik. Ayrıca ERM protein ailesi üyeleri olan ezrin, radiksin ve moesin'in kısmen benzer kısmen de farklı immun pozitivite alanlarına sahip olduğunu gördük.

Kontrol grubu plasentalarında ezrin'in sinsityotrofoblast hücrelerinin hem perifer hem de villöz kutbunda ekspresyon pozitif olduğu görüldü (Resim 5). Yer yer pozitivitenin villöz kapiller endotellerinde de bulunduğu tespit edildi. Villöz stromada ise bazı villusların stromasındaki hücrelerde pozitiflik izlense dahi genel olarak kontrol plasentaların stromalarının ve stromal hücrelerinin ezrin yönünden negatif olduğu görüldü. Villöz kapillerlerde ise yer yer kan doku hücrelerinin ezrin yönünden pozitif sinyaller ürettiği tespit edildi. Maternal desidua hücrelerinde de ezrin pozitif ve negatif alanlar izlendi. Desidual plakta yer alan stromanın tamamen negatif olduğu, desidual hücrelerin ise ezrin yönünden pozitif olduğu görüldü. Desidual hücrelerde immün pozitivite'nin nükleus lokalizasyonu yer yer görüldü. Ayrıca, hücre membranlarının her yönünde ezrin pozitiflik izlendi (Resim 6).

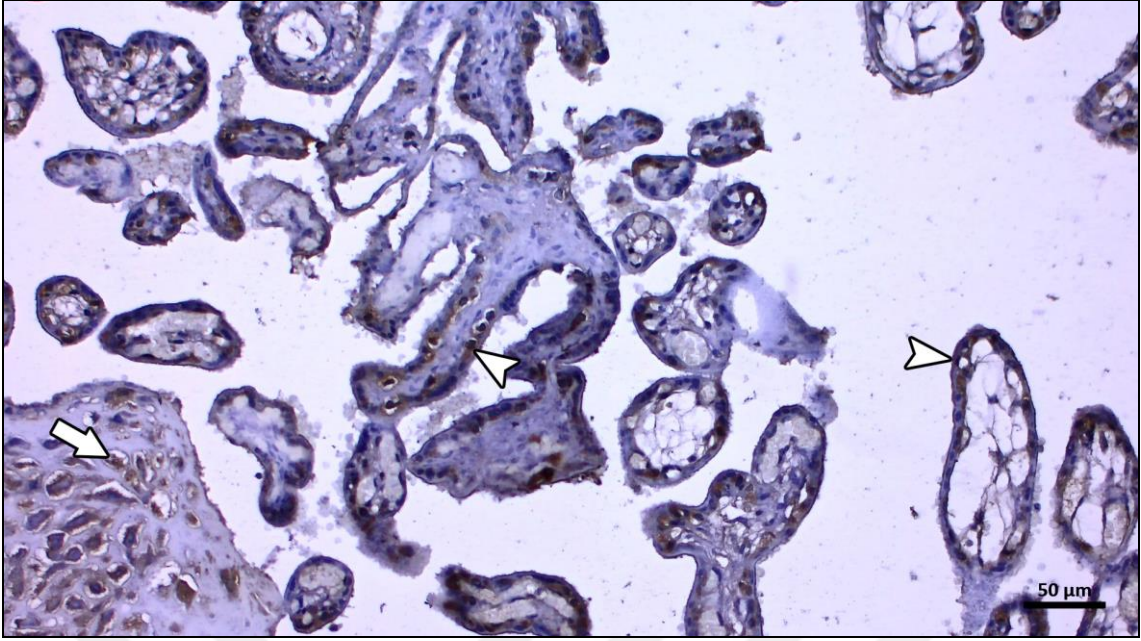
Kontrol plasentalarında radiksin immunohistokimya boyamalarımız sonucu yaptığımız incelemede villöz sinsityotrofoblastlarda pozitiflik olduğu görüldü (Resim 7). Trofoblastik hücrelerde immün reaktivite genellikle hücrelerin periferlerinde yani plazma membranlarına yakın bölgelerdeydi. Villusların detaylı değerlendirmesinde stromal alanda bir reaksiyon oluşmadığı izlendi ancak çok nadir olmakla beraber stromal hücrelerde yer yer reaksiyon varlığı tespit edildi. Yine villöz kapillerlerde radiksin pozitifliğin varlığı izlendi. Maternal desiduada ise radiksin pozitifliğin ezrine benzer şekilde desidual hücrelerde bulunduğu görüldü, stromal alanlar ise immün reaktivite yönünden negatifti (Resim 8). Desidua hücrelerinde radiksin pozitifliğin yer yer desidual sitoplazma ancak çoğunlukla plazma membranına yakın lokalize olduğu tespit edildi.

Moesin immun reaktivitenin kontrol grubunda villöz bağ dokusu hücrelerinde olduğu tespit edildi. Fibroblast ve hofbauer hücrelerinin de moesin yönünden pozitif olduğu izlendi. Yer yer sinsityotrofoblastlarda da pozitivite tespit edilse de çoğunlukla villöz trofoblastların moesin yönünden negatif olduğu görüldü (Resim 9). Kontrol grubundaki sinsityal düğümlerde de moesin ekspresyonu mevcuttu. Plasental desidual plakta moesin ekspresyonu dağılımı plakta yer alan kapillerlerin endotellerinde tespit edildi. Ayrıca, maternal yüzeyde desidual plak içerisinde infiltre olan trofoblastik hücre kümelerinde de moesin ekspresyonu pozitif izlendi. Desidua hücrelerinde ise yer yer pozitiflik görülsede bu hücrelerin çoğunluğu moesin yönünden negatifti (Resim 10).

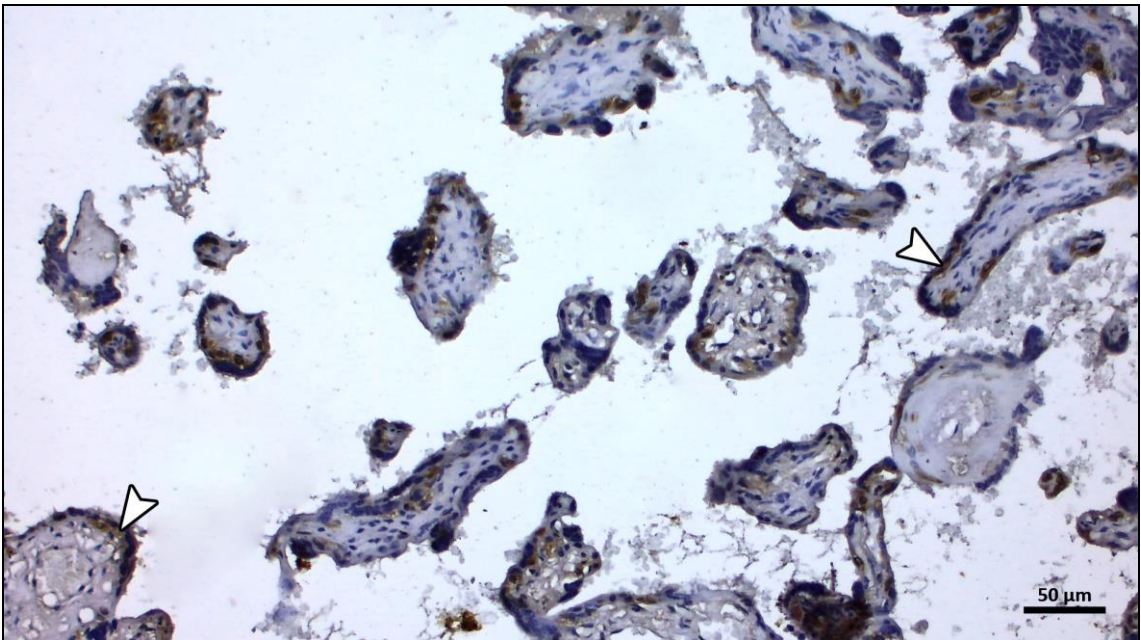
GDM'li plasentalarda ezrin ekspresyonunun kontrol grubuyla karşılaştırıldığında immün reaktivite lokasyonlarının değişiklik göstermediği ancak ekspresyon yoğunluğunun azaldığı gözle görülür durumdaydı (Resim 11 ve 12). Ayrıca radixin ve moesin ekspresyonlarının immunohistokimyasal analizleri bu proteinlerin GDM ile ekspresyon bölgelerinin değişmediği ancak değişen oranlarda ekspresyonda azalmanın olduğu tespit edildi (Resim 13-16).



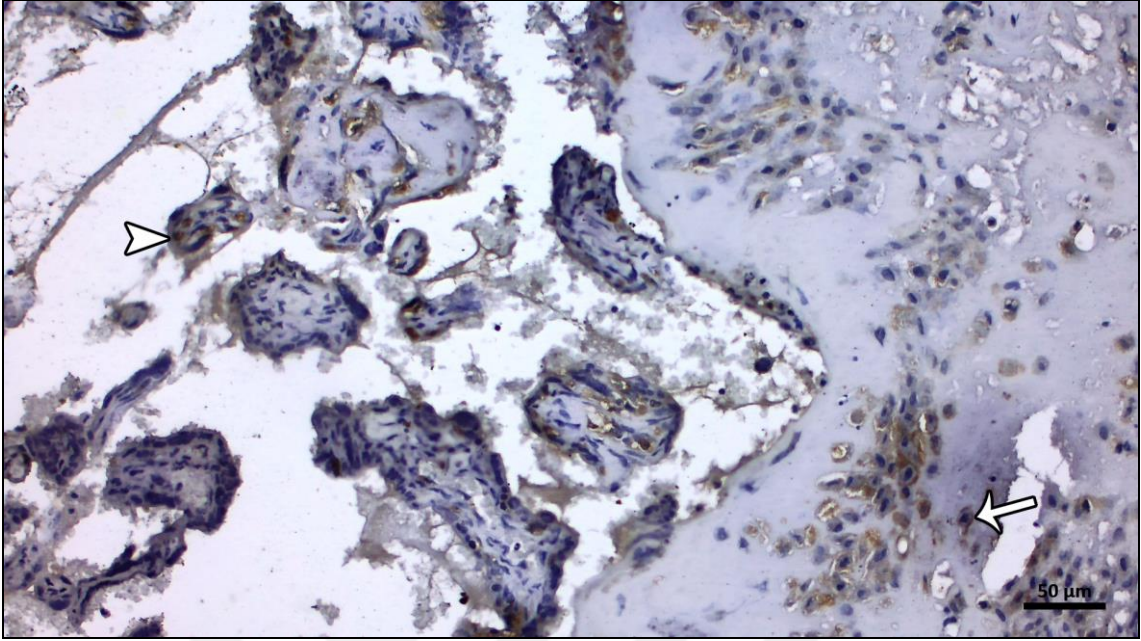
Resim 5: Kontrol grubu serbest villuslarda ezrin ekspresyon pozitif morfolojik bölgeler. Sinsityotroblastlarda (\wedge) ve villöz stromada lokalize hücrelerde (\rightarrow) pozitif reaksiyon. (Boyama: Ezrin immünohistokimya, zıt boyama: hematoksilen. Bar: 50 μ m).



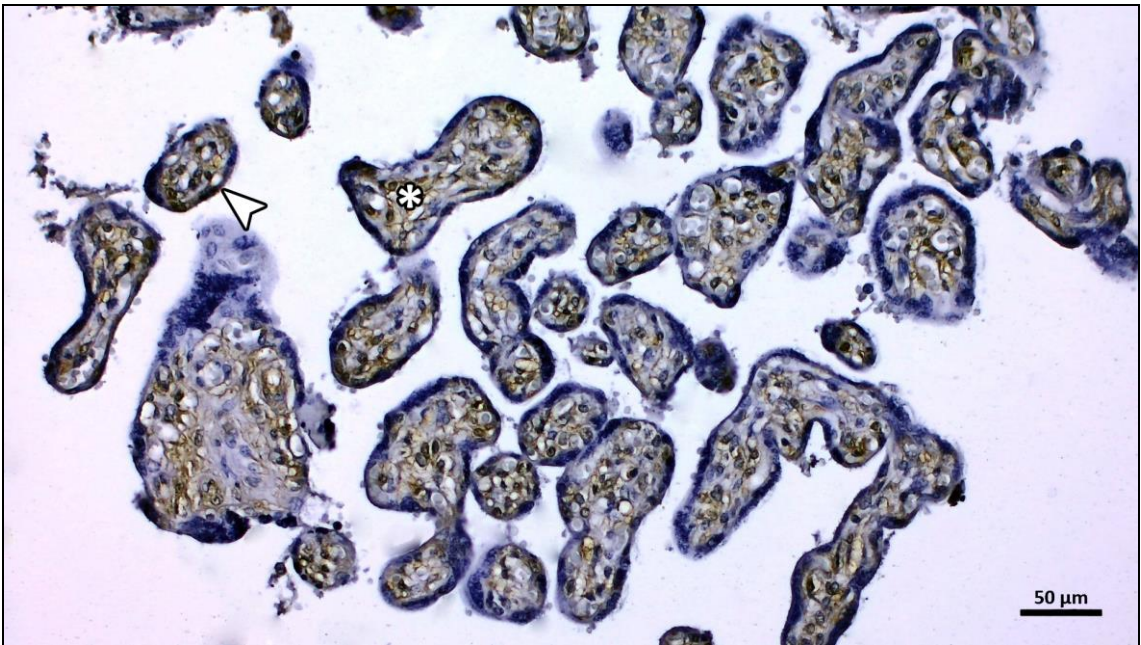
Resim 6: Kontrol grubu maternal desidua ve maternal yüzeye yakın villuslarda ezrin ekspresyonu izlenen bölgeler. Sinsityotrofoblastlarda (∧), ve desidua hücrelerinde (⇒) pozitif reaksiyon. (Boyama: Ezrin immünohistokimya, zıt boyama: hematoxilen. Bar: 50 μm).



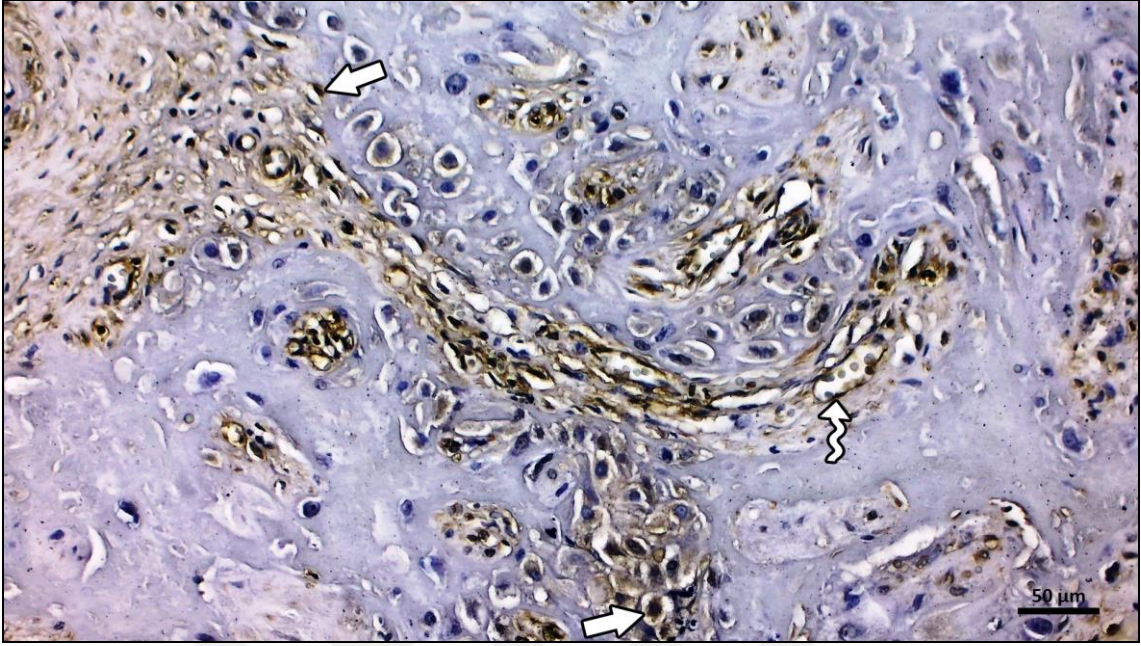
Resim 7: Kontrol grubu serbest villuslarında radiksin ekspresyon bölgeleri. Sinsityotrofoblastlarda (∧) pozitif reaksiyon. (Boyama: Radiksin immünohistokimya, zıt boyama: hematoxilen. Bar: 50 μm).



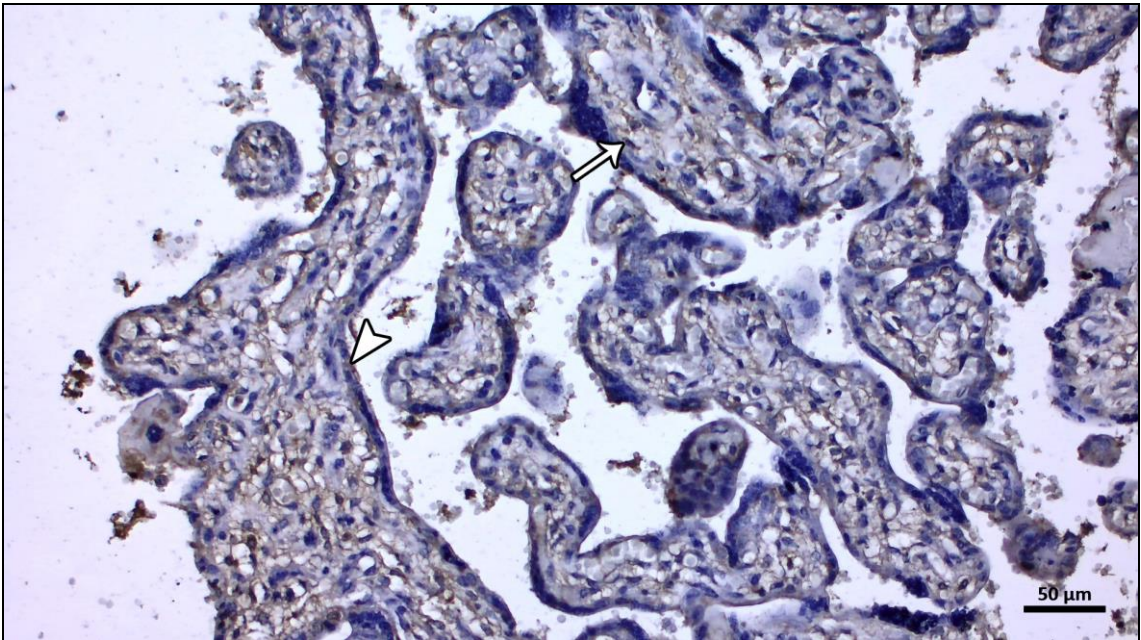
Resim 8: Kontrol grubu desidua ve villuslarında radiksin pozitivite. Sinsityotrofoblastlarda (↖) ve maternal desidua hücrelerinde (→) radiksin pozitiflik. (Radiksin immünohistokimya, zıt boyama: hematoxilen. Bar: 50 µm).



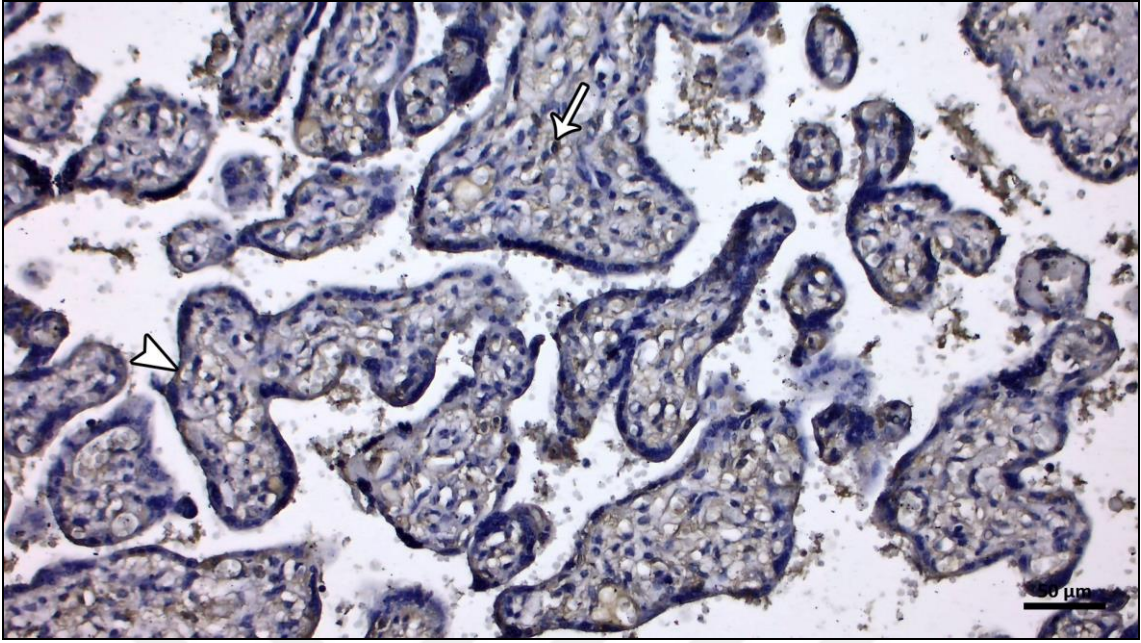
Resim 9: Kontrol grubu serbest villuslarda moesin ekspresyonunun mikroskopik görüntüsü. Sinsityotrofoblastlarda (↖) ve villöz stromada (*) pozitiflik. (Boyama: Moesin immünohistokimya, zıt boyama: hematoxilen. Bar: 50 µm).



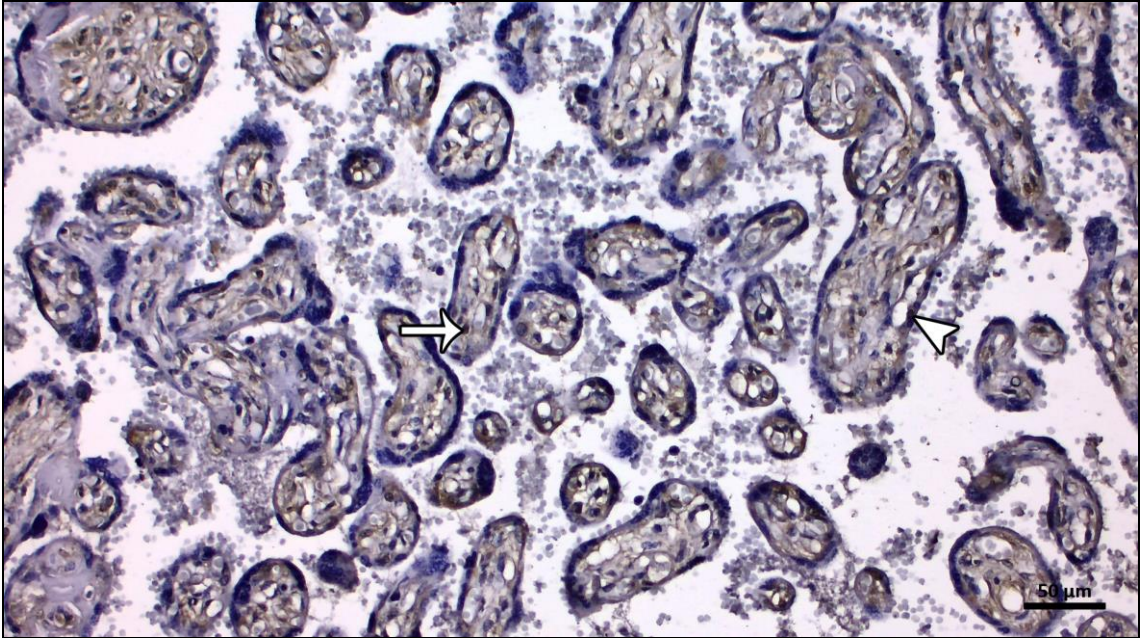
Resim 10: Kontrol grubu desiduada moesin immunohistokimya alanları. Maternal desidua hücrelerinde (\Rightarrow) ve spiral arterlerin kapillerlerinde (kivrımlı ok) moesin pozitiflik. (Boyama: Moesin immünohistokimya, zıt boyama: hematoksilin. Bar: 50 μ m).



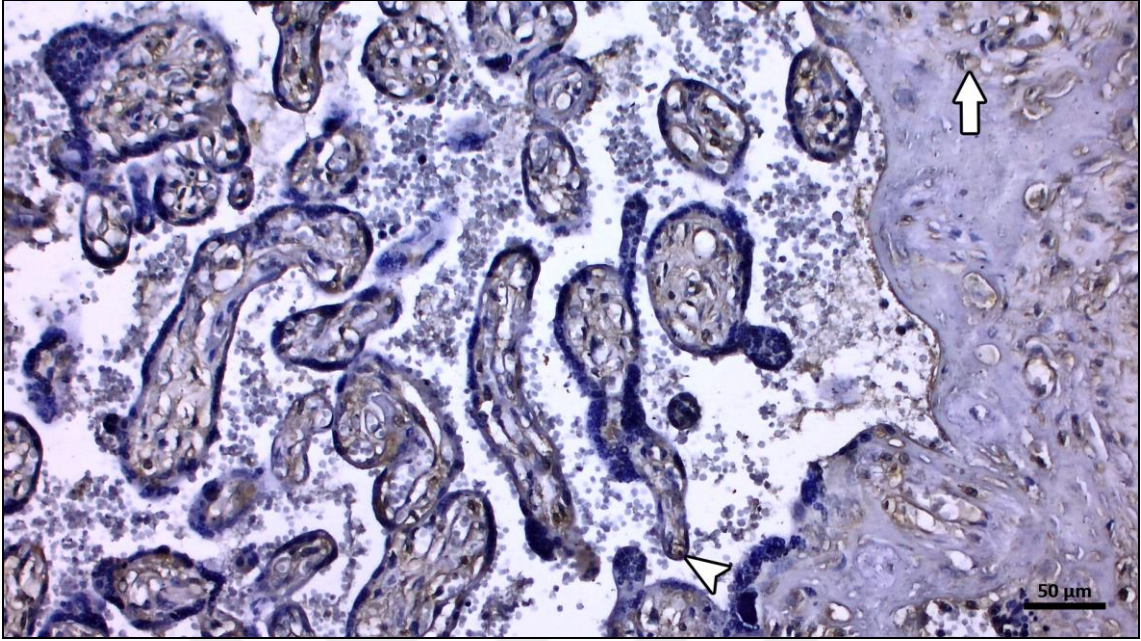
Resim 11: GDM grubu serbest villuslarda ezrin ekspresyonunun mikroskopik görüntüsü. Sinsityotrofoblast hücrelerinde (∇) ve villöz stromada yer alan hücrelerde (\rightarrow) düşük düzeyde ezrin pozitifite. (Boyama: Ezrin immünohistokimya, zıt boyama: hematoksilin. Bar: 50 μ m).



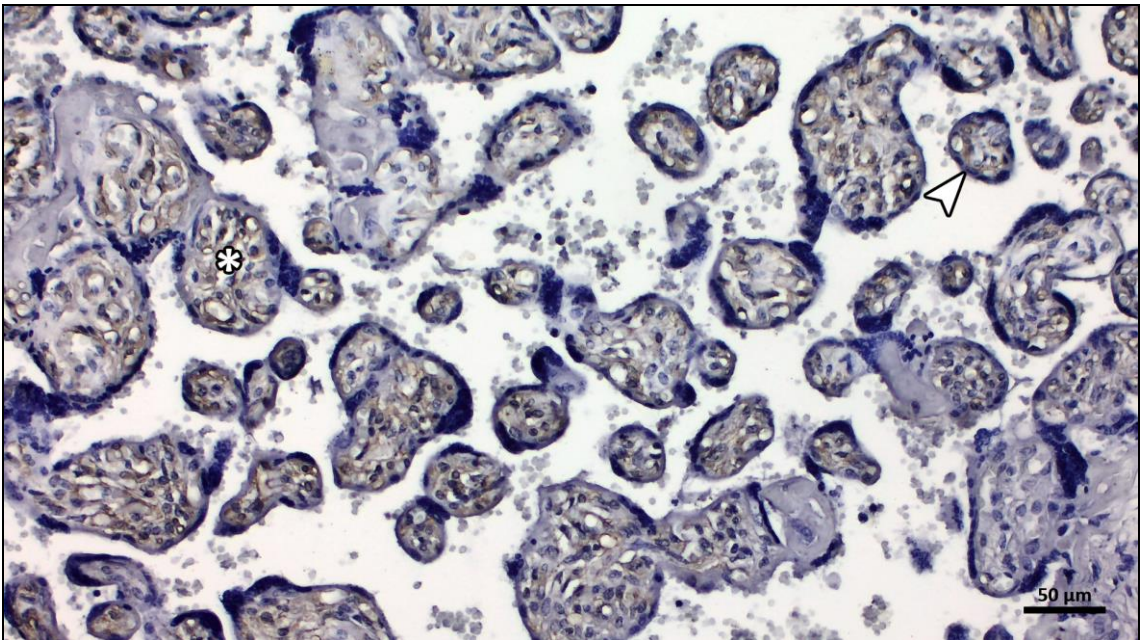
Resim 12: GDM grubu serbest villuslarda ezrin ekspresyonunun mikroskopik görüntüsü. Sinsityotrofoblastlarda (↖) ve yer yer villöz stromada yer alan hücrelerde (→) düşük pozitiflik. (Boyama: Ezrin immünohistokimya, zıt boyama: hematoksilen. Bar: 50 µm).



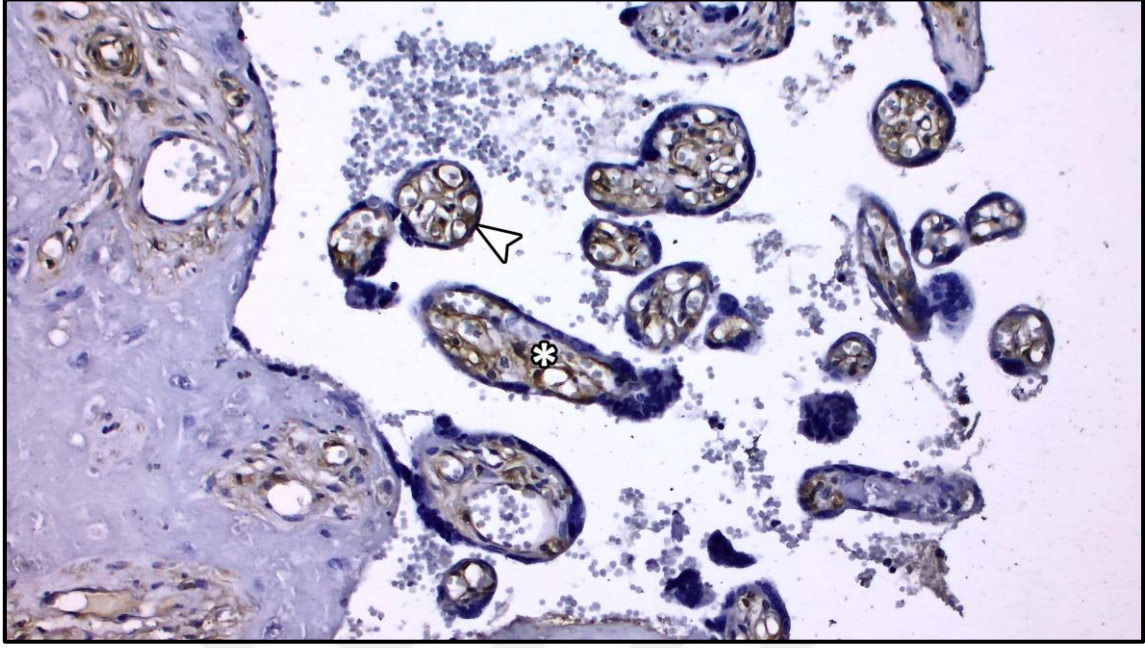
Resim 13: GDM grubu serbest villuslarda radixin ekspresyonunun mikroskopik görüntüsü. Sinsityotrofoblastlarda (↖) ve villöz stromada yer alan hücrelerde (→) düşük düzeyde ekspresyon. (Boyama: Radixin immünohistokimya, zıt boyama: hematoksilen. Bar: 50 µm).



Resim 14: GDM grubu villus ve desidua da radiksin ekspresyonunun mikroskopik görüntüsü. Sinsityotrofoblastlarda (↘) ve maternal desidua hücrelerinde (⇒) zayıf ekspresyon. (Boyama: Radiksin immünohistokimya, zıt boyama: hematoksilin. Bar: 50 µm).



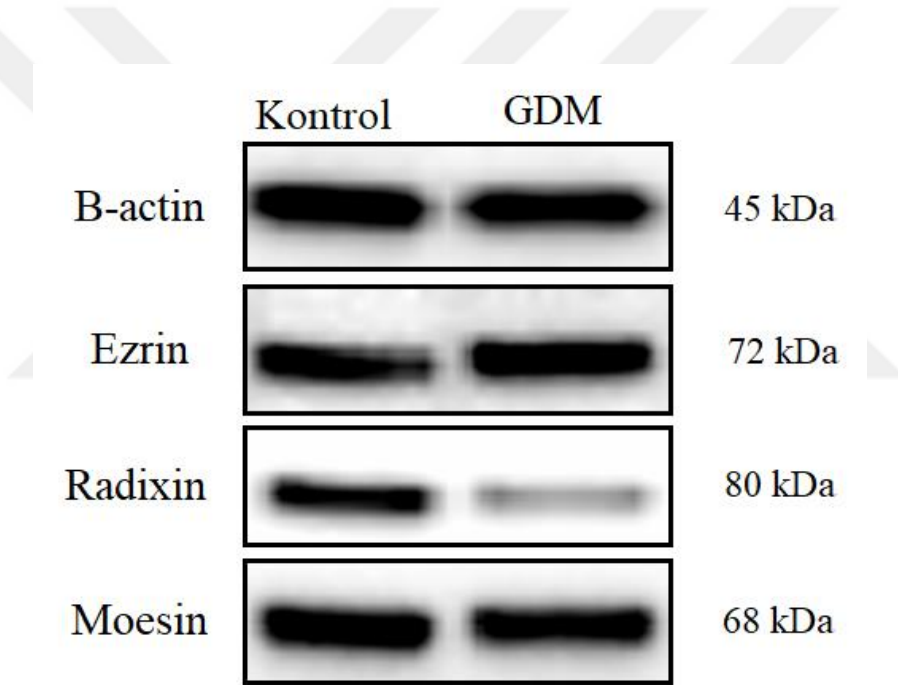
Resim 15: GDM grubu serbest villuslarda moesin pozitif alanlar. Sinsityotrofoblastlarda (↘) ve villöz stromada (*) düşük düzeyde moesin pozitive. (Boyama: Moesin immünohistokimya, zıt boyama: hematoksilin. Bar: 50 µm).



Resim 16: GDM plasentalarında moesin immunohistokimya. Serbest villusların kapiller endotellerinde (*) ayrıca yer yer sinsityotrofoblastlarda (↖) pozitif sinyaller. (Boyama: Moesin immünohistokimya, zıt boyama: hematoksilen. Bar: 50 µm).

5.3. Western blot Bulguları

Plasenta örneklerinde yapılan western blot analizi sonucunda ERM ailesi üyesi olan, ezrin radiksin ve moesin proteinlerinin çeşitli düzeylerde eksprese edildiği konfirme edildi. İmmunohistokimyasal incelemelerimizde bu proteinlerin ekspresyon alanları incelendi ve kontrol ile GDM plasentaları arasındaki farklılıklar göz önünde bulunduruldu. Western blot analizimiz sonucunda da bu proteinlerin çeşitli düzeylerde her iki grupta yer alan plasentalarda da eksprese olduğu gözlemdi (Resim 17). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Ezrin bant kalınlığının yakın düzeyde olduğu sonucuna ulaşıldı. Ancak Moesin ve özellikle radiksin protein ekspresyon düzeylerinin GDM grubunda belirgin şekilde düşüş gösterdiği bant kalınlıkları göz önünde bulundurularak tespit edildi.



Resim 17: Western blot analiz sonuçları.

6. TARTIŞMA

Gestasyonel diabetes mellitus (GDM) gebelik sürecinde ortaya çıkan ve teşhis konulup doğum sonrasında düzelen glukoz intölerans durumudur. Gebelik esnasında şekillenen bu rahatsızlık GDM olabileceği gibi latent evrede yer alan Tip I DM veya Tip II DM kaynaklı olabilir (65). GDM'nin günümüzdeki prevalansı tam olarak bilinmemektedir ancak bu konuda çeşitli istatistiksel veriler söz konusudur. Ayrıca, fizyopatolojik özelliklerinin benzer olmasından dolayı GDM prevalansının, Tip II DM prevalansı ile korele halde olduğu bilinmektedir (66). Popülasyon yoğunluğu ve kullanılan test yöntemlerine bağlı olarak gebeler arasında GDM'nin görülme yoğunluğu 1-14% arasında değişiklik göstermektedir (67).

GDM'li plasenta GDM'li olmayan plasentaya göre yoğun patolojik değişiklikler barındırmaktadır. Benirschke ve ark. GDM'li plasentalarda şekillenen villöz patolojiyi anormal villus gelişimi (villous maldevelopment) olarak tanımlamıştır (68). Bu patolojik durumda villus normalde olması gerektiğinden daha geniş ve içerisindeki yoğun ödem ile karakterizedir. Ayrıca GDM plasentalarında Gheorman ve ark. villöz kapillerlerde yoğun konjesyon ve dilatasyon tanımlamış ve bu patolojik durumun term dönemine gelen plasentadaki immatür villuslarla ilişkili olduğunu belirtmiştir (69). Villöz stromada ayrıca plasenta makrofajları olan hofbauer hücrelerinin sayısındaki artış tanımlanmış ve bu artışın inflamasyon ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (70). Younes ve ark. GDM'li plasentada trofoblast ve kapiller endotel bazal membranlarında kalınlaşma ve fibrinoid yapıların sayısında artış olduğunu bildirmiştir (71). Rudge ve ark. ise GDM'li plasentada şekillenen 9 patolojik bulguyu bildirmiştir (72). Bunlar; sistoid dejenerasyon, konjesyon, villöz ödem, intervillous fibroz, kalsifikasyon, fokal hiyalin dejenerasyonu, dismatürite, fokal amnionitis, endarterit şeklindedir. Başka bir çalışmada fetoplasental anormal anjiyogenezin varlığını tanımlamıştır. Mayhew ve ark. anormal anjiyogenezisi villöz kapillerlerin sayısı, lümen çapı ve uzunluğundaki artış ile göstermiştir (73).

Bizim yaptığımız çalışmamızda da GDM'li plasentada, GDM'li olmayan plasenta ile karşılaştırıldığında yoğun histopatolojik değişikliklerin varlığı izlendi. Villöz immatürasyon'un ve anjiyogenik anormalliklerin önemli bulgularından olan villöz ödem ve kapiller dilatasyon GDM'li plasentalarda oldukça yaygındı. Ayrıca villöz kapillerlerde konjesyon yaygın durumdaydı. Stromal alanlarda hofbauer hücre sayısında gözle görülür bir artış tespit edildi. Hem sinsityotrofoblast hücrelerinde hem de villöz bağ dokusundaki hücrelerde yer yer piknotik nükleuslu hücrelerin varlığı izlendi. Serbest villuslarda fibrinoid yapıların, sinsityal düğüm ve köprülerin sayısında artış olduğunu gözlemledik. Ayrıca

GDM'li plasentalarda tespit ettiğimiz önemli bulgulardan birisi intervillöz hemoraji'nin varlığıydı. Maternal plasentadaki desidua hücrelerinde de tıpkı villus hücrelerindeki benzer şekilde dejeneratif değişiklikler gözlemlendi. Nükleusların yer yer piknotik oluşu ve desidual plak içerisine nüfuz eden lenfosit infiltrasyonundaki artış göze çarpıcı düzeydeydi. Bu patolojik değişiklikleri göz önünde bulundurduğumuzda elde ettiğimiz verilerin literatür ile uyumlu olduğu söylenebilir.

GDM'li plasentada gözlenen patolojik değişikliklerin başında trofoblast kökenli hücreler ve fetal kapillerler endotelinin fonksiyon ve yapısındaki değişikliklerdir. Hücre bir bütün olarak elinde alındığında hücre membranı ve hücre iskeletinin temel yapısını koruması fonksiyonel özellikleri yönünden hayati derecede önemlidir. Hücre morfolojisi ve fonksiyonu'nun bir bütün olduğu ele alındığında ERM proteinlerinin plazma membranı ile olan ilişkisi oldukça önemli bir duruma gelmektedir.

Ezrin, radiksin ve moesin proteinleri (ERM) hücre korteksini membran komponentlerine ve aktine bağlamaktadır (74,75). Ayrıca bu proteinlerin plazma membranı ve hücre içi yapılarla arasında ilişkisini destekleyen ERMBMPs (ERM bağlayıcı membran proteinleri) yardımcı proteinler tanımlanmıştır (76). Eritrosit 4,1. süperfamilyasının üyesi olan ERM proteinleri, paketlenmiş halde bulunan NH₂ (FERM) uç bölgesinin varlığıyla karakterizedir. Bu bölgeler çeşitli reseptörler (CD43, CD44, CD95 ve CD146) gibi membrane proteinlerinin sitoplazmik bölgeleriyle ve ICAM-2, P-selektin ve L-selektin gibi adezyon molekülleriyle ilişki halindedir (77-82). ERM proteinleri inaktif sitoplazmik proteinler halinde bulduklarında, proteinlerin yapısındaki COOH uç bölgeleri, FERM alanlarını baskılar. Ancak proteinlerin yapısındaki threonine rezidüellerinin fosforilasyonu sonrası bu maskeleyici uç bölgeler F-aktin bölgelerine tutunmak suretiyle bu bağlayıcı proteinleri aktifleştirir (83). ERM proteinleri farklı hücreler tarafından çeşitli düzeylerde sentezlenmektedir (84-86). Epitel hücreleri ağırlıklı olarak ezrin, endotel hücreleri moesin, hepatositler ise çoğunlukla radiksin eksprese eder (48,87,88). ERM ailesi üyesi olan proteinler morfogenezis, endositoz/egzositoz, adhezyon ve migrasyon gibi çeşitli hücrel aktivitelere rol alır (89). Son dönemlerde genomik tarama, mRNA ve proteomik analiz esaslı yapılan çalışmalar, diyabet ve diyabetik komplikasyonların şekillenmesinin ERM proteinlerinin anormal düzeylerde ekspresyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir (90-92). Organlarda farklı düzeylerde ekspresyonu biliniyor olsa da, bu protein ailesi üyelerinin insan hücrelerinin çoğunda kendine özgü düzeylerde eksprese olduğu bildirilmiştir (48). Bu protein ailesi üyelerinden ezrin; bağırsak, mide, akciğer ve böbreklerde yüksek düzeyde bulunmasına rağmen, en yoğun düzeyde akciğer ve dalakta eksprese olur, ayrıca radiksinin ise en yoğun

gözlendiği organlar karaciğer ve bağırsaklardır. Ayrıca ezrin epitel ve mezotel hücrelerinde eksprese olurken moesin endotel hücrelerinde fonksiyonel olacak düzeyde eksprese olmaktadır (53,93). Bağırsak epitelinin fırçamsı kenarı sadece ezrin eksprese ederken hepatositler ERM ailesi proteinlerinden sadece radiksin yönünden pozitifdir (87). ERM protein ailesinin plasental fonksiyonu ve GDM ile ilişkili yapılmış çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bizim yaptığımız çalışmada ERM protein ailesi üyeleri olan ezrin, radiksin ve moesin'in çeşitli düzeylerde hem GDM'li olmayan hem de GDM'li plasentada eksprese olduğunu gözlemledik. Subselüler düzeyde, her üç ERM ailesi üyesi olan proteinin de mikrovillus, filopod ve membran katlantıları gibi aktin yönünden zengin yüzey yapılarında gözlenmektedir (94,95). Daha önce yapılmış immünoelektron çalışmalarda ezrin'in özellikle mikrovilluslarda lokalize olduğu ancak hücre membranında kaplı hücre transportunda görev alan çukur bölgelerinde fonksiyonel olmadığı tespit edilmiştir (48). Radiksin'in hücresel düzeyde lokalizasyonunun ise ezrin ve moesin'den farklı olduğu bildirilmiş ve bu proteinin özellikle adherent tipi hücre yan bağlantı komplekslerinde bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca kültüre edilmiş hücrelerde fokal bağlantılarda, hücre bölünmesi sırasında oluşan membran kıvrımlarında ve kontraktıl halkalarda tespit edilmiştir (53,93). Ancak bu proteinlerin lokalizasyonları henüz tam olarak kesinleştirilememiş ve literatürde ihtilaflara neden olmuştur (96). Bizim çalışmamızda Ezrin'in plasental villuslardaki sinsityotrofoblast hücrelerinin membranlarında, maternal desiduanın ise hem sitoplazma ve hücre membranında, yer yer ise desidua hücrelerinin nükleuslarında eksprese olduğunu gözlemledik. GDM grubunda bu ekspresyon lokalizasyonları değişmemekle beraber hem immunohistokimyasal hem de western-blot analizlerimiz bu protein miktarının GDM'li plasentalarda azaldığını göstermiştir. Çalışmamızda radiksin immunohistokimya boyamalarımızda bu proteinin ezrine benzer şekilde sinsityotrofoblastların sitoplazma ve muhtemelen hücre membranlarında varlığını tespit ettik. Ancak literatürde yer alan radiksin ile ilgili adherent hücre yan bağlantı yapısında görev aldığına dair elde ettiğimiz hücrelerdeki lateral pozitifliğin yanı sıra sinsityotrofoblastları intervillöz alanlara bakan periferel bölgelerinin de radiksin yönünden pozitif olduğunu gözlemledik. Ayrıca bazı villus stromasında yer alan hücrelerin de radiksin yönünden pozitif olduğunu tespit ettik. Maternal desiduada ise bazı hücrelerin radiksin negatif olduğu, bazı hücrelerin ise hücre membran düzeyinde pozitif olduğunu izledik. Western blot ve immunohistokimya analizlerimizde GDM'li olmayan ve GDM'li annelerin plasentalarında radiksin ekspresyon düzeylerinin anlamlı şekilde değiştiğini gördük. Her ne kadar ekspresyon lokalizasyonları değişirse de GDM'li plasentada radiksin'in western blot bant kalınlığının ciddi anlamda azaldığını tespit ettik. Çalışmamızda moesin proteininin immunohistokimyasal

değerlendirmesinde GDM'li olmayan plasentalarda sinsityotrofoblast hücrelerinin moesin yönünden düşük düzeyde pozitif olduğunu gözlemledik ancak villöz kapiller endotellerinin ise bu protein yönünden pozitif olduğu oldukça belirgindi. Maternal desiduanın ise moesin yönünden negatif olduğunu izledik. Çalışmamızda ayrıca moesin ekspresyon düzeyinin radiksin kadar olmasa da GDM'li annelerin plasentalarında ekspresyon yönünden azalma eğiliminde olduğunu hem immunohistokimyasal hem de western blot analizleriyle tespit ettik.

Literatür ile karşılaştırdığımızda çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular kısmen tutarlılık kısmen ise farklılık göstermektedir. Tsukita ve Hieda'nın ayrıca Funayama ve ark.'nın yaptığı çalışma sonuçlarına göre ezrin'in epitelyal ve mezotelyal ekspresyon pozitifliği plasental dokudaki sinsityotrofoblastların pozitifliğiyle tutarlılık göstermektedir. İmplantasyon öncesi trofoblastik hücrelerin ektodermal kökeni ve epitel hücrelerinin ezrin yönünden pozitif olması bu protein'in ektodermal hücre formasyonu ve fonksiyonunda doğrudan etkili ve etkin olabileceğini düşünmemize neden olmuştur. Ayrıca literatürdeki endotel hücrelerinin radiksin yönünden pozitif olduğu bilgisi, bizim çalışmamızdaki plasental villöz kapiller endotellerinde gözlemlediğimiz radiksin pozitifitesi ile tutarlılık göstermektedir. Serbest villuslardaki fetal kapiller endotellerin moesin yönünden pozitif oluşu ve GDM plasentalarında bu proteinin ekspresyon düzeyindeki azalmanın vasküler disfonksiyon ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, GDM'li olmayan annelerin plasentaları ile mukayese edildiğinde GDM'li plasentalarda ERM protein ekspresyon düzeyindeki azalma, bu proteinlerin plasental patoloji ile ilişkili olabileceğini düşünmemize neden olmuştur. Elde ettiğimiz bulgular göz önünde bulundurulduğunda ERM proteinlerinin plasentada hem yapısal hem de fonksiyonel işlevinin bulunduğunu gösteren güçlü sonuçlara ulaşılmıştır. Ayrıca Gestasyonel Diyabet ile bu proteinlerin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler bu hastalığın şekillenmesinde etkinlikleri bulunabileceği yönünde güçlü kanıtlar ortaya sunmaktadır. Ancak bu konuda daha kapsamlı ve daha detaylı çalışmaların yapılmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz.

7. SONUÇ

GDM patofizyolojisi tam olarak tanımlanamamış bir rahatsızlıktır. Plasenta yönünden incelendiğinde GDM birçok patolojik değişiklik ile kendisini göstermektedir. Günümüzde GDM'nin hafifletilmesi amacıyla çeşitli başvuru alan adjuvantlar bulunmasına rağmen bu yöntemlerin kabul edilebilirliği yönünden tartışmalar devam etmektedir.

Hem literatür hem de mevcut çalışmalarımızı göz önünde bulundurduğumuzda plasentada yer alan yapısal ve fonksiyonel proteinlerin disfonksiyonu veya eksikliği GDM'nin şekillenmesiyle ilişki içerisindedir. Morfolojik dejenerasyonların fonksiyonel sorunlarla ortaya çıkabileceğini göz önünde bulundurduğumuzda membran ve hücre içi komponentler arasında ilişkinin temini konusunda ERM proteinlerinin önemi karşımıza çıkmaktadır. Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda ERM protein ailesi üyelerinden ezrin, radixin ve moesin'in insan plasentasında değişen düzeylerde eksprese olduğunu söyleyebiliriz ayrıca GDM'li plasentada bu proteinlerin ekspresyon düzeyindeki azalmanın hastalığın bir nedeni veya sonucu ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

1. Bell, R., K. Bailey, T. Cresswell, G. Hawthorne, J. Critchley, N. Lewis-Barned, and N.D.P.S.S. Group, Trends in prevalence and outcomes of pregnancy in women with pre-existing type I and type II diabetes. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 2008. 115(4): p. 445-452.
2. Jovanovic-Peterson, L. and C.M. Peterson, Review of Gestational Diabetes Mellitus and Low-calorie Diet and Physical Exercise as Therapy. *Diabetes/metabolism reviews*, 1996. 12(4): p. 287-308.
3. Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree, and H. King, Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care*, 2004. 27(5): p. 1047-1053.
4. Gude, N.M., C.T. Roberts, B. Kalionis, and R.G. King, Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis research*, 2004. 114(5-6): p. 397-407.
5. Fletcher, A.B., The infant of diabetic mother. *Neonatology Pathophysiology and Management of the Newborn*, 1981: p. 287-302.
6. Daskalakis, G., S. Marinopoulos, V. Krielesi, A. Papapanagiotou, N. Papantoniou, S. Mesogitis, and A. Antsaklis, Placental pathology in women with gestational diabetes. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 2008. 87(4): p. 403-407.
7. Burstein, R., S.D. Soule, and H.T. Blumenthal, Histogenesis of Pathological Processes in Placentas of Metabolic Disease in Pregnancy: II. The Diabetic State. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1957. 74(1): p. 96-104.
8. Dashkevich, O. and I. Sechonov, The morphology of placenta in diabetes mellitus. *Arkh. Pat.*, 1964. 26.
9. Holzner, H. and O. Thalhammer, Zur Histologie und Histochemie der Placenta bei Diabetes Mellitus und Schwangerschaftglykosurie. *Wein Klin. Wschr*, 1965. 77: p. 1024.

10. Horky, Z., Die quantitativen veränderungen der Vaskularisation der Zotten in der diabetischen Placenta. *Zbl. Gynaek*, 1964. 86: p. 8.
11. Jarmuzek, P., M. Wielgos, and D. Bomba-Opon, Placental pathologic changes in gestational diabetes mellitus. *Neuroendocrinol Lett*, 2015. 36(2): p. 101-105.
12. Leach, L., A. Taylor, and F. Sciota, Vascular dysfunction in the diabetic placenta: causes and consequences. *Journal of anatomy*, 2009. 215(1): p. 69-76.
13. Magee, T.R., M.G. Ross, L. Wedekind, M. Desai, S. Kjos, and L. Belkacemi, Gestational diabetes mellitus alters apoptotic and inflammatory gene expression of trophoblasts from human term placenta. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2014. 28(4): p. 448-459.
14. Pustovrh, M., A. Jawerbaum, E. Capobianco, V. White, J. Lopez-Costa, and E. Gonzalez, Increased matrix metalloproteinases 2 and 9 in placenta of diabetic rats at midgestation. *Placenta*, 2005. 26(4): p. 339-348.
15. Benirschke, K., P. Kaufmann, and R. Baergen, *Pathology of the human placenta*. 2000, New York: Springer. p. 499-529.
16. Desoye, G. and E. Shafrir, The human placenta in diabetic pregnancy. *Diabetes reviews*, 1996. 4(1): p. 70-89.
17. Handwerger, S. and M. Freemark, The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 2000. 13(4): p. 343-356.
18. Benirschke, K., P. Kaufmann, and R. Baergen, *Pathology of the human placenta*. 2000, New York: Springer. p. 156.
19. Demir, R., U. Kayisli, S. Cayli, and B. Huppertz, Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. *Placenta*, 2006. 27(6-7): p. 535-539.

20. Harem, İ.Ş., Desidual Hücreler. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 5(2): p. 202-207.
21. Stauber, M., T. Weyerstahl, and A. Beham, Gynäkologie und Geburtshilfe. Vol. 2. 2001: Thieme.
22. Wang, Y. Vascular biology of the placenta. in Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function. 2010. Morgan & Claypool Life Sciences.
23. Moser, G., J. Guettler, D. Forstner, and M. Gauster, Maternal Platelets—Friend or Foe of the Human Placenta? International Journal of Molecular Sciences, 2019. 20(22): p. 5639.
24. Aplin, J.D. and C.J. Jones, Human placental development. The Endometrium: molecular, cellular and clinical perspectives, 2008: p. 441.
25. Burton, G.J., P. Kaufmann, and B. Huppertz, Anatomy and genesis of the placenta. Knobil and Neill's physiology of reproduction, 2006. 1: p. 189-244.
26. Sadler, T.W., Langman's medical embryology. Vol. 12. 2012: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia.
27. Baines, K. and S. Renaud, Transcription factors that regulate trophoblast development and function, in Progress in molecular biology and translational science. 2017, Elsevier. p. 39-88.
28. Chaddha, V., S. Viero, B. Huppertz, and J. Kingdom. Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. in Seminars in Fetal and Neonatal Medicine. 2004. Elsevier.
29. Huppertz, B., The anatomy of the normal placenta. Journal of clinical pathology, 2008. 61(12): p. 1296-1302.

30. Schuhmann, R., Placentone structure of the human placenta. *Bibliotheca anatomica*, 1982(22): p. 46-57.
31. Demir, R., G. Kosanke, G. Kohnen, S. Kertschanska, and P. Kaufmann, Classification of human placental stem villi: review of structural and functional aspects. *Microscopy research and technique*, 1997. 38(1-2): p. 29-41.
32. Feneley, M. and G. Burton, Villous composition and membrane thickness in the human placenta at term: a stereological study using unbiased estimators and optimal fixation techniques. *Placenta*, 1991. 12(2): p. 131-142.
33. Benirschke, K., P. Kaufmann, and R. Baergen, *Pathology of the Human Placenta*. New York, 2006: p. 387.
34. Otake, Y., H. Kanazawa, H. Takahashi, S. Matsubara, and H. Sugimoto, Magnetic resonance imaging of the human placental cotyledon: Proposal of a novel cotyledon appearance score. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2019. 232: p. 82-86.
35. Benirschke, K., P. Kaufmann, and R. Baergen, *Pathology of the Human Placenta*. New York, 2006: p. 45-50.
36. Hanahan, D., Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*, 1997. 277(5322): p. 48-50.
- 37- Ribatti, D., A. Vacca, B. Nico, R. Ria, and F. Dammacco, Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. *Current molecular medicine*, 2002. 2(6): p. 537-543.
38. Bernischke, K., P. Kaufmann, and R. Baergen, *Pathology of the human placenta*, in 4th edition. 2000, New-York. p. 69-72.
39. Hart, S., The drama of cellular death. *Bioscience*, 1994. 44(7): p. 451-455.

40. Zimmet, P. and J. Shaw, Diabetes-a worldwide problem, in Joslin's Diabetes Mellitus: Fourteenth Edition. 2005, Ovid Technologies (Wolters Kluwer)-Lippincott Williams & Wilkins. p. 525-529.
41. SÖNMEZ, A. and M. KUTLU, Gestasyonel Diyabet Güncel Tarama ve Tanı Yöntemleri. *Türkiye Klinikleri Endocrinology-Special Topics*, 2010. 3(1): p. 1-5.
42. Turok, D.K., S. Ratcliffe, and E.G. Baxley, Management of gestational diabetes mellitus. *American family physician*, 2003. 68(9): p. 1767-1772.
43. Kwak, S.H., H.S. Kim, S.H. Choi, S. Lim, Y.M. Cho, K.S. Park, H.C. Jang, M.Y. Kim, N.H. Cho, and B.E. Metzger, Subsequent pregnancy after gestational diabetes mellitus: frequency and risk factors for recurrence in Korean women. *Diabetes Care*, 2008. 31(9): p. 1867-1871.
44. Akarsu, S., M. Bagirzade, S. Omeroglu, and B. Büke, Placental vascularization and apoptosis in Type-1 and gestational DM. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2017. 30(9): p. 1045-1050.
45. Babawale, M., S. Lovat, T. Mayhew, M. Lammiman, D. James, and L. Leach, Effects of gestational diabetes on junctional adhesion molecules in human term placental vasculature. *Diabetologia*, 2000. 43(9): p. 1185-1196.
46. Cvitic, S., G. Desoye, and U. Hiden, Glucose, insulin, and oxygen interplay in placental hypervascularisation in diabetes mellitus. *BioMed research international*, 2014. 2014.
47. Sato, N., N. Funayama, A. Nagafuchi, S. Yonemura, and S. Tsukita, A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *Journal of cell science*, 1992. 103(1): p. 131-143.
48. Berryman, M., Z. Franck, and A. Bretscher, Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *Journal of cell science*, 1993. 105(4): p. 1025-1043.

49. Bretscher, A., Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells. *The Journal of cell biology*, 1983. 97(2): p. 425-432.
50. Hoeflich, K.P. and M. Ikura, Radixin: cytoskeletal adopter and signaling protein. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2004. 36(11): p. 2131-2136.
51. Lankes, W., A. Griesmacher, J. Grünwald, R. Schwartz-Albiez, and R. Keller, A heparin-binding protein involved in inhibition of smooth-muscle cell proliferation. *Biochemical Journal*, 1988. 251(3): p. 831-842.
52. Fiévet, B., D. Louvard, and M. Arpin, ERM proteins in epithelial cell organization and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2007. 1773(5): p. 653-660.
53. Funayama, N., A. Nagafuchi, N. Sato, S. Tsukita, and S. Tsukita, Radixin is a novel member of the band 4.1 family. *The Journal of cell biology*, 1991. 115(4): p. 1039-1048.
54. Ng, T., M. Parsons, W.E. Hughes, J. Monypenny, D. Zicha, A. Gautreau, M. Arpin, S. Gschmeissner, P.J. Verveer, and P.I. Bastiaens, Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC–integrin complexes involved in the control of cell motility. *The EMBO journal*, 2001. 20(11): p. 2723-2741.
55. Diakowski, W., M. Grzybek, and A.F. Sikorski, Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. *Folia histochemica et cytobiologica*, 2006. 44(4): p. 231-248.
56. Bruce, B., G. Khanna, L. Ren, G. Landberg, K. Jirstrom, C. Powell, A. Borczuk, E.T. Keller, K.J. Wojno, and P. Meltzer, Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers. *Clinical & experimental metastasis*, 2007. 24(2): p. 69-78.
57. Martin, T.A., G. Harrison, R.E. Mansel, and W.G. Jiang, The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2003. 46(2): p. 165-186.

58. Kotani, H., K. Takaishi, T. Sasaki, and Y. Takai, Rho regulates association of both the ERM family and vinculin with the plasma membrane in MDCK cells. *Oncogene*, 1997. 14(14): p. 1705-1713.
59. Shaw, R.J., M. Henry, F. Solomon, and T. Jacks, RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. *Molecular biology of the cell*, 1998. 9(2): p. 403-419.
60. Mackay, D.J., F. Esch, H. Furthmayr, and A. Hall, Rho-and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts: an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. *The Journal of cell biology*, 1997. 138(4): p. 927-938.
61. Matsui, T., S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita, Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidyl-inositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Current Biology*, 1999. 9(21): p. 1259-S3.
62. Hirao, M., N. Sato, T. Kondo, S. Yonemura, M. Monden, T. Sasaki, Y. Takai, S. Tsukita, and S. Tsukita, Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *The Journal of cell biology*, 1996. 135(1): p. 37-51.
63. Takahashi, K., T. Sasaki, A. Mammoto, K. Takaishi, T. Kameyama, S. Tsukita, S. Tsukita, and Y. Takai, Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. 272(37): p. 23371-23375.
64. Jiang, L., J.M. Phang, J. Yu, S.J. Harrop, A.V. Sokolova, A.P. Duff, K.E. Wilk, H. Alkhamici, S.N. Breit, and S.M. Valenzuela, CLIC proteins, ezrin, radixin, moesin and the coupling of membranes to the actin cytoskeleton: a smoking gun? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2014. 1838(2): p. 643-657.

65. Mauricio, D., M. Balsells, J. Morales, R. Corcoy, M. Puig-Domingo, and A. de Leiva, Islet cell autoimmunity in women with gestational diabetes and risk of progression to insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes/metabolism reviews*, 1996. 12(4): p. 275-285.
66. Akbay, E., S. Torun, H. Yalçınkaya, C. Uzunçakmak, and G. Toklucu, Prevalence of gestational diabetes among pregnant women attending in MD Sadi Konuk Training and Research Hospital. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji Obstetrik*, 2010. 20(3): p. 170-175.
67. Nalan, A., P. Kayıhan, and R.Ç. Seçkin, Gestasyonel diyabetes mellitus prevalansı ve ilişkili risk etmenleri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2008. 34(3): p. 93-96.
68. Bernischke, K., P. Kaufmann, and R. Baergen, *Pathology of the human placenta*, in 4th edition. 2000, New-York. p. 16-106.
69. Gheorman, L., I. Plesea, and V. Gheorman, Histopathological considerations of placenta in pregnancy with diabetes. *Rom J Morphol Embryol*, 2012. 53(2): p. 329-36.
70. Bari, M.F., M.O. Weickert, K. Sivakumar, S.G. James, D.R. Snead, B.K. Tan, H.S. Randeve, C.C. Bastie, and M. Vatish, Elevated soluble CD163 in gestational diabetes mellitus: secretion from human placenta and adipose tissue. *PloS one*, 2014. 9(7).
71. Younes, B., A. Baez-Giangreco, L. Al-Nuaim, A. Al-Hakeem, and Z.A. Talib, Basement membrane thickening in the placentae from diabetic women. *Pathology international*, 1996. 46(2): p. 100-104.
72. Rudge, M.V., C.P. Lima, D.C. Damasceno, Y.K. Sinzato, G. Napoli, C.V. Rudge, F.Q. Gallego, and I.M. Calderon, Histopathological placental lesions in mild gestational hyperglycemic and diabetic women. *Diabetology & metabolic syndrome*, 2011. 3(1): p. 19.
73. Mayhew, T., Enhanced fetoplacental angiogenesis in pre-gestational diabetes mellitus: the extra growth is exclusively longitudinal and not accompanied by microvascular remodelling. *Diabetologia*, 2002. 45(10): p. 1434-1439.

74. Fehon, R.G., A.I. McClatchey, and A. Bretscher, Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2010. 11(4): p. 276-287.
75. Niggli, V. and J. Rossy, Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2008. 40(3): p. 344-349.
76. Yonemura, S., S. Tsukita, and S. Tsukita, Direct involvement of ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding membrane proteins in the organization of microvilli in collaboration with activated ERM proteins. *The Journal of cell biology*, 1999. 145(7): p. 1497-1509.
77. Hamada, K., T. Shimizu, S. Yonemura, S. Tsukita, S. Tsukita, and T. Hakoshima, Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin—ICAM-2 complex. *The EMBO journal*, 2003. 22(3): p. 502-514.
78. Killock, D.J., M. Parsons, M. Zarrouk, S.M. Ameer-Beg, A.J. Ridley, D.O. Haskard, M. Zvelebil, and A. Ivetić, In vitro and in vivo characterization of molecular interactions between calmodulin, ezrin/radixin/moesin, and L-selectin. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. 284(13): p. 8833-8845.
79. Lozupone, F., L. Lugini, P. Matarrese, F. Luciani, C. Federici, E. Iessi, P. Margutti, G. Stassi, W. Malorni, and S. Fais, Identification and relevance of the CD95-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(10): p. 9199-9207.
80. Luo, Y., C. Zheng, J. Zhang, D. Lu, J. Zhuang, S. Xing, J. Feng, D. Yang, and X. Yan, Recognition of CD146 as an ERM-binding protein offers novel mechanisms for melanoma cell migration. *Oncogene*, 2012. 31(3): p. 306-321.
81. Mori, T., K. Kitano, S.-i. Terawaki, R. Maesaki, Y. Fukami, and T. Hakoshima, Structural basis for CD44 recognition by ERM proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. 283(43): p. 29602-29612.
82. Takai, Y., K. Kitano, S.i. Terawaki, R. Maesaki, and T. Hakoshima, Structural basis of PSGL-1 binding to ERM proteins. *Genes to Cells*, 2007. 12(12): p. 1329-1338.

83. Bretscher, A., K. Edwards, and R.G. Fehon, ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2002. 3(8): p. 586-599.
84. Persson, Å., C. Lindwall, M. Curtis, and H. Kuhn, Expression of ezrin radixin moesin proteins in the adult subventricular zone and the rostral migratory stream. *Neuroscience*, 2010. 167(2): p. 312-322.
85. Shaffer, M.H., Y. Huang, E. Corbo, G.F. Wu, M. Velez, J.K. Choi, I. Saotome, J.L. Cannon, A.I. McClatchey, and A.I. Sperling, Ezrin is highly expressed in early thymocytes, but dispensable for T cell development in mice. *PloS one*, 2010. 5(8).
86. Wakayama, T., H. Nakata, M. Kurobo, Y. Sai, and S. Iseki, Expression, localization, and binding activity of the ezrin/radixin/moesin proteins in the mouse testis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2009. 57(4): p. 351-362.
87. Amieva, M., O. Turumen, A. Vaheri, D. Louvard, and M. Arpin, Radixin Is a Component of Hepatocyte Microvilli in Situ. *Exp. Cell Res*, 1994. 210: p. 140-144.
88. Zhu, L., J. Crothers Jr, R. Zhou, and J.G. Forte, A possible mechanism for ezrin to establish epithelial cell polarity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2010. 299(2): p. C431-C443.
89. Huang, Q., Ezrin/Radixin/Moesin proteins in the development of diabetes and its cardiovascular complications. *J Diabetes Metab S*, 2011. 4: p. 2.
90. Million, R., E. Iori, L. Puricelli, G. Arrigoni, M. Vedovato, R. Trevisan, P. James, A. Tiengo, and P. Tessari, Abnormal cytoskeletal protein expression in cultured skin fibroblasts from type 1 diabetes mellitus patients with nephropathy: A proteomic approach. *PROTEOMICS—Clinical Applications*, 2008. 2(4): p. 492-503.
91. Pezzolesi, M.G., G.D. Poznik, J.C. Mychaleckyj, A.D. Paterson, M.T. Barati, J.B. Klein, D.P. Ng, G. Placha, L.H. Canani, and J. Bochenski, Genome-wide association scan for

diabetic nephropathy susceptibility genes in type 1 diabetes. *Diabetes*, 2009. 58(6): p. 1403-1410.

92. Zheng, M., L.-L. Lv, J. Ni, H.-F. Ni, Q. Li, K.-L. Ma, and B.-C. Liu, Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. *PLoS One*, 2011. 6(5).

93. Tsukita, S., Y. Hieda, and S. Tsukita, A new 82-kD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction: purification and characterization. *The Journal of cell biology*, 1989. 108(6): p. 2369-2382.

94. Amieva, M.R. and H. Furthmayr, Subcellular localization of moesin in dynamic filopodia, retraction fibers, and other structures involved in substrate exploration, attachment, and cell-cell contacts. *Experimental cell research*, 1995. 219(1): p. 180-196.

95. Franck, Z., R. Gary, and A. Bretscher, Moesin, like ezrin, colocalizes with actin in the cortical cytoskeleton in cultured cells, but its expression is more variable. *Journal of cell science*, 1993. 105(1): p. 219-231.

96. Bretscher, A., D. Reczek, and M. Berryman, Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *Journal of Cell Science*, 1997. 110(24): p. 3011-3018.



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Muhammet Erdal	Soyadı	Sak
Doğum Yeri	Şanlıurfa	Doğum Tarihi	25.03.1975
Uyruğu	T.C.	Tel	0533 511 22 72
E-posta	drmesak@yahoo.com		

EĞİTİM DÜZEYİ

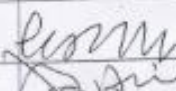
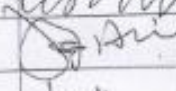
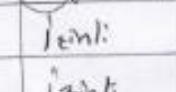
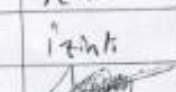
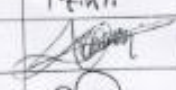



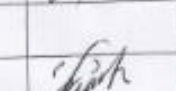

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
İlköğretim	Cengiz Topel İlkokulu	1986
	Şanlıurfa Anadolu Lisesi	1990
Lise	Gaziantep Fen Lisesi	1994
Lisans eğitimi / Üniversite:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi	2000
Lisansüstü eğitim / Doktora eğitimi	Dicle Üniv Kadın Doğum	2001-2005
	Dicle Üniversitesi Histoloji ve Embryoloji	2011-Halen

İŞ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)						
Kadın Doğum Uzmanı	Ergani Devlet Hastanesi	2005-2009						
Yrd. Doç.Dr.	Dicle Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD	2009-2014						
Doç.Dr.	Harran Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD	2015-2019						
Profesör Dr/ Anabilim Dalı Başkanı	Harran Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD	2019-halen						
Tüp Bebek Sorumlusu	Harran Tıp Hastanesi Tüp bebek merkezi	2016-Halen						
Yabancı Dil Sınav Notu								
ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
76								
Tıpta Uzmanlık Puanı			65					

10. EKLER

10.1. Etik kurul onayı

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU DİCLE UNIVERSITY MEDICAL FACULTY ETHICS COMMITTEE FOR NONINTERVENTIONAL STUDIES					
209					
KARAR					
Prof. Dr. Murat AKKUŞ, Doktora Öğrencisi M. Erdal SAK, Dr. Öğretim Üyesi Sevgi IRTEGÜN, Doç. Dr. Elif AĞAÇAYAK, Günşel KIRMAN isimli araştırmacılar tarafından planlanan "Gestasyonel Diabet olan ve olmayan hastaların plasentalarında Ezrin-Radixin-Moesin proteinlerinin immunohistokimya ve Western Blot yöntemiyle ekspresyonlarının değerlendirilmesi" başlıklı araştırmaya <i>Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u</i> tarafından toplantıda hazır bulunan üyeler tarafından oy birliği ile onay verilmiştir.					
Klinik araştırma tamamlanıp yayın aşamasına geldiğinde, yayına sunulan bildiri veya makalenin bir örneğinin Etik Kurul'a verilmesi zorunludur.					
DECISION					
The project titled as "Evaluation of Ephrin-Radixin-Moesin proteins by immunohistochemistry and Western Blot methods in the placenta of gestational diabetes patients" planned by Murat AKKUŞ, M. Erdal SAK, Sevgi IRTEGÜN, Elif AĞAÇAYAK, Günşel KIRMAN has been approved by Ethics Committee of Dicle University Faculty of Medicine.					
Oturum No (Meeting number) :	Tarih (Date): 04.07.2018	Saat (Hour): 14:00-15:00			
KURUL BAŞKANI (CHIEF)	Prof. Dr. Hüseyin BÜYÜKBAYRAM -.				
KURUL ÜYELERİ / MEMBERS					
	ÖNVANI	ADI-SOYADI	KURUMU	BRANŞI	İMZA
1	Prof. Dr.	Hüseyin BÜYÜKBAYRAM	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Patoloji	
2	Prof. Dr.	Levent ERDİNÇ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyokimya	
3	Prof. Dr.	Aziz KARABULUT	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Kardiyoloji	
4	Prof. Dr.	Cihan AKGÜL ÖZMEN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Radyoloji	
5	Doç. Dr.	İker KELLE	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Farmakoloji	
6	Doç. Dr.	Hakan KARAMAN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Alerjiyoloji ve Reanimasyon	
7	Doç. Dr.	Zaferkan YILMAZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	İç Hastalıkları	
8	Doç. Dr.	M. Veyis BAHADIR	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Genel Cerrahi	
9	Doç. Dr.	Ezgi AZARKAN	Dicle Üniversitesi Hukuk Fakültesi	Öğretim Üyesi	
10	Dr. Öğretim Üyesi	İsmail YILDIZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyokimya	
11	Dr. Öğretim Üyesi	Diclehan ORAL	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji	

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası Zemin Kat. 21280 Kampüsü/DIYARBAKIR
Telefon: +90.412. 248 80 01-16/4631 Faks: +90.412. 248 84 40 kuruletik.diyar@gmail.com

Doküman Görüntüleyici

Turnitin Orijinallik
Raporu

İşleme kondu: 10-Tem-2020 23:33 +03

NUMARA: 1355897986

Kelime Sayısı: 7346

Gönderildi: 1

Doktora Tezi Muhammet Erdal
Sak tarafından

Benzerlik Endeksi %4	Kaynağa göre Benzerlik
	Internet Sources: %1
	Yayınlar: %1
	Öğrenci Ödevleri: %3

[alıntıları çıkar](#)[bibliyografyayı dahil et](#)[küçük eşleşmeleri çıkar](#)

mod:

raporu hızlı görüntüle (klasik) ▼

Change mode

[yazdır](#)[yenile](#)[İndir](#)

3% match (16-May-2019 tarihli öğrenci ödevleri)

[Submitted to Izmir Katip Äelebi Äniversitesi on 2019-05-16](#) ✕

<1% match (19-Ara-2016 tarihli öğrenci ödevleri)

[Submitted to Akdeniz University on 2016-12-19](#) ✕

<1% match (yayınlar)

["Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015](#) ✕

<1% match (04-Haz-2016 tarihli internet)

[https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/BGDA_Practical - Placenta and Fetal Membranes](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/BGDA_Practical_-_Placenta_and_Fetal_Membranes) ✕

<1% match (28-Haz-2020 tarihli öğrenci ödevleri)

[Submitted to Ankara University on 2020-06-28](#) ✕

<1% match (23-Haz-2014 tarihli internet)

<http://endocrinology.xqhospital.com.cn:8050> ✕

<1% match (05-May-2020 tarihli internet)

<https://bozyakaeah.saglik.gov.tr/TR,132886/2015-3.html> ✕

<1% match ()

https://journals.viamedica.pl/fofia_morphologica/article/view/FM.a2018.0085 ✕

<1% match (yayınlar)

[ÖZGER, Harzem, ERALP, Levent, ATALAR, Ata Can, TOKER, Berkin, ATEŞ, Lora, Esberk, SUNGUR, Mustafa, BİLGİÇ, Bilge and AYAN, İnci. "Osteosarkomlu hastalarda dirençle ilişkili proteinlerin prognoz ve sağkalım üzerine etkisi: İmmünohistokimyasal analiz", Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği/Turkish Association of Orthopaedics and Traumatology, 2009.](#) ✕

<1% match (06-Şub-2015 tarihli öğrenci ödevleri)

[Submitted to TechKnowledge Turkey on 2015-02-06](#) ✕

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Sizi Prof.Dr. Murat AKKUŞ , Doktora öğrencisi M. Erdal Sak tarafından yürütülen ‘Gestasyonel Diabet olan ve olmayan hastaların plasentalarında Ezrin-Radixin-Moesin Proteinlerinin İmmunohistokimya ve Western Blot yöntemiyle Expresyonlarının Değerlendirilmesi ’’ başlıklı araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmada doğum esnasında bebekten sonra doğan ve normalde atılan plasentanın incelemesi yapılacaktır. Bu araştırmanın amacı gebelik şekerinin sebebine ve tedavisine ışık tutacak bir çalışma olmasını umut ediyoruz. Araştırmaya sizin dışınızda 29 kişi katılacaktır. Bu çalışmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Bu formu onaylamanız sonrası, araştırmaya katılmayı kabul ettiğiniz anlamına gelecektir. Ancak, çalışmaya katılmama veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmayı bırakma hakkına da sahipsiniz. Bu çalışmadan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacak olup kişisel bilgileriniz saklı tutulacaktır: ancak verileriniz yayın amacıyla kullanılabilir. İletişim bilgileriniz ise sadece izninize bağlı olarak ve farklı araştırmacıların sizinle iletişime geçebilmesi için ‘’ ortak katılımcı havuzuna’’ aktarılabilir. Eğer araştırmanın amacı ile ilgili verilen bu bilgiler dışında şimdi veya daha sonra daha fazla bilgiye ihtiyaç duyarsanız araştırmacıya şimdi sorabilir veya drmesak@yahoo.com e-posta adresi ve 05335112272 numaralı telefonda ulaşabilirsiniz. Araştırma tamamlandığında genel/size özel sonuçların sizinle paylaşılmasını istiyorsanız lütfen araştırmacıya iletiniz.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce katılımcıya verilmesi gereken bilgileri okudum ve katılmam istenen çalışmanın kapsamını ve amacını, gönüllü olarak üzerime düşen sorumlulukları anladım. Çalışma hakkında yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı/araştırmacılar tarafından yapıldı. Bana, çalışmanın muhtemel riskleri ve faydaları sözlü olarak anlatıldı. Kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda yeterli güven verildi.

Bu koşullarda söz konusu araştırmaya kendi isteğimle, hiçbir baskı ve telkin olmaksızın benimle sözlü iletişime geçen sayın M. Erdal Sak araştırmasına katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

12. Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı: M.Erdal Sak

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih: