



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

**DİYABETİN VASKÜLER KOMPLİKASYONLARININ,
İNSAN GÖBEK KORDON DOKUSU VE
WHARTON JÖLESİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE SAYILARINA
ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Çiğdem KARACA
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ**

Şubat-2019

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

**DİYABETİN VASKÜLER KOMPLİKASYONLARININ,
İNSAN GÖBEK KORDON DOKUSU VE
WHARTON JÖLESİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
SAYILARINA
ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Çiğdem KARACA
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi. Nuray BOSTANCIERİ**

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TF.UT.18.04 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYABETİN VASKÜLER KOMPLİKASYONLARININ,
İNSAN GÖBEK KORDON DOKUSU VE
WHARTON JÖLESİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE SAYILARINA
ETKİLERİ**

Dr. Çiğdem KARACA

(07.02.2019)

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

Prof. Dr. Yusuf Zeki ÇELEN
Tıp Fakültesi Dekanı

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

Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ
Anabilim Dalı Başkanı

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

Dr. Öğr. Üyesi. Nuray BOSTANCIERİ
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ
2. Dr. Öğr. Üyesi. Nuray BOSTANCIERİ
3. Dr. Öğr. Üyesi. Duygu GÖK YURTSEVEN

I. ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince gerek mesleki, gerekse sosyal açıdan destek olup, güven verici bir çalışma ortamı oluşturan kıymetli hocam, Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ'ye, tez çalışmalarımın başından sonuna kadar her aşamada yanımda olan ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim saygıdeğer danışman hocam, Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ'ne öncelikle teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Eğitimim boyunca her alanda güzel bir yol gösterici olan sevgili hocam Prof. Dr. Serap İNALÖZ DEMİR'e, hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TÜRKER'e, tez çalışmalarımda destek olan Yüksek Lisans Öğrencisi Naciye ÖZYURT başta olmak üzere, Arş. Gör. Büşra ŞEN, Arş. Gör. Hülya BİRİNCİ, Arş. Gör. Dr. Canan ÜNAL ve tüm asistan arkadaşlarıma,

Tezimin flow-sitometri çalışmalarında yardımcı olan Gaziantep Üniversitesi İleri Düzey Araştırma Laboratuvarı sorumlusu Öğr. Gör. Dr. Demet TAŞDEMİR ve Arş. Gör. Sedat İLHAN'a,

Tezimi maddi olarak destekleyen Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı'na, dokuların temin edilmesinde yardımcı olan Sağlık Bakanlığı Cengiz Gökçek Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi Başhekimliği'ne, Kadın Doğum Servisi ve ameliyathane personeline, doğumları gerçekleştiren, bilgisi, tecrübesi ve nezaketi ile hoş bir çalışma dönemi geçirmeme vesile olan Uzm. Dr. Ali OVAYOLU'na,

Tezimin istatistik değerlendirmesini yapan Öğr. Gör. Tanyeli GÜNEYLİĞİL KAZAS'a,

Eğitimim ve tezim sırasında desteklerini esirgemeyen Patoloji A.D. Öğretim üyeleri ve çalışanlarına, eğitimime destek olan Anatomi A.D. Öğretim üyelerine,

Hayatım boyunca her konuda arkamda olan sevgili aileme, kayınvalideme, kıymetli eşime ve canımın içi çocuklarıma sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Çiğdem KARACA

II. İÇİNDEKİLER

I. ÖNSÖZ.....	IV
II. İÇİNDEKİLER.....	V
III. ÖZET	VII
IV. ABSTRACT	VIII
V. KISALTMALAR	IX
VI. TABLO LİSTESİ	X
VII. ŞEKİL LİSTESİ	XI
VIII. RESİM LİSTESİ.....	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kök Hücre Tanımı ve Önemi	3
2.1.1. Kök Hücre Çeşitleri	3
2.1.2. Kök Hücre Özellikleri ve Kullanım Alanları	5
2.2. Göbek Kordonu	6
2.2.1. Göbek Kordonu Anatomisi:.....	6
2.2.2. Göbek Kordonu Histolojisi.....	7
2.2.3. Göbek Kordonu Embriyolojisi	9
2.3. Göbek Kordonu Kök Hücreleri	11
2.4. Wharton Jölesi Kök Hücreleri ve Genel Özellikleri	11
2.5. Wharton Jölesi Mezenkimal Kök Hücrelerinin Hastalıkların Tedavisindeki Potansiyel Rollerini	12
2.6. Diyabetes Mellitus Tanımı ve Sınıflandırılması	13
2.6.1. Tip I Diyabet.....	17
2.6.2. Tip II DM	17
2.6.3. Gestasyonel DM (GDM)	17
2.6.4. Diyabetin Komplikasyonları	18
2.6.4.1. Diyabetik Nefropati	19
2.6.4.2. Diyabetik Retinopati	200
2.6.4.3. Diyabetik Nöropati	22
2.7. Gebelikte DM	23

2.7.1. Gebelikte Diyabetin Patofizyolojisi	24
2.7.2. Gebelikte Diyabetin, Fetusa Etkileri	24
2.7.3. Diyabetik Anne Bebeği	25
2.7.4. Diyabetin Göbek Kordonu ve Buradaki Mezenkimal Kök Hücreleri Üzerine Etkileri.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. İnsan Göbek Kordonu Temini ve Laboratuara Transferi	29
3.1.1. Göbek Kordonundan WJ- MKH İzolasyonu	30
3.1.2. WJ-MKH Sayılarının Belirlenmesi	32
3.1.3. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması.....	33
3.1.4. Kesitlerin Alınması ve Boyanmaları	34
3.1.5. Göbek Kordonu Dokusunun İmmünohistokimyasal İncelenmesi.....	36
3.1.6. Göbek Kordonu Çapı ve Damar Duvar Kalınlıklarının Ölçülmesi	37
3.2. İstatistiksel Değerlendirme.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Demografik Veriler	38
4.2. Işık Mikroskobu Bulguları	40
4.3. Flow-sitometri Bulguları	51
4.4. İmmünohistokimya Bulguları	58
5. TARTIŞMA.....	69
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	744
7. KAYNAKLAR	76

III. ÖZET

DIYABETİN VASKÜLER KOMPLİKASYONLARININ, İNSAN GÖBEK KORDON DOKUSU VE WHARTON JÖLESİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE SAYILARINA ETKİLERİ

Dr. Çiğdem KARACA

Uzmanlık Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı, Dr. Öğr Üyesi Nuray BOSTANCIERİ,

Şubat 2019, 85 sayfa

Diyabetes Mellitus (DM) insülin eksikliği veya etkisizliği sonucunda kan şekerinin regüle edilememesine bağlı olarak, metabolizmanın ve dokuların etkilendiği, akut ve kronik komplikasyonların eşlik ettiği, metabolik bir hastalıktır. Günümüzde diyabetin pek çok çeşidi tanımlanmış olup; her bir çeşidinde hastalık mekanizmasında ve dokuların hastalıktan etkilenmesinde farklılıklar olmaktadır. Yüksek kan şekerinin direkt olarak dokularda hasarlayıcı etkisinin; indirekt olarak da gelişen hipoksi ve kronik vasküler hasara bağlı perfüzyon azalmasının dokuları etkileyen temel mekanizmalar olduğu bilinmektedir. Gebelik öncesinde başlayıp, nefropati, retinopati gibi kronik komplikasyon gelişmiş bir gebe ile gebeliği sırasında diyabet hastalığı olmuş bir gebenin, bebeklerinin farklı klinik tablo sergilediği görülmüştür.

Göbek kordonu bağ dokusunun (Wharton Jölesi) mezenkimal kök hücreler açısından zengin olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızda daha önceden diyabet hastası olup, vasküler komplikasyon olarak nefropati gelişmiş (VK-PGDM) 7 gebe, gebeliği sırasında diyabet tanısı almış olan (GDM) 7 gebe ve herhangi bir hastalığı bulunmayan (Kontrol) 7 gebeden doğum sonrası alınan göbek kordonları kullanıldı. Bu dokulara; H-E, Masson Trikrom ve PAS boyaları uygulanarak ışık mikroskopik değerlendirmesi yapıldı. Wharton Jölesinden enzimatik sindirme metodu ile buradaki kök hücreler izole edildi. Mezenkimal kök hücrelerde (+) olduğu bilinen CD73, CD90, CD105, (-) olduğu bilinen CD45 ve CD34 kokteyl belirteçleri kullanılarak flow-sitometri cihazı ile sayıları tespit edildi. Ayrıca yine aynı belirteçler kullanılarak mezenkimal kök hücreler immünohistokimyasal boyama ile görsel açıdan değerlendirildi.

Çalışmamızın sonucunda; göbek kordonu çapının GDM grubunda artmasına rağmen VK-PGDM grubunda azalmış olduğu; göbek kordonu arter duvar kalınlıklarının GDM ve VK-PGDM’de belirgin olarak artmış olduğu bulunmuştur. Wharton Jölesi mezenkimal kök hücrelerinin ise GDM’li grupta artarken VK-PGDM’li grupta belirgin olarak azaldığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Göbek Kordonu, Wharton Jölesi, Mezenkimal Kök Hücre, Gestasyonel Diyabet, Pregestasyonel Diyabet

IV. ABSTRACT

THE EFFECT OF VASCULAR COMPLICATIONS OF DIABETES MELLITUS ON HUMAN UMBILICAL CORD TISSUE AND THE NUMBER OF WHARTON JELLY'S MESENCHYMAL STEM CELLS.

Dr. Çiğdem KARACA

Thesis for specialization, Department of Histology and Embriology

Supervisors, Asis. Prof. Dr. Nuray Bostancıeri

February-2019, 85 pages

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disease that is associated with aberrant blood sugar level, which occurs as a result of insufficient and/or ineffective insulin. DM has affects on body metabolism and tissues and mostly accompanied with acute and chronic complications.

Up to date several different types of DM have been described each of which have different mechanisms in affecting and damaging the tissues. Today we know that high blood sugar leads to damage in tissues via vascular damage which reveals decreased vascular perfusion and eventually hypoxia. In this context, babies whom born to women who developed DM and associated chronic complications such as nephropathy, retinopathy before pregnancy, present different clinical picture than the babies whom born to women who develops DM during the pregnancy.

It is known that, umbilical cord connective tissue (Wharton Jelly) was rich for mesenchymal stem cells.

In the current study we studied on umbilical cord samples that were obtained from 7 pregnant women who had DM diagnosis and developed nephropathy complication before pregnancy (VK-PGDM), 7 pregnant women who developed DM during pregnancy (GDM) and 7 healthy pregnant women, respectively. These cords were evaluated under light microscope after staining with H-E, Masson Trichrome and PAS, respectively. Stem cells were isolated from Wharton Jelly via enzymatic digestion. Derived mesenchymal stem cells have been determined and counted by flow cytometry based on the (+) markers of CD73, CD90, CD105 and (-) markers of CD45 and CD34. Using the same markers, mesenchymal stem cells have also been stained with immunohistochemistry technique.

Our analysis revealed increase of the diameter of the cord derived from GDM group while the diameter of the cord from VK-PGDM group were found to be decreased. We also identified significant thickening of the arterial walls in both GDM and VK-PGDM groups. Wharton Jelly mesenchymal cell number was found to be increased in GDM group and significantly decreased in VK-PGDM group.

Key Words: Umbilical Cord, Wharton Jelly, Mesenchymal Stem Cell, Gestational Diabetes, Pre- Gestational Diabetes

V. KISALTMALAR

ANOVA	: Varyans Analizi
APG	: Açlık Plazma Glukozu
ATP	: Adenozin Trifosfat
cm	: Santimetre
dk.	: Dakika
DAB	: Diaminobenzidine Tetrahidroklorid
DM	: Diyabetes Mellitus
GK	: Göbek Kordonu
sa.	: Saat
HbA1C	: Glikozillenmiş hemoglobin
HIF-1α	: Hypoxia-inducible factor-1
HLA-DR	: İnsan Lökosit Antijeni DR İzotipi
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
μl	: Mikrolitre
NK	: Natural Killer
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitörü
PAS	: Periyodik Asit Schiff Boyası
PBS	: Tuzlu fosfat tamponu
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
SCF	: Stem cell factor
TGF-β	: Tümör büyüme faktörü beta
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WJ	: Wharton Jölesi

VI. TABLO LİSTESİ

Tablo 1:	Plazma glukoz düzeylerine göre DM tanı kriterleri.....	15
Tablo 2:	DM Sınıflaması.....	16
Tablo 3:	GDM tanı algoritması	18
Tablo 4:	Üriner Albümin Ekspresyonunun değerlendirilmesi	19
Tablo 5:	Gebelikte Diyabetin White Sınıflaması	23
Tablo 6:	Doku takibi cihazının protokolü	33
Tablo 7:	Hematoksilen - Eosin (H-E) Boyama Protokolü	34
Tablo 8:	Masson's Trikróm (TRI) Boya Solüsyonu	34
Tablo 9:	Masson's Trikróm (TRI) Boyama Protokolü	35
Tablo 10:	PAS Boyama Protokolü	36
Tablo 11:	Çalışma hastalarının demografik özellikleri	38
Tablo 12:	Demografik verilerin gruplar arası karşılaştırması	39
Tablo 13:	AKŞ, HbA1c ve GK çapları açısından gruplar arası karşılaştırma.....	40
Tablo 14:	Damar duvar kalınlıklarının gruplar arası sayısal verileri	42
Tablo 15:	Damar çaplarının gruplar arası sayısal verileri	43
Tablo 16:	CD90, CD44, CD105, CD73, (+) ve (-) karışım kokteyl antikorlarının gruplara göre sayı dağılımları	54
Tablo 17:	CD90, CD44, CD105, CD73, (+) ve (-) karışım kokteyl antikorlarının gruplara göre hücre yüzdeleri dağılımları.....	55
Tablo 18:	CD90, CD44, CD105, CD73, (+) ve (-) karışım kokteyl antikorlarının gruplar arası hücre sayılarının karşılaştırmalı değerlendirilmesi.....	56

VII. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1:	Damar duvar kalınlıklarının gruplar arası karşılaştırılması.....	41
Şekil 2:	Damar duvar kalınlıklarının GK çapına oranlarının gruplar arası karşılaştırılması	42
Şekil 3:	WJ-MKH' lerinin flow-sitometrik değerlendirilmesi GDM grubu örnek şekil.	53
Şekil 4:	WJ-MKH' lerinin flow-sitometrik değerlendirilmesi kontrol grubu örnek şekil.	53
Şekil 5:	WJ-MKH' lerinin flow-sitometrik değerlendirilmesi VK-PGDM grubu örnek şekil.	54
Şekil 6:	CD90, CD105, CD73, CD44, (+) ve (-) kontrol kokteyli (+) olan hücre sayılarının gruplar arası karşılaştırılmasını gösteren grafik	57
Şekil 7:	CD90, CD105, CD73, CD44, (+) ve (-) kontrol kokteyli hücre yüzdelерinin gruplar arası karşılaştırılmasını gösteren grafik	57

VIII. RESİM LİSTESİ

Resim 1:	GK, plasenta birleşim yeri	6
Resim 2:	Proksimal ve distal kısımları kesilmiş GK.....	7
Resim 3:	İnsan göbek kordonu ve bölgeleri.....	8
Resim 4:	Bağlantı sapının oluşumu.....	9
Resim 5:	Göbek kordonu gelişimi 5. Hafta.....	10
Resim 6:	GK'nun plasentadan ayrılması.....	30
Resim 7:	GK'nun amnion zarından ayrılması.....	31
Resim 8:	GK'dan ven ve arterlerin çıkarılarak kalan dokudan WJ ayırma işlemi.....	31
Resim 9:	Enzimatik olarak sindirilmiş WJ'nin hücre süzgecinden geçirilmesi.....	32
Resim 10:	Flow sitometri cihazı ve ölçümlerin yapıldığı bilgisayar sistemi	33
Resim 11:	Kontrol grubu ven duvarı ve endotel ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 20×).....	43
Resim 12:	Kontrol grubu arter ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 20×).....	44
Resim 13:	Kontrol grubu WJ, amnion zarı ve WJ porları ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 20×).....	44
Resim 14:	GDM grubu genişlemiş umbilikal ven ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 4×).....	45
Resim 15:	GDM grubu ven duvarı ve endotel ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 20×).....	45
Resim 16:	GDM grubu WJ, ödemli porlar ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 4×).....	46
Resim 17:	GDM grubu arteri ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 4×).....	46
Resim 18:	VK-PGDM grubu ven duvarı ve endotel ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 20×).....	47
Resim 19:	VK-PGDM grubu ven ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 4×).....	47
Resim 20:	VK-PGDM grubu arter ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 4×).....	48
Resim 21:	VK-PGDM grubu WJ ve porları ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 4×).....	48
Resim 22:	VK-PGDM grubu arter duvarı ışık mikroskopik görüntüsü (TRI,10×).....	49
Resim 23:	VK-PGDM grubu ven duvarı ve endotel ışık mikroskopik görüntüsü (TRI,20×).....	49
Resim 24:	Kontrol grubu ışık mikroskopik görüntüsü (PASX10).....	50
Resim 25:	GDM grubu ışık mikroskopik görüntüsü (PASX10).....	50
Resim 26:	VK-PGDM grubu ışık mikroskopik görüntüsü (PASX10).....	51

Resim 27: CD90 pozitif kontrol, böbrek dokusu	58
Resim 28: CD90 Kontrol grubu WJ,.....	59
Resim 29: CD90 GDM grubu WJ	59
Resim 30: CD90 VK-PGDM grubu WJ.....	60
Resim 31: CD105 pozitif kontrol tonsil dokusu.....	60
Resim 32: CD105 Kontrol grubu WJ.....	61
Resim 33: CD105 GDM grubu WJ	61
Resim 34: CD105 VK-PGDM grubu WJ.....	62
Resim 35: CD73 pozitif kontrol tonsil dokusu.....	62
Resim 36: CD73 Kontrol grubu WJ	63
Resim 37: CD73 GDM grubu WJ	63
Resim 38: CD73 VK-PGDM grubu WJ.....	64
Resim 39: CD 34 pozitif kontrol tonsil dokusu.....	64
Resim 40: CD34 Kontrol grubu WJ	65
Resim 41: CD34 GDM grubu WJ	65
Resim 42: CD34 VK-PGDM grubu WJ.....	66
Resim 43: CD45 pozitif kontrol tonsil dokusu.....	66
Resim 44: CD45 Kontrol grubu WJ	67
Resim 45: CD45 GDM grubu WJ	67
Resim 46: CD45 VK-PGDM grubu WJ.....	68

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler teorik olarak sınırsız bölünebilme yeteneğine sahip olan kendini yenileyebilen ve klon oluşturabilen, özelleşmemiş hücrelerdir. Uyarı aldıkları zaman farklılaşmış hücrelere dönüşebilmekte ve hasarlı bölgeye nakledildiklerinde kaynak dokunun rejenerasyonuna da katkıda bulunabilmektedirler [1].

İnsan göbek kordonu (GK); plasenta ile fetus arasında bulunur. Göbek kordonu dıştan amnion zarı ile sarıdır ve içinde iki arter, bir ven bulunur. Bu yapıların arasını Wharton Jölesi (WJ) adı verilen bağ dokusu doldurur [2]. Wharton Jölesi bağ dokusunun içinde pek çok Mezenkimal Kök Hücre (WJ-MKH) bulunur. Bu hücreler özel kültür koşullarında osteoblast, adiposit, kondrosit ve miyoblast gibi pek çok hücreye dönüşebildiği için yüksek potensli kabul edilmiştir. Allojenik Mezenkimal Kök Hücre (MKH) nakillerinde HLA-DR (-) olması nedeni ile doku uyumluluğu problemlerinin ‘tekrarlayan uygulamalarda bile’ yaşanmadığı gösterilmiştir [3, 4]. Bu nedenlerle WJ-MKH’leri allojenik doku nakillerinde ümit vaat eden hücreler olarak görülmüştür.

GK’nun yapısı gebelik boyunca değişip annenin ve bebeğin klinik durumundan etkilenir. Örneğin hipertansiyon, sistemik lupus eritematozus gibi pek çok kronik hastalıkta GK’nun histolojik ve fizyolojik yapısının etkilediği gösterilmiştir [5].

Diyabet Mellitus (DM) mikroskobik olarak dokuların yapısını etkileyen metabolik bir hastalıktır. Türk Diyabet Cemiyeti verilerine göre toplumumuzda prevalansı (%13.7) yüksektir ve görülme sıklığı giderek arttığı için büyük önem arz etmektedir. DM uzun dönemde, anormal damar oluşmu ile karakterize vaskülopati meydana getirmektedir. Diyabetik gebeler de White sınıflamasında; Gestasyonel Diyabet (GDM), Pregestasyonel Diyabet (PGDM) olarak ayrılmış, PGDM’li gebeler ise vasküler komplikasyon varlığı ve sayısına göre alt sınıflara ayrılmıştır [6].

Vasküler komplikasyon dokularda perfüzyonu azaltarak, beslenmeyi ve dokunun metabolizmasını bozar. Plasental vaskülopati de, gelişen fetus için hipoksik bir ortam hazırlar [7]. Hipoksinin şiddeti ve süresine bağlı olarak embriyopatiden normal fetal büyümeye kadar değişen yelpazede klinik prezentasyon olmaktadır [8]. Diyabetli gebelerde bebeğin ve gebelik ürünlerinin durumunu, hiperglisemi ve vaskülopatiyeye bağlı oluşan hipoksi birlikte etkilemektedir. Örneğin gebelik öncesi diyabeti olup vasküler komplikasyon geliştirmeyen diyabetli anne bebeklerinde çoğunlukla

makrozomi görülürken (GDM de olduğu gibi), komplikasyon gelişmiş diyabetli anne bebeklerinde ise düşük doğum ağırlığı daha çok görülmüştür. Vasküler komplikasyonlu anne bebeklerinin doğumda akciğer gelişimleri normalken, vasküler komplikasyon gelişmemiş PGDM’li ve GDM’li anne bebekleri akciğer gelişimleri tamamlanamadığı için doğumda solunum sıkıntıları ile karşı karşıya kalmaktadırlar.

Diyabetin GK ve WJ-MKH’leri üzerine etkileri ve histomorfolojik ince yapısı gösterilmiştir. Literatürde ayrıca; PGDM ve GDM nin GK histomorfolojisini etkilediği (GK çap artışı, damar lümeni daralması gibi) bildirilmiştir [9]. WJ-MKH’leri üzerine kültür ortamında yapılan çeşitli çalışmalarda da GDM nin etkileri (WJ-MKH sayılarının, büyüme oranlarının, proliferasyon ve diferansiasyon kapasitelerinin azalması gibi) çeşitli çalışmalarda sunulmuştur [10, 11]. Ancak PGDM’li hastalarda vasküler komplikasyon sınıflaması yapılarak WJ-MKH değerlendirilmesine literatür taramamızda rastlanmamıştır.

Çalışmamızın hipotezine göre; diyabetle oluşan hiperglisemiye bağlı olarak metabolik değişiklikler ve hipoperfüzyona bağlı dokuların az beslenme durumunda, göbek kordonu dokusunun ve buradaki MKH’lerinin sayılarının da etkileneceği, bu etkilenenin GDM ve vasküler komplikasyon gelişmiş PGDM’de farklı olacağı düşünülmektedir.

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

1. Vasküler komplikasyon gelişmiş gebelerde göbek kordonu dokusunun histomorfolojik yapısını inceleyerek, normal gebelerin ve GDM’li gebelerin göbek kordonu dokusu ile karşılaştırmasını yapmak
2. Aynı gruplarda göbek kordonu dokusunda; immünohistokimyasal olarak CD73, CD90, CD105, CD34, CD45 antikorları kullanılarak boyamaları yapıp; görsel olarak WJ-MKH’lerini göstermek
3. GK dokusundan amnion zarı, arter ve venleri ayırdıktan sonra kalan WJ’ni enzimatik yöntemle ayırıp, buradaki MKH’lerinin CD73, CD90, CD44, CD105 ve bunların (+) ve (–) kontrol karışım (CD34, CD45) antikorlarını kullanarak akım-sitometri cihazı ile sayılarını belirleyerek varsa sayısal farkı göstermekti.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre Tanımı ve Önemi

Genel olarak kök hücreler; kendi kendini yenileme, farklı hücrelere farklılaşma yetkinliği (potensi) ve klon oluşturma yeteneği olan hücreler olarak tanımlanmışlardır. Diğer hücreler gibi özelleşmiş yapıya sahip değildir ve bu hücrelerden; dokularda az sayıda bulunmaları, yaşam boyu belli oranda bölünmeleri ve bölündükçe sayılarını korumaları (bölündüğü zaman en az bir yavru hücreyi kök hücre havuzuna aktarır), uyarı almadığı zamanlarda büyüme hızlarının yavaş olması ve uyarı aldığı zaman bölünme hızlarını artırabilmeleri, organizmanın yaşamı boyunca varlıklarını koruyabilmeleri, büyüme faktörleri ve sinyal yollarına oldukça duyarlı olmaları, diğer hücrelere oranla farklı kromatin örüntüsüne sahip olmaları, strese karşı dayanıklı olmaları gibi özelliklere sahip olması ile ayrılırlar [1, 12]. Kök hücreler dokularda hücre rezervi olarak bulunurlar. Bu yönleri ile çeşitli hastalıkların tedavisi için umut olmuş ve doku mühendisliği gibi bir bilimin temelini oluşturmuştur. Günümüzde özellikle hematolojik maligniteler başta olmak üzere bazı hastalıkların tedavisinde kullanıma girmiş, kanser, otoimmün ve kronik enflamatuar hastalıklar gibi bazı hastalıkların tedavisi için ise araştırmalar umut vaat etmektedir [13, 14].

2.1.1. Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler farklılaşma potansiyeline ve bulundukları yere göre iki ana gruba ayrılırlar [1, 15].

I- Farklılaşma potansiyeline göre:

A. Totipotent kök hücreler: Tek başına bir organizmayı oluşturabilecek potansiyele sahip olan hücrelerdir. Hem embriyoyu hem de zarlarını oluşturabilecek en yüksek farklılaşma potansiyelini taşırlar. İki hücreli embriyodan morula aşamasına kadar olan dönemdeki blastomer hücreleri totipotent kök hücrelerdir.

- B. Pluripotent kök hücreler:** Her üç germ yaprağı hücrelerine dönüşebilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Embriyonik zarlara dönüşemediği için totipotent hücreler gibi başlıbaşına bir organizmayı meydana getiremezler. Embriyo gelişiminin 5. gününden 15-16. gününe kadar olan gelişim sürecinde iç hücre kitlesini oluşturan her bir hücre pluripotent kök hücredir ve 200 kadar farklı somatik hücreye dönüşebilir.
- C. Multipotent kök hücreler:** Birbirine yakın pek çok hücreye dönüşebilen kök hücreler olmasına rağmen pluripotent kök hücreler kadar geniş farklılaşma yelpazesine sahip değildirler. Embriyoda 16. günden itibaren trilaminar germ diskinin oluşması ile birlikte görülen kök hücrelerdir.
- D. Oligopotent kök hücreler:** Belli bir dokuda bulunan ve bu dokuya ait sınırlı sayıda bazı hücrelere dönüşebilme yeteneğinde olan kök hücrelerdir.
- E. Unipotent (progenitor-öncül) kök hücreler:** Sadece bir tek hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelerdir.

II- Bulundukları yere göre kök hücreler

- A. Embriyonik kök hücreler:** Germ hücresi dahil her üç germ yaprağından köken alan hücrelere dönüşebilen kök hücrelerdir. Blastokistin iç hücre kitlesindeki her bir hücre embriyonik kök hücredir.
- B. Embriyonik olmayan kök hücreler**
- a- Fetal kök hücreler:** Embriyonun 28. haftasından itibaren organ taslaklarında bulunan, kültür ortamında embriyonik kök hücreler kadar olmasa da pek çok hücreye dönüşebilen multipotent kök hücrelerdir.
- b- Erişkin kök hücreler:** Karaciğer, kemik iliği, kas gibi yetişkin dokularında bulunan ölen hücrelerin yerine yenisini oluşturmak için bulunan hücrelerdir. Başlıcaları;
- **Hematopoietik kök hücreler:** Kemik iliği, periferik kan dokusu ve kordon kanı gibi dokularda hücre rezervini oluşturan kök hücrelerdir.
 - **Mezenkimal kök hücreler:** Organların bağ dokusundan kaynaklanan yüksek çoğalma ve başlıca bağ, destek ve yağ dokusu hücreleri olmak üzere birçok hücreye dönüşebilen fakat pluripotent hücreler kadar geniş dönüşebilme yeteneği olmayan kök hücrelerdir.

Mezoderm tabakasından köken almakla birlikte vücudun bazı bölgelerinde nöral krista kaynaklı mezenkim dokudan da gelişirler

- **Organlardaki kök hücreler:** Beyin, kalp gibi organlarda bulunan ve bu organlara özgü olan kök hücrelerdir.

c- **Kadavra kök hücreler:** Organizmanın ölümünden sonra elde edilen kök hücrelerdir.

d- **İndüklenmiş pluripotent kök hücreler:** Farklılaşmış somatik hücrelerin bir dizi transkripsiyon faktörüne maruz bırakılarak, farklılaşma programına tabi tutulup dediferansiasyon yolu ile laboratuvar ortamında oluşturulmuş kök hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler kadar farklılaşma potansiyeli gösterebilirler [16].

2.1.2. Kök Hücre Özellikleri ve Kullanım Alanları

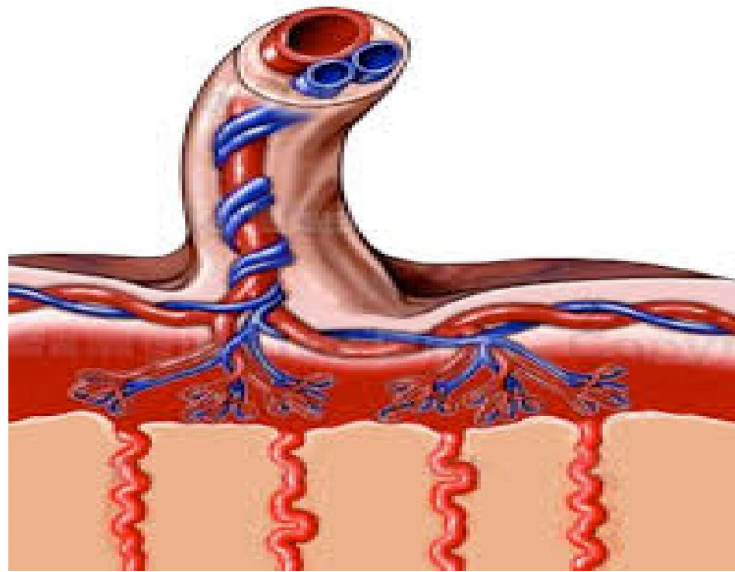
Kök hücreler başlıca kendini yenileme (self-renewal), farklılaşma (plastisite) ve köklülük (stemness) olmak üzere üç temel özelliğe sahiptir. Bir takım yüzey belirteçleri kullanılarak diğer hücrelerden ayırt edilebilirler. Kök hücre çeşitlerine göre bu yüzey belirteçleri farklılık göstermektedir. Kök hücreler kendilerini yenileme ve farklılaşma özellikleri ile mevcut olan kök hücre havuzunu korurlar. Kök hücrelerin bulunduğu mikroçevreye kök hücre nişi adı verilir. Niş ile kök hücrelerin etkileşimi sonucu hücre kaderi belirlenir. Kök hücreler etrafındaki hücrelerden, adezyon molekülleri ve ekstraselüler matriks bileşimlerinden etkilenirler. Nişteki kök hücrelerin kimliğini kazanması ve korumasında; çözünür faktörler (büyüme faktörleri, sitokin, kemokinler), ortamdaki oksijen basıncı, fiziksel ve kimyasal faktörler (pH, iyon dengesi-kalsiyum konsantrasyonu, metabolitler-ATP vb.) önemli rol oynarlar [17, 18]. Kök hücreler dokularda gerektiği zaman somatik hücrelere dönüşerek dokunun yenilenmesi, korunmasını ve tamirini gerçekleştirirler. Bu özelliklerin tanımlanıp kök hücrelerin laboratuvar ortamında elde edilip çoğaltılabilmesi sonucunda bu hücreler; hasarlanmış dokuların tamirinde, diyabet gibi kronik hastalıklar ile lösemi ve lenfomalar başta olmak üzere bazı kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır [15]. Kök hücreler salgıladıkları eksozomlar ile de ayrıcalıklı hücrelerdir. Günümüzde eksozomların da tedavi amaçlı kullanılabileceği, çoğu özelliği açısından kök hücrelere benzediği hatta bazı alanlarda kök hücrelere göre daha avantajlı oldukları görülmüştür [19, 20]. Son

yıllarda kök hücrelerden organoid oluşturulması ile çoğu hastalıkların teşhis ve tedavisi için bilimsel çalışmalarda da kullanılmakta ve henüz tedavisi yapılamayan hastalıklar için umut vaad edici bir kaynak olarak görülmektedir [21].

2.2. Göbek Kordonu

2.2.1. Göbek Kordonu Anatomisi:

Göbek kordonu; fetusun, yaşamını sürdürebilmesi için plasenta ile arasındaki bağlantıyı sağlayan bir yapıdır. Embriyolojik hayatın 3. haftasından itibaren gelişmeye başlayan göbek kordonu gebeliğin ilk trimesterinin geç dönemlerinde ultrasonografik olarak görülebilen, termde yaklaşık 40 gr ağırlığında, 50–60 cm uzunluğunda, 1.5–2 cm çapında olup oldukça esnek ve sağlam, yarı şeffaf görünümlü bir yapıya sahiptir. Göbek kordonu dışarıdan amnion zarı ile sarılıdır. İçinde 2 adet arter, 1 adet ven ve bu damarları çevreleyen jelöz yapıda Wharton Jölesi (peltesi) bulunmaktadır. Fetustan dönen kanı taşıyan umbilikal arterler plasentanın koryon plağına girerler ve dallar vererek dağılırlar. Bu dallar koryon villuslarının içlerine girerek fetal arteriyal kapillerleri oluştururlar ve venöz kapillerlerle devam ederek koryon plağına geri dönerler. Venöz kapillerler toplanarak umbilikal ven aracılığıyla plasentadan göbek kordonuna devam eder ve temiz kanı fetusa götürür [22]. Göbek kordonu ince halat şeklinde bir yapıda olup, spiral gibi sarmallaşarak uzanır (Resim 1, Resim 2). Bu sarmal şekilli yapısı ve Wharton Jölesinin pelte kıvamında olması ile kan akımı olası kıvrılma ve bükülmelerden korunur [23].



Resim 1: GK, plasenta birleşim yeri

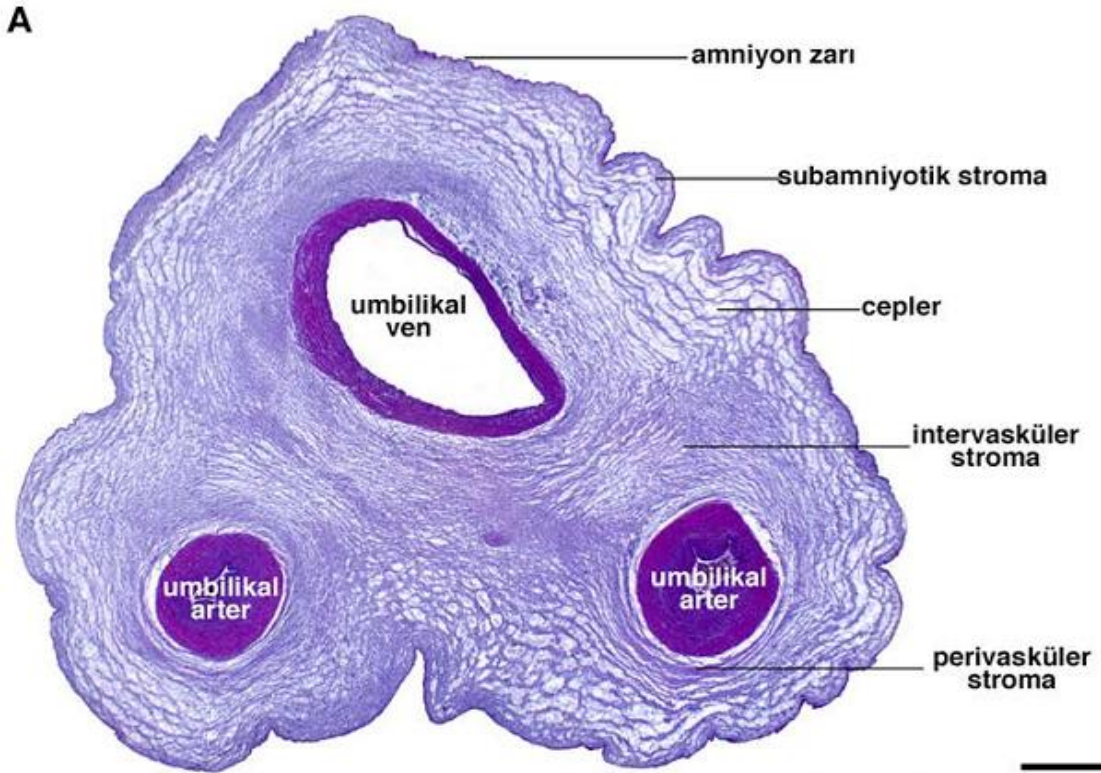


Resim 2: Proksimal ve distal kısımları kesilmiş GK

2.2.2. Göbek Kordonu Histolojisi

Göbek kordonu, bazal membran üzerine oturan ve tek/çok katlı yassı-küçük epitelden oluşan amnion zarı ile sarılmıştır. Altında kalan stromaya subamniyotik stroma adı verilir, stromanın bu bölümünde az sayıda stroma hücresi, dağınık ve ince kollajen lif demetleriyle (tip I, III ve VI kollajen) birlikte bol miktarda hücrelerarası sıvı içeren bir ortamda bulunurlar. Subamnion tabakasının altında proteoglikan ve hiyaluronik asitten zengin amorf yapıda bir matriks olan ve ‘Wharton Jölesi’adıyla verilen muköz bağ dokusu bulunmaktadır (Resim 3). Wharton Jölesi, iki arter ve bir venden oluşan umbilikal damarları çevreleyerek onları destekleyen ve koruyan bir yapıdır. Yapısında, kapillerler, lenfatikler ve sinir lifleri bulunmaz [24, 25]. Bazı özel boyalarla kordonun plasentaya yakın ucunda küçük otonomik sinir liflerinin bulunabileceği gösterilmiştir [26]. Wharton Jölesinin ana hücreleri myofibroblastlardır. Myofibroblast; aktin, kas-dışı miyozin, vimentin ve desmin içeriği ile umbilikal kan akımını düzenleyebilecek kontraktıl özelliktedir. Alfa düz kas aktin, perivasküler alanda ve amnion zarına yakın hücrelerde daha çok sentezlenirken, intervasküler alanda daha az bulunmaktadır. Myofibroblastların ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin, gebelik dönemlerine göre ve stromanın farklı bölgelerinde dağılımlarına göre değişiklik gösterdikleri böylece göbek kordonunun turgorunu düzenlemede etkili olduğu anlaşılmıştır [25, 27]. Wharton Jölesinin temel maddesi ise kollajen fibrilleri (tip 1, 3, 4, 5, 6), hiyaluronan ve sülfatlanmış glikozaminoglikanlardan oluşmaktadır [28]. Aralarında elastik, kollajen lifler ve bunların arasında birbirine bağlantılı içi visköz sıvı

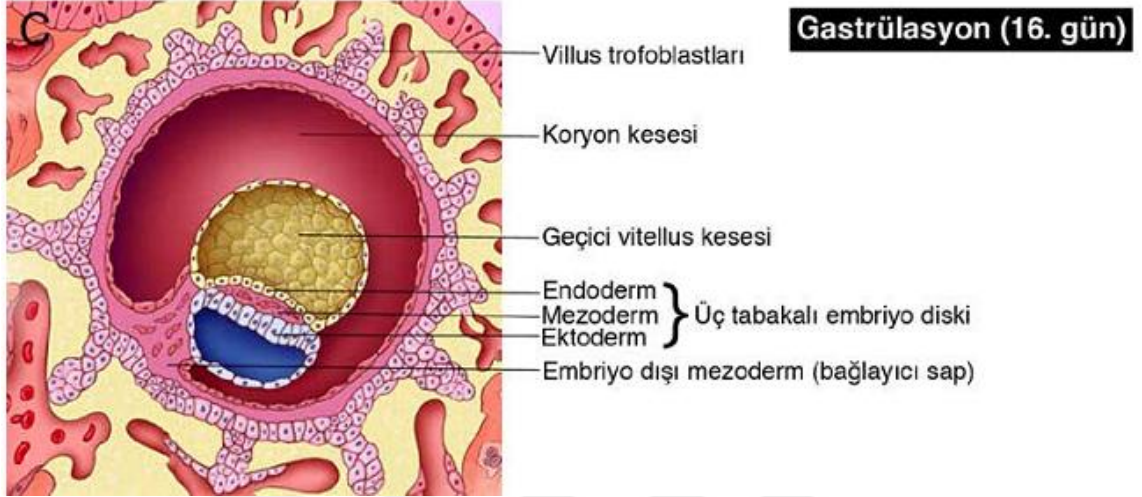
dolu olan porlar (cepler) bulunmaktadır. Bu porlar sayesinde doku basınç altında kalırsa su rahatlıkla hareket edebilmekte ve dokuya dayanıklılık sağlamaktadır. Geniş porlar damarların etrafını sararak, pulsatil kan akımı sırasında damar duvarına da hareket kabiliyeti kazandırır [2]. Wharton Jölesi stroması ayrıca mezenkimal kök hücreler açısından oldukça zengindir. Bu hücreler; perivasküler bölge, intervasküler bölge ve subamniyotik bölgeler ve damarların subendoteliyal bölgesinde düzensiz olarak dağılmış olarak bulunmaktadır [24]. Göbek kordonudaki ven ve arterler iç kısımlarında endotelle sınırlanmıştır. İnternal elastik laminaları yer yer düz kas hücreleri ile kesilmiştir. Etrafını düz kas tabakası sarar ve bu tabaka arterlerde venden daha kalındır. Damarların eksternal elastik laminaları ve adventisyalı bulunmaz. Gebeliğin özellikle 20. haftasından sonra damarlarda hidropik değişiklikler görülmeye başlar ve damar duvarlarında fragmantasyonlar belirir [29].



Resim 3: İnsan göbek kordonu ve bölgeleri [1]

2.2.3. Göbek Kordonu Embriyolojisi

Göbek kordonu; embriyo gelişiminin yaklaşık 21. gününde embriyonik diskin trofoblastlardan uzaklaşması sonucu ekstra embriyonik mezodermin arada bağlantı sapı (bodystalk) şeklinde kalması ile oluşur [23, 30].

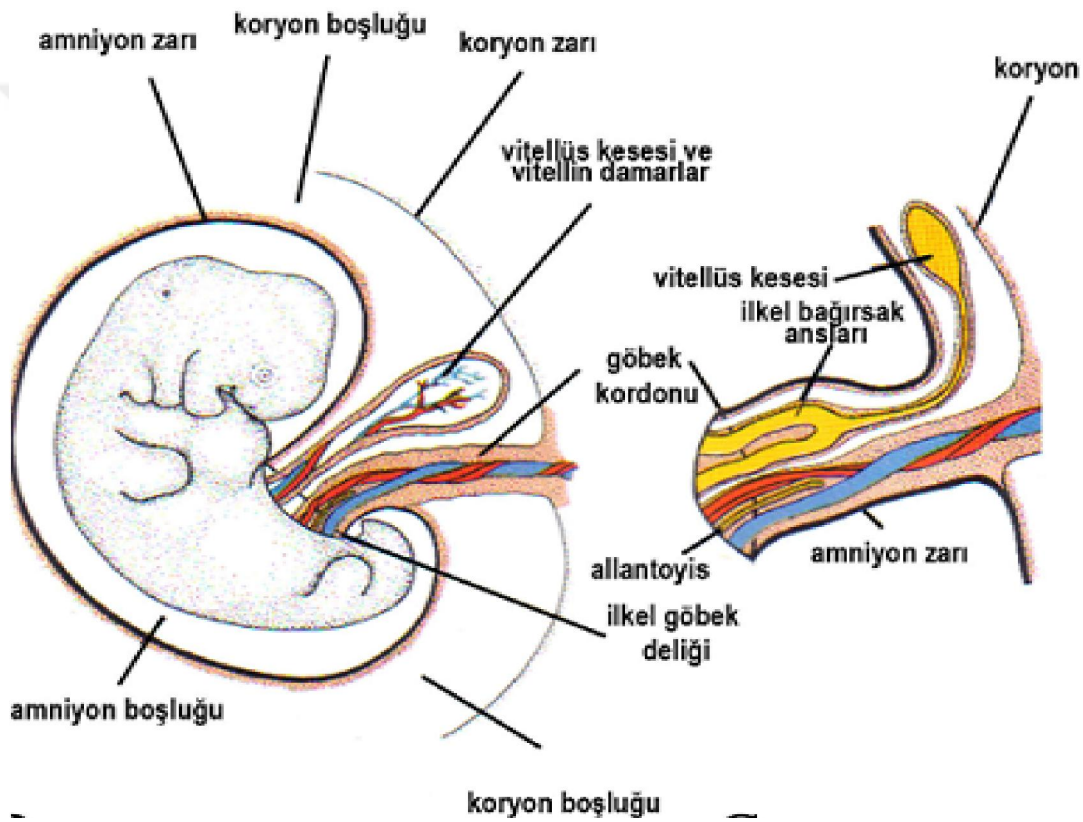


Resim 4: Bağlantı sapının oluşumu [1]

Böylece bir ucundan oluşmakta olan plasentaya bir ucundan da gelişen embriyoya bağlı bir yapı meydana gelir. Bu dönemde embriyonik diskin arkasında amnion kesesi, önünde yolk kesesi vardır (Resim 4). Gebeliğin 4. haftasından sonra amnion sıvı üretimindeki hızlı artış ile, amnion zarı korionik alanı doldurana dek şişer. Amnion zarı, korion zarına dokunduğunda her iki zarı döşeyen ekstraembriyonik mesoderm birleşir. Böylece korionik boşluk birkaç rudimenter vezikül haricinde kaybolur. Aynı zamanda embriyo büyüyüp kıvrılmaya başlar, amniyon zarı bu gelişime ayak uydurarak bağlantı sapı ve yolk kesesi çıkışı haricinde tüm embriyoyu sarar. Daha sonra embriyo öne doğru kıvrılır, beraberinde arkasındaki amnion zarı embriyoyu etrafından öne doğru sarar ve embriyonun önündeki yolk kesesini sıkıştırır, yolk kesesi üst ve alt olarak iki bölüme ayrılır. Üst bölümün öndeki kese kısmı vitellin arter ve veni oluştururken, arkadaki sap kısmı orta barsağı (mid gut) oluşturur. Yolk kesesinin alt bölümünün önündeki bağlantı sapı kısmı; umbilical venleri oluşturur. Yaklaşık 32-33. günde sağ umbilikal ven atrofiye olarak kaybolur [31]. Yolk kesesinin geride kalan kısmı ise arka barsak (hindgut) ve allantois kesesini oluşturur. Allantoisin kan damarları umbilikal arterleri oluşturur [32]. Yolk kesesinin orta barsakla ilişkide olan, vitellin

kanalı (omfalomezenterik kanal), alttaki vücut sapından gelişen umbilikal damarlarla, sonradan birbirlerine yaklaşıp yapışarak fetüsün göbek halkasını ve ilkel göbek kordonunu oluştururlar. Yaklaşık 5. hafta civarında ilkel bir göbek halkası meydana gelmiş olur. Bu halkanın içinden (Resim 5)

- 1- İki arter ve bir venden oluşan göbek damarları ile allantois kesesini içeren bağlantı sapı.
- 2- Vitellus kesesi damarları ve vitellus kesesi sapı ya da vitellus kanalı.
- 3- İntra ve ekstraembriyonik sölom boşluklarını birleştiren kanal geçer



Resim 5: Göbek kordonu gelişimi 5. Hafta [33]

Bu sırada amnion sıvısının progresif bir şekilde artış göstermesi ile, vitellin kanalı ve gövde sapını çevreleyen bir amniotik zar tüpü oluşur. Bu yapıya artık 'göbek kordonu'denir. Göbek kordonu uzadıkça, vitellin kanal daralır. Göbek kordonunun içeriği embriyonik jelötinoz bir doku olan Wharton jeli ile dolmaya başlar. Embriyonik dönemin 10. haftasında gastrointestinal sistem gelişir, karın boşluğu henüz bu hızla gelişen barsak halkalarını sığdıracak büyüklükte olmadığı için göbek kordonuna çıkıntı

yaparak fizyolojik herniyi oluşturur. Daha sonra barsak ansları 3. ayın sonunda karın boşluğunun büyüyüp genişlemesiyle embriyo bedenine çekilirler. Bundan sonra göbek kordonundaki sölom boşluğu, allantois kesesi, vitellus kanalı ve damarları silinir. Kordonda terme kadar Wharton Jölesi ile sarılı iki arter ve bir ven kalır [23].

2.3. Göbek Kordonu Kök Hücreleri

Tıbbi bir atık olarak görülen göbek kordonu gerek noninvaziv bir şekilde elde edilmesi, gerekse kullanımı açısından etik problemlere yol açmaması ile kolay ulaşılabilir bir kaynak olarak görülmektedir. Göbek kordonunun kök hücreler açısından oldukça zengin bir doku olduğu daha önce yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir. Bulundukları yere göre göbek kordonundaki kök hücreler; Amniotik membran, kord sınırlayıcı membran (subamnion), Wharton Jölesi (WJ), perivasküler bölge, kord kanı kök hücreleri olmak üzere sınıflandırılmıştır [1]. Göbek kordonu stromasında yapılan çalışmalar bu hücrelerin temel olarak mezenkimal kök hücre özelliğinde olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda göbek kordonu kök hücreleri embriyonik ve yetişkin kök hücrelerin bazı özelliklerini de sergilemektedirler. Bu farklı alanlardan elde edilecek olan MKH popülasyonlarının birbirinden farklı olup olmadıkları halen araştırma konusu olmaktadır.

2.4. Wharton Jölesi Kök Hücreleri ve Genel Özellikleri

Göbek kordonunu çevreleyen amnion zarı ve kordon damarları çıkarıldıktan sonra geriye kalan dokudan elde edilen kök hücreler Wharton Jölesi mezenkimal kök hücrelerini içermektedir. Wharton Jölesi mezenkimal kök hücrelerini tanımlamak için özel hücre yüzey belirteci bulunmamaktadır. Bu hücreler mezenkimal hücre belirteçleri olan CD105, CD73, CD90, CD44, CD29, CD166 ve Stro-1 ile pozitif boyama gösterirken; mezenkimal kök hücrelerde ekprese edilmeyen CD45, CD34 gibi hematopoietik yüzey belirteçleri, CD14 ve CD11b gibi makrofaj ve monosit belirteçleri, CD79a veya CD19 gibi B lenfosit belirteçleri ve HLA-DR gibi lökosit antijenleri açısından negatif boyanmaları ile tanınırlar [34]. Hyaluronik asit reseptörü olan CD44 de buradaki mezenkimal kök hücreler için kullanılan yaygın bir belirteçtir. Her ne kadar mezenkimal kök hücre olarak adlandırılrsa da diğer dokulardan elde edilen mezenkimal kök hücrelere göre daha potentir ve her üç germ yaprağından köken alan

hücrelere dönüşebilirler. Hücre kültürlerinde erken pasajlarda OCT4, SOX2, NANOG, Rex1, LIN28 gibi bilinen pluripotent markerlarını ifade etse de embriyonik kök hücreler gibi teratom oluşturmazlar [35]. Dokulara nakledildiklerinde tümör oluşumu yapmazlar. Bu özellikleri ile embriyonik kök hücreler gibi kanser oluşturabilen hücreler ile yapılan çalışmalarda besleyici tabaka (feeder) olarak kullanılmaktadırlar [36]. Tip I MHC (doku uyumluluk kompleksi) molekülleri olan HLA-A, HLA-B ve HLA-C'yi içerirken Tip II MHC molekülü olan HLA-DR'yi içermediği için hipoimmünojenik olarak kabul edilir ve doku reddine yol açmazlar T, B ve NK hücre proliferasyonlarını inhibe ederler ayrıca immünmodulator hücreleri indükleyen ve NK hücrelerinin IFN üretimini baskılayan HLA G5 eksprese ederler. Fetomaternal geçiş toleransı sağlayan HLA-E ve HLA-F eksprese ederler. Bulundukları ortama TGF- β 1, IL-10, VEGF ve HGF gibi immünsüpresyon faktörlerini salgırlar. Böylece immün cevabı uyarmazlar ve güçlü immünsüpresif etkiye sahiptirler [3]. Son derece korumalı plasental bariyer nedeni ile enfeksiyon açısından oldukça düşük riske sahiptir [37]. Yüksek telomeraz aktivitesine sahiptir, bölünme sayıları 80'e kadar çıkarken, kök hücre özelliklerini 10 pasajlamaya kadar koruyabilirler [38, 39]. Wharton Jölesi MKH leri hasarlı dokuda ve inflamasyon alanında toplanıp, IL-6, IL-8, IL12, SCF, Flt-3 gibi sitokinleri salgılayabildikleri için antienflamatuar özellikte olan hücrelerdir [35].

2.5. Wharton Jölesi Mezenkimal Kök Hücrelerinin Hastalıkların Tedavisindeki Potansiyel Roller

Wharton Jölesi kök hücreleri; proliferasyon kapasiteleri, immünsüpresif ekileri göz önüne alındığında ve teröpatik olarak daha aktif hücreler olarak düşünüldüğünde diğer bağ dokusu kök hücrelerine kıyasla hücresel tedavilerde tercih edilen kök hücreler haline gelmiştir. Primer ve metastatik kanserler dahil çeşitli hastalıkların tedavisi için yüksek potansiyele sahip hücreler olarak görünmektedir ve yakın gelecekte tedavi protokollerine girmek üzere olan ajanlardır. WJ-MKH'lerinin kanserli dokuları tedavi etme özelliği invitro ve invivo yapılan pek çok deneyde gösterilmiştir. İntrinsik olarak salgıladığı faktörlerle çoklu protein sentezi yapıp kanser hücre büyümesini durdurarak ve caspazları aktive ederek kanser hücrelerini apoptoza yönlendirmektedir. Ek olarak WJ-MKH lerinin gen analizleri sonucunda multiple tumor süpresör genleri aşırı aktive ettiği görülmüştür [40, 41]. İkinci mekanizma da

kanser hücrelerine karşı immün reaksiyon göstererek etki etmesidir. Rachakatla ve Matsuzuka ve arkadaşlarının yapmış oldukları deneylerde WJMKH'lerinin göğüs adenokanseri ve bronkoalveolar karsinomu tedavi edebilecek düzeyde interferon-beta salgılayabildikleri gösterilmiştir [42].

WJ-MKH'leri kültür ortamlarında kondrosit benzeri hücrelere dönüşebilmektedir, buradan hareketle, WJ-MKH'lerinin ileri yaş kronik hastalığı olan kıkırdak doku dejenerasyonlarında kullanılabileceği düşünülmüştür. Hem kıkırdak dokuya dönüşebilmesi hem antienflamatuar özellikte olması, hem de doku tamiri için salgıladıkları mediatörlerle kıkırdak doku ve eklem yapılarının tamir ve dejenerasyonu için tedavi edici ajanlar arasında görülmektedir [43, 44].

WJ-MKH'leri; kontraktıl myokard hücresine dönüşebilmesi, myokard infarktüsü sonrası doku tamiri ve rejenerasyonuna katkıda bulunarak, infarkt alanında iyileşme ve ventrikül fonksiyonlarında düzelmeler sağlaması ile kardiyovasküler sistem için de doku mühendisliği alanında kullanılabilir uygun ajanlar arasında yerini almıştır [45, 46].

Karaciğer hastalıklarının tedavisinde de hepatosit benzeri hücrelere dönüşerek doku yenilenmesine katkı sağladığı ve metalloproteinazlar gibi endojen faktörler salgılayarak antifibrotik ve antienflamatuar özellikte oldukları gösterilmiştir [47, 48].

WJ-MKH'lerinin; yara iyileşmesi sırasında TGF- β , VEGF, PDGF, IL-6, IL-8, TGF- β 2, HIF-1 α , ve PAI-1 gibi mediatörler salgıladığı, neovaskülarizasyon ve reepitelizasyonu artırarak, yara yerine verilince fibroblastların daha hızlı aktive olup, yara iyileşmesini hızlandırdığı, skar dokusunda iyileşmeyi artırdığı gösterilmiştir [49-51].

WJ-MKH'leri bu hastalıkların yanı sıra; doku tamir yeteneği, hasarlı hücre ve dokuya tropizm göstermesi, immünmodülatör özelliğinin kuvvetli olması ile periferik sinir hasar tamirinden, otoimmün hastalıklara kadar pek çok hastalığın tedavisinde denenmiş ve çoğunda etkili ajanlar olarak görülmüştür.

2.6. Diyabetes Mellitus Tanımı ve Sınıflandırılması

Diyabet, insülin eksikliği ya da insülin etkisindeki defektler nedeniyle organizmanın karbonhidrat (KH), yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı,

sürekli tıbbi bakım gerektiren, kronik hiperglisemi ile karakterize metabolik ve multisistemik bir hastalıktır [52].

Tıp literatüründe diyabetin kliniğine benzer semptomlara ilk olarak M.Ö 1500 lü yıllarda Mısır papirüslerinde rastlanmıştır. Bu dönemde diyabet; fazla idrar yapılan, idrar yoluyla şeker kaybedilen bir hastalık olarak tanımlanmıştır. M.S. 200 yılında Kapadokyalı Areateus tarafından hastalığa Diabetes ismi verilmiştir [53]. Tarih boyunca da diyabetin tarifi, etyolojisi ve tedavisi sürekli değişip gelişerek günümüzdeki şeklini almıştır.

Gebelikte diyabetle ilgili yazılı literatüre ise 1882 yılında Duncan'ın yaptığı çalışmada rastlanılmıştır. Yaşları 21–38 arasında değişen 22 gebelikten 15'inde diyabet olduğunu tespit etmiştir. Daha sonra 1908'de Offergoldin, 57 diyabetli gebeliğin %66'sında perinatal ölüm olduğunu bildirmiştir. 1916'da Juslin ise, insülin öncesi dönemde gestasyonel diyabeti tanımlamış, o dönemde spontan abortus ve erken doğum oranının %30 olduğunu bildirmiştir [54]. 1922'de insülinin keşfiyle diyabete bağlı maternal ve perinatal mortalite oranları azalmaya başlamıştır.

Hastalığın temel patolojisini oluşturan insülinin salgılanması yada dokuları etkilemesi üzerinde bozukluk sonucu oluşan kronik hiperglisemi; başta kardiyovasküler sistem, böbrekler, göz ve sinir sistemi olmak üzere pek çok doku ve organı etkiler. Klinik olarak şikayetler, etkilenen organa göre değişmekle birlikte genel olarak hastalığın semptomları; polidipsi, poliüri, polifaji, noktüri, iştahsızlık, halsizlik, çabuk yorulma, açıklanamayan kilo kaybı olarak tarif edilmektedir. Daha az görülen semptomları ise ağız kuruluğu, tekrarlayan mantar enfeksiyonları, kaşıntı ve bulanık görme şeklinde sıralanmaktadır.

Geniş klinik prezantasyona sahip olan diyabet hastalığı; farklı patofizyolojik süreçlerden etkilenen, sınırları net olarak çizilememiş kompleks bir hastalıktır. Bu nedenle hastalık zaman içinde değişik şekillerde sınıflandırılmıştır ve buna göre tanı kriterleri belirlenmiştir.

Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneğinin Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Diyabet Federasyonunun verilerine göre hazırladığı tanı kriterleri tablo halinde görülmektedir [52].

Tablo 1: Plazma glukoz düzeylerine göre DM tanı kriterleri [52]

	Aşık DM	İzole BAG ^(**)	İzole BGT	BAG + BGT	DM Riski Yüksek
APG (≥8 st açlıkta)	≥126 mg/dl	100-125 mg/dl	<100 mg/dl	100-125 mg/dl	-
OGTT 2.st PG (75 g glukoz)	≥200 mg/dl	<140 mg/dl	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl	-
Rastgele PG	≥200 mg/dl + Diyabet semptomları	-	-	-	-
A1C^(****)	≥%6.5 (≥48 mmol/mol)	-	-	-	%5.7-6.4 (39-46 mmol/mol)

^(*)Glisemi venöz plazmada glukoz oksidaz yöntemi ile 'mg/dl' olarak ölçülür. 'Aşık DM' tanısı için dört tanı kriterinden herhangi birisi yeterli iken 'İzole BAG', 'İzole BGT' ve 'BAG + BGT' için her iki kriterin bulunması şarttır. ^(**)2006 yılı WHO/IDF Raporunda normal APG kesim noktasının 110 mg/dl ve BAG 110-125 mg/dl olarak korunması benimsenmiştir. ^(****)Standardize metotlarla ölçülmelidir.

DM: Diabetes mellitus, APG: Açlık plazma glukozu, 2.st PG: 2. saat plazma glukozu, OGTT: Oral glukoz tolerans testi, A1C: Glikozillenmiş hemoglobin A_{1c}, BAG: Bozulmuş açlık glukozu (impaired fasting glucose), BGT: Bozulmuş glukoz toleransı (impaired glucose tolerance), WHO: Dünya Sağlık Örgütü, IDF: Uluslararası Diyabet Federasyonu.

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

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

şeklinde dört yöntemden herhangi biri ile aşık diyabet tanısı konulabilmektedir. Tabloda verilen İzole Bozulmuş Açlık Glukozu (BAG) ve İzole Bozulmuş Glukoz Toleransı (BGT) gibi (plazma glukozunun ara değerlerde kaldığı ölçümlerde) durumlarda ikinci bir testle tanıyı doğrulamak gerekmektedir [52].

1979 yılında National Diabetes Data Group (NDDG) diyabeti insülin bağımlı diabetes mellitus (IDDM) ve insülin bağımlı olmayan diabetes mellitus (NIDDM) olarak iki ana gruba ayırmıştır. Daha sonra genetik, çevresel faktörler ve hayat tarzının etkisine bağlı olarak diyabet'in birçok değişik tipi tanımlanması ile 1997 yılında, endokrinologlardan oluşan uluslararası komite yeni bir sınıflandırmada sunmuş ve American Diabetes Association (ADA) ve World Health Organization (WHO) tarafından onaylanmıştır [52, 55].

Tablo 2: DM Sınıflaması [52]

I. Tip 1 diyabet (Genellikle mutlak insülin noksanlığına sebep olan β -hücre yıkımı vardır)	
A. İmmün aracılıklı B. İdiyopatik	
II. Tip 2 diyabet (İnsülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir)	
III. Gestasyonel diabetes mellitus (GDM) Gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğumla birlikte düzelen diyabet	
IV. Diğer spesifik diyabet tipleri	
A. β-hücre fonksiyonlarının genetik defekti (monogenik diyabet formları) 20. Kromozom, HNF-4α (MODY1) 7. Kromozom, Glukokinaz (MODY2) 12. Kromozom, HNF-1α (MODY3) 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4) 17. Kromozom, HNF-1β (MODY5) 2. Kromozom, NeuroD1 (MODY6) 2. Kromozom, KLF11 (MODY7) 9. Kromozom, CEL (MODY8) 7. Kromozom, PAX4 (MODY9) 11. Kromozom, INS (MODY10) 8. Kromozom, BLK (MODY11) - Mitokondriyal DNA 11. Kromozom, Neonatal DM (Kir6.2, ABCC8, KCNJ11 mutasyonu) - Diğerleri B. İnsülinin etkisindeki genetik defektler - Leprechaunizm - Lipoatrofik diyabet - Rabson-Mendenhall sendromu - Tip A insülin direnci - Diğerleri C. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları - Fibrokalkülöz pankreatopati - Hemokromatoz - Kistik fibroz - Neoplazi - Pankreatit - Travma/pankreatektomi - Diğerleri D. Endokrinopatiler - Akromegali - Aldosteronoma - Cushing sendromu - Feokromositoma - Glukagonoma - Hipertiroidi - Somatostatinoma - Diğerleri	E. İlaç veya kimyasal ajanlar - Atipik anti-psikotikler - Anti-viral ilaçlar β-adrenerjik agonistler - Diazoksit - Fenitoin - Glukokortikoidler α -İnterferon - Nikotinik asit - Pentamidin - Proteaz inhibitörleri - Tiyazid grubu diüretikler - Tiroid hormonu - Vacor - Statinler - Diğerleri (Transplant rejeksiyonunu önlemek için kullanılan ilaçlar) F. İmmün aracılıklı nadir diyabet formları - Anti insülin-reseptör antikorları "Stiff-man" sendromu - Diğerleri G. Diyabetle ilişkili genetik sendromlar - Alström sendromu - Down sendromu - Friedreich tipi ataksi - Huntington korea - Klinefelter sendromu - Laurence-Moon-Biedl sendromu - Miyotonik distrofi - Porfiriya - Prader-Willi sendromu - Turner sendromu - Wolfram (DIDMOAD) sendromu - Diğerleri H. Enfeksiyonlar - Konjenital rubella - Sitomegalovirus - Koksaki B - Diğerleri (adenovirus, kabakulak)

HNF-1 α : Hepatosit nükleer faktör-1 α , MODY1-11: Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet formları 1-11 (maturity onset diabetes of the young 1-11), HNF-4 α : Hepatosit nükleer faktör-4 α , IPF-1: İnsülin promotör faktör-1, HNF-1 β : Hepatosit nükleer faktör-1 β , NeuroD1: Nörojenik diferansiyasyon 1, BLK: Beta lenfosit-spesifik kinaz, DNA: Deoksi-ribonükleik asit, HIV: İnsan immun eksiklik virüsü, DIDMOAD sendromu: Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optik atrofi ve sağırılık (deafness) ile seyreden sendrom (Wolfram sendromu), KLF11: Kruppel like factor 11, CEL: Carboxyl ester lipase (bile salt-dependent lipase), PAX4: Paired box4, ABCC8: ATP-binding cassette C8, KCNJ11: Potassium inwardly-rectifying channel J11, INS: İnsülin.

Tabloda görüldüğü gibi etyolojiye göre diyabet temel olarak; Tip 1, Tip 2, Gestasyonel Diyabet ve diğer diyabet grupları olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır.

2.6.1. Tip I Diyabet

Daha önce insülin bağımlı diyabet ve juvenile başlangıçlı diyabet olarak adlandırılmıştır. Mutlak insülin eksikliği vardır. Hastaların %90'ında otoimmün (Tip 1A), %10 kadarında nonotoimmün (Tip 1B) β -hücre yıkımı söz konusudur. Hastaların yaklaşık %85-90'ında adacık hücrelerine, insüline ve glutamik asit dekarboksilaza karşı otoantikorlar saptanır. Bazı HLA tipleri tip 1 diyabet için genetik yatkınlık oluşturmaktadır. Tip I Diyabette genellikle insülinin tam eksikliği söz konusudur ve insülinin dışardan yerine konulması ile hastalık tedavi edilir.

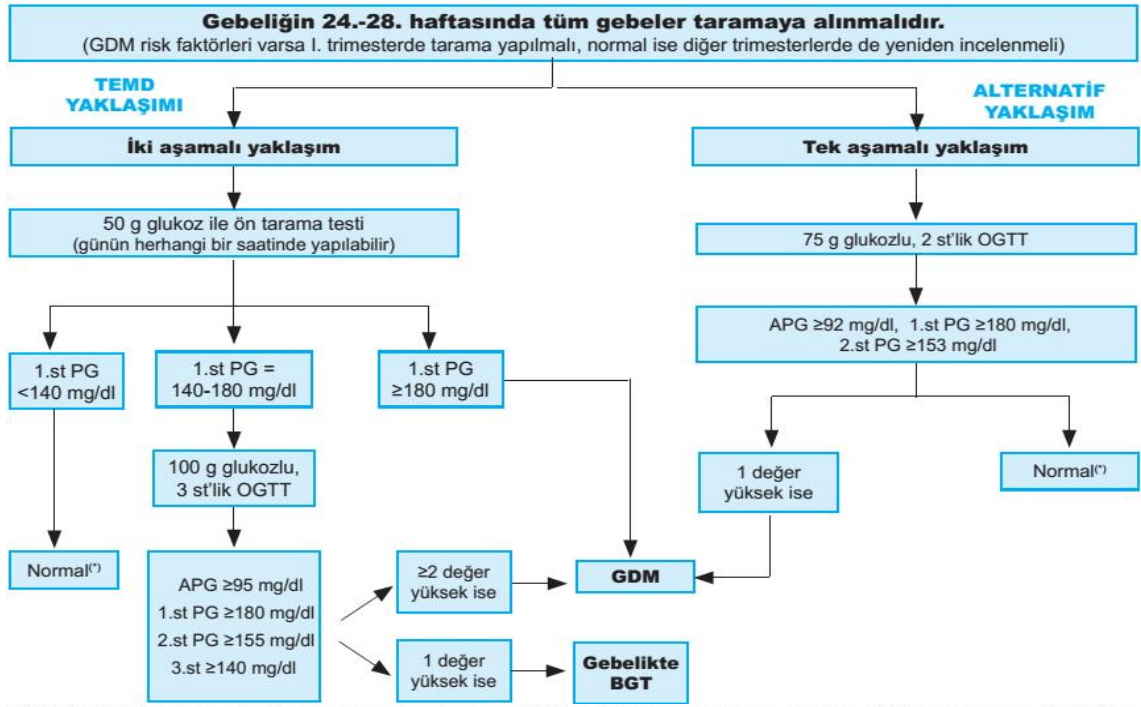
2.6.2. Tip II DM

Diyabet hastalarının %90-95'i bu gruptadır. İnsülinin anormal salınımı, insülin duyarlılığında azalma ya da hedef dokularda insüline karşı direnç oluşması ile meydana gelir. Hastaların çoğu obezdir ve buna bağlı olarak periferik insülin direncinin beta-hücre tüketimine yol açtığı düşünülmektedir. Tip 1 diyabetin aksine tip 2 diyabetikler genellikle insüline ihtiyaç duymazlar ve hastalık daha ileri yaşlarda ortaya çıkar. Ailesel yatkınlık dikkat çekicidir [52, 55, 56].

2.6.3. Gestasyonel DM (GDM)

Gebelik sırasında başlayan ya da ilk defa gebelik sırasında tanısı koyulan çeşitli derecelerdeki karbonhidrat intoleransıdır, genellikle gebeliğin ikinci yarısında başlar [56, 57]. Gebeliğin 24. haftasından sonra tarama amaçlı 50 g glikoz ile tolerans testi yapılır. Diyabet şüpheli sonucu olan gebelere 100 g glikoz ile oral glikoz tolerans testi (OGTT) uygulanarak GDM tanısı koyulabilir. GDM taraması Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği'nin hazırlamış olduğu şemada standardize edilmiştir.

Tablo 3: GDM tanı algoritması [52]



2.6.4. Diyabetin Komplikasyonları

Kan şekerinin olması gereken değerin üstünde uzun süre kalması ve kan şekerinde olan ani yükselmeler, beraberinde görülen hormonal ve metabolik değişiklikler, pek çok doku ve organı olumsuz etkileyerek komplikasyonları meydana getirmektedir. Bu komplikasyonlar akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır.

Akut komplikasyonlar; diyabetik ketoasidoz, hiperozmolar nonketotik koma, laktik asidoz ve hipoglisemidir. Kronik komplikasyonlar; makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar olmak üzere iki çeşittir. Makrovasküler komplikasyonlar hipertansiyon, koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalık olarak sayılırken, mikrovasküler komplikasyonlar ise retinopati, nefropati, nöropatidir. Kronik komplikasyonların temelinde vasküler patolojiler vardır ve damar endotel hasarı bunun alt yapısını oluşturur. İnsülin normalde Nitrik Oksit (NO) ekspresyonunu artırması ve Serbest Oksijen Radikallerini (ROS) azaltması ile endoteli koruyucu özelliktedir. Hiperglisemide oluşan polyol yolu aktivasyonu ve glikozile son ürünlerin artması, antioksidan mekanizmaları azaltır ve endotel dokusunda oksidatif stresi tetikleyerek hasar oluşturur. Endotel hasarından ilk olarak ve en çok etkilen dokular ise

mikrovasküler ağların çok olduğu böbrek, retina gibi yerlerdir. Kontrolsüz diyabete uzun süre maruz kalınması durumunda bu dokularda kronik komplikasyonlar meydana gelmektedir.

2.6.4.1. Diyabetik Nefropati

Diyabetin en yıkıcı komplikasyonlarından biridir, diyabet hastalarının yaklaşık üçte birinde görülür. Diyabetik nefropati gelişiminde birçok gen ve çevresel etmenler rol oynar. Hiperglisemiye ek olarak, obezite, metabolik sendrom, hipertansiyon ve hiperlipidemi diyabetik nefropati gelişimine katkıda bulunan etkenler arasındadır. Hiperglisemi, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin sentezini artırarak, ayrıca glukoz metabolizmasının poliol, protein kinaz C ve heksozamin yollarına kaymasına neden olarak, renal fonksiyonel ve yapısal değişiklikleri başlatır

Hastalığın tanısı; diyabeti olan hastalarda başka herhangi bir sebep olmadan görülen; albüminüri, glomerüler filtrasyon hızının azalması ve hipertansiyon ile konulmaktadır. Patolojik olarak glomerüllerde; glomerülopati; mezengial proliferasyon, bazal membran kalınlaşması, diffüz ya da nodüler glomeruloskleroz görülürken, tubulopati ve vaskülopati de nefropati tanısını destekler.

Tablo 4: Üriner Albümin Ekspresyonunun değerlendirilmesi [52]

	Sabah ilk idrarda	24 saatlik idrarda	
	Albumin/kreatinin oranı (mg/g)	UAE (mg/gün)	UAE hızı (µg/dk)
Normoalbuminüri	<30	<30	<20
Mikroalbuminüri^(*)	30-300	30-300	20-200
Makroalbuminüri (Klinik albuminüri)	>300	>300	>200

^(*)Son 3-6 ayda yapılan 3 ölçümden en az 2'si normalden yüksek ise mikroalbuminüri kabul edilir. Son 24 saatte yoğun egzersiz yapılmışsa, veya infeksiyon, yüksek ateş, konjestif kalp yetersizliği, belirgin hiperglisemi ve hipertansiyon varsa UAE yüksek çıkabilir.
UAE: Üriner albumin ekskresyonu.

Masif proteinüri, 24 saatlik idrarda 300 mg/gün ve üzerinde protein atılımının 3-6 ay süre ile en az iki kontrolde tespit edilmesidir. Nefropati; hipertansiyon, proteinüride progressif artma ve böbrek fonksiyonlarında bozulma ile seyreden tablodur. Süreç 4 evrede değerlendirilir: Hastalık; glomerüler filtrasyon hızının (GFR)

arttığı hiperfiltrasyon evresi ile başlar, artmış plazma glukozu ve diğer ileri glikozillenme ürünlerinin atılımı için glomerüle gelen kan akımı artmıştır, bu dönemde kan basıncı da yükselmiştir. İkinci evre, sessiz evredir, klinik bulgu yoktur, yaklaşık 15 yıla kadar sürebilir. Üçüncü evre mikroalbuminüri evresidir. İdrarda albumin atılım hızı da 20-200 µg veya 24 saatte 30-300 mg'dir. Glomerul filtrasyon hızı genel olarak azalmıştır. Hipertansiyon eşlik eder. Bu evrelerde hastalık tedavi edilmeye başlanılırsa son dönem böbrek yetmezliği geciktirilebilir. Mikroalbuminüri, nefropatinin en erken belirteci olduğu gibi Tip 1 ve Tip 2 DM'li hastalarda kardiyovasküler mortalite ve morbiditenin de belirleyicisidir. Bu nedenle mikroalbuminüri varlığı, mümkün olabilecek vasküler hastalıkları taramak ve tüm kardiyovasküler risk faktörlerinin azaltılması için bir endikasyondur. Dördüncü evre patolojik olarak glomerüllerde sklerozun da görüldüğü aşık nefropati evresidir. Hipertansiyon yerleşmiştir, günde 500 mg'ın üzerinde proteinüri görülür, makroalbuminüri dönemi de denilmektedir. Beşinci evre; son dönem böbrek yetmezliği evresidir. Üre, kreatinin yükselmiştir, üremi ile birlikte sıvı retansiyonu ve ödem görülür, ağır hipertansiyon eşlik eder. Bu dönemde artık tek tedavi diyalizdir [58-60].

2.6.4.2. Diyabetik Retinopati

Diyabetin en ciddi komplikasyonlarından olan retinopati; 20–65 arası yaş grubunda görülen önlenemez ve / veya tedavi edilebilir en önemli körlük nedenidir. Diyabetik retinopati, retina kapiller damarları, venülleri ve arteriollerinin tutulduğu özel bir anjiopatidir. Oluşan retinopati tabloları nonspesifik ve progressiftir. Her zaman aynı hızla ilerlemez, zaman zaman remisyonlar gösterir. Retinanın bir bölgesinde düzelmeler görülürken başka bölgelerde bozulmalar ortaya çıkabilir. Spontan regresyon görülse dahi bu oran %10'u geçmez. Retinopati gelişiminde en önemli etkenler; diyabete maruz kalınan süre ve kötü glisemik kontroldür. Diğer faktörler arasında ise, hipertansiyon, gebelik, böbrek yetmezliği, hiperlipidemi, sigara kullanımı ve obezite gibi etkenler sayılabilir [61, 62].

Diyabetik retinopatide temel sorun kapiller damarlardaki hasara bağlı olarak dolaşımın yani retina beslenmesinin azalmasıdır. Bu bölgelerdeki kan miktarını arttırmak için diğer kapiller damarlar genişler. Bunlar göz dibinde oluşan ilk değişikliklerdir. Oftalmoskop ile yapılan incelemede küçük kırmızı noktalar şeklinde

görülür ve “mikroanevrizma” bölgeleri olarak tanımlanır. İzleyen süreçte retinada ödem, lipid birikiminden kaynaklanan “sert eksuda”, kanama (hemoraji) gibi bir dizi değişiklik oluşur. Diyabetik retinopati için genel olarak; nonproliferatif retinopati, proliferatif retinopati ve makülopati olmak üzere üç şekilde klinik sınıflama yapılmıştır [62, 63].

Nonproliferatif diyabetik retinopati basit veya “background” retinopati diye de adlandırılır. Damarlarda dilatasyon ve kıvrıntılar başlar. Sonrasında, nokta şeklinde ufak retinal kanamalar, mikroanevrizmalar gelişir. Mikroanevrizmalar 15-60 mm çaplarında kırmızı noktacıklar olarak görülürler. Çizgisel veya alev şeklinde preretinal kanamalar ve sert ya da yumuşak eksudalar da bu dönemde görülebilirler. Retinal kanamalar yuvarlak ve kenarları belirsiz mum alevi şeklinde belirirler. Atılmış pamuk görüntüsündeki yumuşak eksudalar; sinir lifi tabakasının mikroenfarktüsüdür. Beyaz veya gri renkli yuvarlak şişlikler şeklinde görülürler ve sayılarındaki ani artış retinopatinin ilerlediğini gösterir. Sarı renkli ve şekilleri değişken olan sert eksudalar; özellikle makula bölgesindeki kapillerlerin geçirgenliğinin artması ile proteinlerin ve lipidlerin, dışarıya sızmasıyla oluşur. Retinal iskeminin artması ile nonproliferatif lezyonlar daha da ilerler ve intraretinal mikrovasküler bazı anormalliklere sebep olabilirler [63, 64].

Proliferatif Diyabetik Retinopati: Diyabetik oftalmopatinin en ciddi komplikasyonudur ve vitreusa kanama, retina dekolmanı ile görme kaybı riski yaratır. Bu devrede, optik diskten veya periferik damarlardan ince yeni damar yumakları oluşmaya başlar, bu damarlar çok kırılmandır, retina ya da vitreusa kolayca kanarlar. Zamanla fibröz doku bu damarların çevresini sarar ve vitreus jeli ile retina arasında yapışıklıklar meydana getirir. Glial proliferasyonla vitreal sıvının traksiyonu sonucu kanamaya veya retina dekolmanına sebep olur. Vitreus kanamasının kendisi de kontraksiyonu artırır. Yeni damarlar bazen ön kamera arasına doğru ilerleyerek, glokom yapabilirler. Bazen proliferatif değişiklikler olmaksızın da kapillerden sızıntılar meydana gelebilir. Bu sızıntı sonucu maküler ödem, ve/veya makülada vasküler tıkanmalarla da görme kayıpları oluşur [63, 64].

Makülopati: Makula bölgesinde iskemi veya ödem, retinada kalınlaşma ile karakterizedir. Artmış vasküler permeabiliteye bağlı olarak, retinal kapillere ve retinal pigment epitel tabakası ile sağlanan bariyere verilen zarar sonucu meydana

gelmektedir. Klinik olarak diyabetik makular ödemin fokal ve difüze olmak üzere iki çeşidi vardır; Fokal makular ödem iyi tanımlanmış sızıntı olan alanlar ile, difüze diyabetik makular ödem ise yaygın ve zayıf tanımlanmış sızıntılar ile karakterizedir [63, 64].

2.6.4.3. Diyabetik Nöropati

Diyabetik nöropati; diyabet hastalarında altta, travma, enfeksiyon, neoplazi gibi başka herhangi bir neden olmadan görülen periferik sinir bozukluğu olarak tanımlanmıştır. Sinir sisteminin otonom ve somatik olmak üzere her iki komponentini de etkiler. Klinik olarak aşikar olabildiği gibi belirti vermeden uzun yıllar subklinik olarak da seyredebilir. Hiperglisemi nöropatiyi geliştiren ana sebep olmakla beraber; diyabetin süresi, ileri yaş, hipertansiyon, hipoinsülinemi ve hiperinsülinemi de tabloyu önemli derecede etkiler [65, 66].

Hiperglisemin başlangıcında ilk aylarda, duyuşal sinir ileti hızı ve motor sinir ileti hızının azalması, ağrıya duyarlılığın artması (hiperaljezi) ve normal uyarılara ağırlı cevap verilmesi (allodini) gibi fonksiyonel bozukluklar görülmüştür. Hastalık ilerledikçe aksonopati, demiyelinizasyon, sinir dejenerasyonu ile ağrıya duyarlılık azalır. Patogeneğinde, sinir liflerinin metabolik bozulmasının yanı sıra, bu liflerde meydana gelen vasküler yetmezlik sonucu, kan akımının azalması da ikinci bir neden olarak suçlanmaktadır. Bunun yanı sıra birincil duyuşal nöron perikaryonunun hedef organ oluşu ve buraya nörotropik maddelerle olan retrograd desteğin bozulması (nörotropizm), endonöral hipoksi veya iskemi, immun mekanizmalar, growth faktörlerin eksikliği ve genetik yatkınlık diğer sebepler arasında sayılmaktadır [66, 67].

Diyabetik nöropati; distal simetrik polinöropati, otonom nöropati, akut ağırlı diyabetik polinöropati, insülin nöropatisi, kaşektik polinöropati, diyabetik amiyotrofi (proksimal diyabetik polinöropati) şeklinde sınıflara ayrılmıştır. En yaygın olarak görülen tipi distal simetrik polinöropatidir [66]. Daha sık görülmesi nedeni ile patolojisi en iyi açıklanmış nöropatidir. Burada en belirgin bulgu miyelinli sinir liflerinin kaybıdır. Aksonlarda da segmental demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon yaygındır [68]. Bazen, tekrarlayan demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon schwann hücrelerinde ve fibroblastlarda soğan kabuğu görünümü oluşturur. Elektron mikroskopik olarak;

intranöronal kapillerlerin bazal membranlarında kalınlaşma ve duplikasyon görülmüştür [69].

2.7. Gebelikte DM

Gebelikte diyabet; Tip 1 Diyabetes Mellitus veya Tip 2 Diyabetes Mellitus şeklinde gebelik öncesi tanı alan (%1,8); pregestasyonel (PGDM) ya da, gebelikte gelişen gestasyonel diabetes mellitus (GDM) (%7,5) olarak sınıflandırılır. Diyabeti olan gebelerde fetal ve maternal riski belirlemek için ilk sınıflandırma 1949 yılında Priscilla White tarafından geliştirilmiştir Bu sınıflama; diyabetin süresi, başlangıç yaşı ve eşlik eden komplikasyonlara göre yapılır. White sınıflaması tanı yaşının genç olması ve diyabetin uzun süreli olması durumlarında, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların artmasına ve bu komplikasyonların maternal ve fetal sonuçları etkilemesine dayanır [6, 70, 71].

Tablo 5: Gebelikte Diyabetin White Sınıflaması

Sınıf	Karakteristik özellikler	Tedavi
Gestasyonel DM	Bozulmuş glikoz tolerans testi	Diyet ve / veya insülin
A	Diyabetin başlangıç yaşı ve süre önemli değil Diyetin yeterli olduğu	Sadece Diyet
B	Başlangıç yaşı ≥ 20 ve süre < 10 yıl	Diyet-insülin
C	Başlangıç yaşı 10-19 veya süre 10-19 yıl	Diyet-insülin
D	Başlangıç yaşı < 10 ve süre ≥ 20 yıl veya background retinopati veya preeklampsi olmayan hipertansiyonu var	Diyet-insülin
R	Proliferatif retinopati veya vitreus içine kanama	Diyet-insülin
F	> 500 mg/ dl proteinüri olan nefropati	Diyet-insülin
RF	Sınıf R ve F birarada	Diyet-insülin
H	Klinik olarak mevcut aterosklerotik kalp hastalığı	Diyet-insülin
T	Renal transplantasyon sonrası	Diyet-insülin

R, F, RF, H ve T sınıflındakiler genellikle uzun süredir diyabeti olan hastalardır. Bu gruplarda; yaş, diyabetin başlangıcı veya süresi önemli değildir.

2.7.1. Gebelikte Diyabetin Patofizyolojisi

Gebelikte insülin sekresyon ve duyarlılığındaki değişikliklere bağlı olarak geç dönemde postprandial hiperglisemi ve artmış insülin yanıtı olduğu için, normal gebelikte, diyabetojenik bir durum meydana gelmektedir [72]. Bu dönemde karakteristik olarak insülin duyarlılığı azalır ve beta hücre yanıtı artar [73]. İnsülin direnci gebeliğin ilk üç ayında normaldir. İnsülin etkisindeki bozukluk, gebelik ilerlemesi ile iskelet kasları ve yağ dokusunda belirgin olur. Annede glikoz kullanımı insülin direncine bağlı olarak azalır, annenin enerji metabolizması karbohidratlardan lipidlere kayar. Böylece karbohidratların fetus tarafından kullanımı kolaylaşır. Birinci trimester ve ikinci trimesterin erken dönemlerinde yüksek östrojen ve progesteron düzeyi insülin duyarlılığı ile ilişkilidir. Ancak ikinci trimester sonu ve üçüncü trimesterin erken döneminde insülin duyarlılığı azalır [74]. Human plasental laktojen (hPL), leptin, prolaktin, ve kortizol bu durumdan sorumlu olan diğer hormonlardır. Gebelikte artan gıda alımı ve fiziksel inaktiviteye bağlı yağ dokusunda artış olması ayrıca plasental insülinazların etkisi insülin yetersizliğine sebep olan diğer faktörler arasındadır [75]. Etiyolojisi ne olursa olsun gelişen insülin direnci diyabetojenik bir eğilim ortaya koymaktadır. Gebelik tipik olarak, açlık hipoglisemisi, tokluk hiperglisemisi ve hiperinsülinemi ile karakterizedir.

Annenin pankreası artan insülin gereksinimini karşılayabilecek rezerve sahip değilse GDM gelişmektedir. GDM'li ve PGDM'li gebelerde insülin direnci normal gebelerdekine göre daha şiddetlidir.

2.7.2. Gebelikte Diyabetin Fetusa Etkileri

Gebelikte diyabet, anne ve yenidoğanda perinatal morbidite ve mortaliteyi artırır. Gebelikte yapılan düzenli izlem sayesinde günümüzde maternal hiperglisemi ve buna bağlı morbidite ve mortalite oranları oldukça azalmıştır. Buna rağmen diyabetik anne bebeğinde malformasyon görülme oranı %5-10 arasında iken diyabetik olmayan anne bebeklerinde bu oran daha düşüktür [76, 77]. Fetal etkilenme annedeki diyabetin yaygınlığı, komplikasyon derecesi ve sıkı takip edilmesi ile yakından alakalı bulunmuştur [78, 79].

Maternal hiperglisemi konsepsiyon sırasında ya da birinci trimesterde görülüyor ise majör doğum defektleri ve spontan abortuslarla karakterize diyabetik embriyopatiye

neden olur. Embriyopati PGDM’li anne bebeklerinde karşımıza çıkar. 2. ve 3. trimesterde oluşan diyabetik ortam ile; fetal hiperinsülinemi ve makrozomi ile prezente olan diyabetik fetopati denilen tablo meydana gelir [77, 80].

Genel olarak gebelikte diyabet varsa; gelişen maternal hiperglisemi fetusta da hiperglisemiye tetikler. Maternal diyabette tipik olarak postprandial hiperglisemi atakları vardır. Bu ataklara fetal hiperinsülinemi eşlik eder. Hiperinsülineminin anabolizan etkisi, aynı zamanda artmış glukozun yağ olarak depolanmasıyla da fetal makrozomi meydana gelmektedir. Glukozun yağa dönüşümü fetusta enerji tüketimine bağlı hipoksiye neden olur. Diyabette fetal hipoksinin bir diğer nedeni de, oksijen taşıma kapasitesi düşük olan anne HbA1c seviyesinin artmış olmasıdır. Fetal hipoksi atakları; hipertansiyona, kardiyak remodelling ve kardiyak hipertrofiye sebep olarak diyabetli anne bebeklerindeki kalp patolojilerinin temelini oluşturmaktadır. Hipoksi aynı zamanda eritropoetin artışı yaparak; kırmızı hücre hiperplazisi ve hematokrit artışı sonucu fetal polisitemi oluşur. Yenidoğan dönemindeki polisitemi vasküler tıkanıklığa, zayıf kan dolaşımı ve hiperbilirubinemiye sebep olur. Polisitemi aynı zamanda demir ihtiyacını artırmakta ve karşılanamayan demir, kardiyomiyopati ve nörogelişimsel defektlere yol açmaktadır [74, 77, 81, 82].

İnsülin, glukokortikoid reseptörlerini bloke ederek veya fosfolipid sentezinde rol oynayan enzimleri inhibe ederek kortizolün sürfaktan sentezi üzerine olan etkisini antagonize etmektedir. Sürfaktan sentezinin azalması da akciğer matürasyonunu engellemektedir. PGDM’si olup vasküler komplikasyon gelişmiş anne bebeklerinde ise durum tersine dönmektedir. Bu bebeklerde uzun süreli hipoksiye bağlı olarak sürfaktan yapımı artarak akciğer matürasyonu hızlanmaktadır [83].

Aşkar diyabeti olan kadınlarda ölü doğumların artması plasental yetmezliğe bağlanmıştır. Ölü doğumlar ileri derecede diyabetik ve vasküler komplikasyonu olan kadınlarda ve genellikle ciddi preeklampsi ile birlikte görülmektedir [84].

2.7.3. Diyabetik Anne Bebeği

Diyabetli anne bebekleri genellikle iri yuvarlak yüzlü ve pletorik görünümündür. Kulaklarda kıllanma sık görülür. Kemik yaşı gebelik yaşına göre normal veya daha küçüktür. Özellikle karaciğer, kalp ve sürrenallerde organ büyümesi daha belirgindir. Vücutları iri olmasına rağmen baş çevreleri normal büyüklüktedir. Bebekler iri oldukları

için klavikula kırığı ve buna bağlı olarak brakial pleksus ve frenik sinir zedelenmesi, sefal hematoma ve intrakranial kanama gibi doğum travmaları normal bebeklerden daha fazla görülür [83].

Doğumdan önce gelişmeye başlayan pankreasın beta hücre hiperplazisi ve fetal hiperinsülinemi, doğum sonu bebekte devam etmekte bu durum yeni doğan diyabetik anne bebeğinde hipoglisemi ataklarına sebep olmaktadır. Görülme sıklığı, maternal diyabet süresi ve şiddetine, glukoz kontrolüne, kordon kanında glukoz, insülin, C-peptid ve HbA1c düzeyine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Neonatal hipoglisemide doğum sırasındaki maternal kan glukoz düzeyi de etkili olmaktadır [83].

İnsülin, fosfolipid sentezinde rol oynayan enzimleri ve glukokortikoid reseptörlerini bloke ederek kortizolün sürfaktan sentezine olan katkısını önler. Sürfaktanın azalmasına bağlı olarak, yeni doğanın geçici takipnesinden respiratuvar distress sendromuna kadar değişen klinik tablolarda solunum sıkıntıları görülebilir [83, 85, 86].

Miyokardda yağ ve glikojen depolanmasından çok miyofibril hacmi artmıştır. Simetrik septal hipertrofi, ventrikül duvar kalınlaşması ve ventrikül çıkım darlığı, kardiyomegali (hipertrofik kardiyomiyopati), konjestif kalp yetmezliği gibi patolojilere sebep olabilir. Kalpteki hipertrofik değişiklikler 2-12 ay içerisinde düzelme gösterir. Kalp tutulumunun derecesi maternal diyabet kontrolü ve fetal neonatal hiperinsülinizme bağlıdır. Yine kalp anomalilerinden; atrial septal defekt, ventriküler septal defekt, büyük damarların transpozisyonu, aort koarktasyonu da diyabetli anne bebeklerinde sık görülen konjenital anomaliler arasındadır. Kardiyak anomalilerin yanı sıra, anorektal atrezi, küçük sol kolon, duodenal atrezi, anensefali, holoprosensefali, meningomyelosel, renal agenezi, kistik böbrek, ureteral duplikasyon, kaudal regresyon, femoral hipoplazi, vertebral füzyon gibi pek çok anomaliye diyabetik anne bebeklerinde sık rastlanmaktadır [83, 87, 88].

Diyabetik gebelerde oluşan plasental yetmezlik ve glikozile hemoglobinlerin oksijen taşıma kapasitelerinin azalması nedeniyle oluşan hipoksi fetal eritropoietini artırır. Ekstramedüller hematopoiezis artar. Artan eritropoietin polistemi ve hipervizkoziteye sebep olur. Bu etki doğum sonrasında da devam eder. Hipervizkozitenin etkisiyle damarlarda mikrotrombüs olmakta ve renal ven trombozu gibi hastalıklar normal yenidoğandan daha sık görülmektedir. Bu bebeklerde artan

doğum travması sonucu oluşan hematomlar ve polisitemi nedeniyle indirekt hiperbilirubinemiye de sık rastlanır [89].

Vasküler komplikasyon geliştirmiş diabetli annelerde plasental yetmezliğin oranı daha ciddi boyutlarda olduğu için bu durum fetus üzerinde farklı etkiler göstermektedir. Öncelikle fazla besin alamayan fetus gestasyon yaşına göre küçük kalmaktadır. Düşük doğum ağırlığı da bu bebeklerde sık görülmektedir Vaskülopatinin yaygınlığı arttıkça, fetal büyüme oranı azalmış olarak görülmektedir. Uzun süreli ve yüksek oranda maruz kalınan hipoksiye bağlı olarak süraktan sentezi artarak akciğer matürasyonu hızlanmakta, yeni doğan bebekte solunum sıkıntıları vasküler komplikasyon geliştirmeyen anne bebeklerine göre daha nadir görülmektedir Konjenital anomali görülme sıklığı vasküler komplikasyon geliştirmiş anne bebeklerinde artmıştır [79, 83, 90].

Vasküler komplikasyon geliştiren ya da geliştirmesin diyabetik anne bebeklerinde prematürite ve yenidoğan yoğun bakım ünitesine yatış sıklığı da artmıştır [83, 88].

2.7.4. Diyabetin Göbek Kordonu ve Buradaki Mezenkimal Kök Hücreleri Üzerine Etkileri

Pek çok dokuda olduğu gibi göbek kordonu dokusu da diyabetten etkilenmektedir. Göbek kordonunun diyabetten etkilenmesi diğer dokular gibi annenin diyabetinin süresi, bu süre zarfında sıkı takip ve tedavi edilip edilmemesi ve vasküler komplikasyon derecesiyle yakından ilişkilidir. Genel olarak diyabetli anne bebeklerinin göbek kordon çapları makrozomik fetüslerde daha büyük, WJ miktarı da artmış olarak görülmüştür [91]. Gebelikte yapılan ultrasound muayenesinde göbek kordonu çaplarına bakılarak diyabetli anne bebeğinin makrozomik olup olmayacağı belirlenebilir denilmiştir [92]. GK damarlarının toplam alanı diyabetli gebelerde azalmış, endotelde erozyonlar, venlerde dilatasyon ve damar duvarlarında aterosklerotik değişiklikler tespit edilmiştir [93]. Diyabetli gebelerde oluşan hipoksi GK kök hücreleri üzerinde de olumsuz etkiler meydana getirmiştir. Kültürde yapılan çalışmalarda; Mezenkimal kök hücrelerinin proliferasyon kapasitesi azalmış, popülasyonda ikiye katlanma zamanları artmış, hücre canlılığı azalmış, hücre ölümü artmış olarak bulunmuştur [10]. Yine bu hücrelerin, normal GK MKH'lerine göre prematür yaşlanmaya girdiği, mitokondri disfonksiyonu geliştirdiği, diferansiasyon kapasitelerinin azaldığı gösterilmiştir [11].

GK ve buradaki MKH'ler üzerinde yapılan literatür taramasında; diyabetli gebelerin sadece pregestayonel-gestasyonel diyabetli olarak sınıflandırıldığı; White sınıflandırmasında belirtilmiş olan vasküler komplikasyon ayırımının göz ardı edildiği dikkat çekicidir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız için Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurulunun 24.07.2017 tarihli ve 2017/268 no'lu kararıyla izin alınmıştır (Ek: 1).

3.1. İnsan Göbek Kordonu Temini ve Laboratuvara Transferi

Çalışmamızda kullanılan göbek kordonları, Gaziantep Cengiz Gökçek Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi'nde doğum yapan, gebeliğinden önce diyabet hastalığı olan ve vasküler komplikasyon olarak nefropatisi tespit edilen 7 gebe, gestasyonel diyabeti olan 7 gebe ve herhangi bir hastalığı bulunmayan 7 gebe olmak üzere toplam 21 kişiden alınmıştır. Çalışmamız için güç analizi yapılmıştır ve buna göre 2 grup arasında 0,70 lik farkın (%10-%80) istatistiksel olarak anlamlı bulunması için gerekli minimum örnek genişliği her grupta 7 kişi olarak belirlenmiştir (($\alpha=0,05$), Testin gücü=($1-\beta=0,80$))

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

Anne adayının bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu okuyup onaylamasını takiben doğum sonrası göbek kordonu plasentaya en yakın yerinden 10 cm olacak şekilde kesilerek gentamisin (Genta ® 80 mg Ampul, İE) eklenen steril Leibovitz L15 (gibco®, LOT: 1922999) solusyonuna ve 2 cm'lik parçası da formaldehite alındı (Resim 6). Alınan dokularla birlikte göbek kordonunun bebekte kalan kısmı ile plasental kısmının toplamının boyu ve ağırlığı hesaplandı. Plasenta ağırlığı tartıldı, bebek kilosu, boyu ölçülerek kayıt edildi. Daha sonra alınan göbek kordonu parçaları Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İleri Düzey Eğitim ve Araştırma Laboratuvarı (İDEAL)'na getirilerek ön işlem aşamalarına geçildi.



Resim 6: GK'nun plasentadan ayrılması

3.1.1. Göbek Kordonundan WJ- MKH İzolasyonu

Laboratuvarda petri kabına alınan göbek kordonu etrafını saran amnion zarından ayrıldıktan sonra, 2 arter ve 1 adet ven damarları çıkarıldı. Elde edilen WJ makas yardımıyla küçük parçalara bölündü (Resim 7, Resim 8). 3 kez PBS (fosfat tamponlu tuzlu su) ile yıkanan WJ parçaları falkona alınarak 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra kalan WJ tartıldı. 3 g WJ falkona alındı üzerine doku hacminin 3 katı olacak şekilde %0,1 Kollajenaz tip B (Collegenaz-B 100 mg, Sigma) ilave edilerek 37 °C'de çalkalamalı sıcak su banyosunda 3 sa. sindirime bırakıldı. Daha sonra son konsantrasyon %2,5 olacak şekilde tripsin (Trypsin from bovine pancreas 50 mg, Sigma) eklenerek 30 dk. 37°C çalkalamalı su banyosunda ileri sindirime işlemi yapıldı. Sindirim işleminden sonra oluşan sıvı jelatinöz yapı 70 µm'lik hücre süzgecinden süzüldü (Resim 9). Sonra 4000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra kalan pellet 700 µl PBS ile sulandırılarak flow-sitometri cihazında WJ-MKH sayımı için hazır hale getirildi.



Resim 7: Gk'nun amnion zarından ayrılması



Resim 8: Gk'dan ven ve arterlerin çıkarılarak kalan dokudan WJ ayırma işlemi



Resim 9: Enzimatik olarak sindirilmiş WJ'nin hücre süzgecinden geçirilmesi

3.1.2. WJ-MKH Sayılarının Belirlenmesi

WJ-MKH'lerini akım sitometri cihazında saymak için BD Stemflow™ Human MSC Analysis Kit'i kullanıldı. Antikor kitinde CD90, CD44, CD105, CD73, (+) izotip kontrol, (+) ve (-) kontrol kokteyli olmak üzere 6 antikor grubu solüsyonu mevcut olup bu antikorlar sırası ile ependorflara -kitin protokolüne uygun miktarda-; ilk dört antikordan 5'er µl, karışım antikorlarından 20'şer µl ilave edildi. Daha sonra hazırlanan WJ-MKH süspansiyonundan 100'er µl ependorflara eklenerek 30 dk inkübasyona bırakıldı. Sonrasında üzerlerine 500'er µl PBS eklenerek ilk yıkaması yapılarak 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantı atılıp 500'er µl daha PBS eklenerek ikinci yıkaması yapıldı, tekrar 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp kalan pellete 300'er µl PBS eklenerek akım sitometri cihazında okutularak eklenen antikor ile reaksiyon veren hücre sayıları belirlendi. Flow-sitometri cihazı olarak BD Accuri®C6 akım sitometri cihazı kullanıldı. Analizler BD Accuri C6 yazılım programıyla yapıldı (Resim 10).



Resim 10: Flow sitometri cihazı ve ölçümlerin yapıldığı bilgisayar sistemi

3.1.3. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması

Işık mikroskobu çalışmalarının yapılacağı zamana kadar göbek kordon dokuları %10'luk formaldehit çözeltisi içinde fikse edildi. Fikse olup sertleşen göbek kordon dokularından enine olacak şekilde yaklaşık 0,5 cm'lik parçalar alınarak kasetlere koyulduktan sonra kodlandı. Doku takip işlemleri Leica TP 1010 doku takip cihazı kullanarak gerçekleştirildi (Tablo 6). Cihazdan alınan dokular parafin bloklara gömüldü.

Tablo 6: Doku takibi cihazının protokolü

İŞLEM VE KİMYASAL	SÜRESİ
Akar su	1 gece
%60'lık Alkol	1 sa
%70'lik Alkol	1 sa
%80'lik Alkol	1 sa
%96'lık Alkol	1 sa
%100'lük Alkol	1 sa
Ksilen I	1 sa
Ksilen II	1 sa
Parafin I	1 sa
Parafin II	1 sa
Gömme	

3.1.4. Kesitlerin Alınması ve Boyanmaları

Leica RM 2245 mikrotomunda parafin bloklardan 4-5µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler 1 gece etüvde bekletildikten sonra Hematoksilen-Eozin / H-E (Tablo 7), Masson's Trikrom / TRI (Tablo 8 - Tablo 9) ve PAS (Tablo 10) boyama yöntemleri uygulandı.

Tablo 7: Hematoksilen - Eosin (H-E) Boyama Protokolü

İŞLEM VE KİMYASAL	SÜRESİ
Ksilen	30 dk - 1 sa.
Azalan alkol serileri (%100, %90, %80, %70)	5'er dk.
Distile su	3 dk.
Hematoksilen	20 dk.
Akar çeşme suyu	15 dk.
Asit - Alkol	1-2 kere batır çıkar
Çeşme suyu	Çalkala
Akar çeşme suyu	15 dk.
Distile su	2 dk.
Eozin	7 sn.
Distile su	Çalkala
Artan alkol serileri (%90, %96, %100)	2'şer dk.
Ksilen	1 sa.
Kapatma	

Tablo 8: Masson's Trikrom (TRI) Boya Solüsyonu

A Solüsyonu	Asit Fuksin: 0,5 g Xylidine Ponceau: 0,5 g Distile Su: 99 ml Glasiyal Asetik Asit: 1 ml
B Solüsyonu	Fosfomolibdik Asit: 1 g Distile Su: 100 ml
C Solüsyonu	Light Green SF Yellowish: 400 mg Distile Su: 100 ml Glasiyal Asetik Asit: 0,2 ml
D1 - D2 Solüsyonlar	Asetik Asit: 1 ml Distile Su: 99 ml

Tablo 9: Masson's Trikrom (TRI) Boyama Protokolü

İŞLEM VE KİMYASAL	SÜRESİ
Etüv	1 gece
Ksilen	1 sa.
Azalan alkol serileri (%100, %90, %70, %50)	3'er dk.
Distile su	Çalkala
Boin'de 56 °C'de	1 sa.
Musluk suyu	Sarı rengi gidene kadar yıka
Distile su	Çalkala
Demirli Hematoksilen	1 - 2 sa.
Akar çeşme suyu	20 dk.
%1 hidroklorik asit + %70 etanol	Batır çıkar
Akar çeşme suyu	20 dk
Distile su	Batır çıkar
A Solüsyonu	5 - 10 dk
Distile su	Batır çıkar
B Solüsyonu	5 - 15 dk.
D1 Solüsyonu	Birkaç kere çalkala
C Solüsyonu	5 - 10 dk.
D2 Solüsyonu	1 dk çalkala
Distile su	Birkaç kere çalkala
Alkol serileri (%50, %70)	2'şer dk
Alkol serileri (%90, %96)	1'er dk
Ksilen	1 sa.
Kapatma	

Tablo 10: PAS Boyama Protokolü

İŞLEM VE KİMYASAL	SÜRESİ
Etüv	1 gece
Ksilen I-II	30'ar dk.
Azalan alkol serileri (%95, %80, %70)	2'şer dk.
Distile su	5 dk.
Periyodik asit solüsyonu	5 dk.
Distile su	çalkalama
Schiff reaktifi	15 dk.
Akar su	10 dk.
Hematoksilen	6 dk.
Akar su	10 dk.
Asit alkol batır çıkar	1-3 sn.
Akar su	10 dk.
%80 alkol	1 dk.
%95 alkol	1 dk.
Ksilen	1 sa.
Kapama	

3.1.5. Göbek Kordonu Dokusunun İmmünohistokimyasal İncelenmesi

Göbek kordonu dokusunda Wharton Jölesi MKH'lerini tespit etmek için özel bir antikor bulunmamaktadır. Wharton Jölesi MKH'lerini tespit etmek için bağ doku MKH'leri için pozitif reaksiyon verdiği bilinen; CD90, CD105, CD73 ve negatif reaksiyon veren CD34, CD45 antikorlar kullanılmıştır.

Bloklanmış dokulardan Leica RM 2245 (Almanya) mikrotomunda 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak pozitif şarjlı lamlara yerleştirildi ve bir gece 60 °C etüvde bekletildi. Lamlar 2x5 dk. ksilende bekletildikten sonra azalan alkol serilerinden (%100, %90, %80, %70) 5'er dk. geçirildi. Distile suda 5 dk. bekletildikten sonra, PBS ile 1x5 dk. yıkama yapıldı. Bu aşamada antijen kurtarma basamağı için CD90, CD105, CD73, CD34, CD45 uygulanacak olan lamlar %10 sitratlı tampon çözeltisi ile 700 watta 7 dk. ve 400 watta 7 dk. olmak üzere 2 defa mikrodalga fırında kaynatıldı. Tüm

lamalar aynı solüsyonlar içerisinde 15 dk. soğutuldu daha sonra 3x2 dk. PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası dokular Pap Pen ile çerçevelendi. Sonra %3 H₂O₂'de (Hidrojen Peroksit) 20 dk. bekletildi. Ardından tekrar 3x2 dk. PBS ile yıkandı. 20 dk. UV blokta bırakıldığı esnada primer antikorlar **CD90** (Anti-CD90/Thy1 antibody [EPR3132] ab92574): 1/250; **CD105** (Anti-CD105 antibody [EPR10145-12] ab169545): 1/900; **CD73** (Anti-CD73 antibody [7G2] ab54217): 1/200; **CD34** (Anti-CD34 antibody [EPR373Y] ab81289): 1/3000 ve **CD45** (Anti-CD45 antibody ab10558): 1ml/μg olacak şekilde sulandırıldı. Yirmi dk. dolunca hazırlanan antikorlar dokulara uygulandı ve +4 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ardından 3x2 dk. PBS ile yıkandı ve 20 dk. biyotinlenmiş sekonder antikor uygulandı, sonrasında yine 3x2 dk. PBS ile yıkandı ve 15 dk. 100 μl streptavidine maruz bırakıldı. Yıkama sonrası (3x2 dk. PBS) lamlardaki dokular 5-10 dk 100 μl DAB kromojen (kahverengi renk görülene kadar) ile boyandı. Daha sonra lamalar musluk suyunda yıkandı ve 3 dk. Mayers Hematoksilen ile boyandı. Ardından lamalar tekrar musluk suyu ile yıkanarak artan alkol serilerinden geçirildi. Son aşama olarak ksilende 30 dk. kalan preparatlara kapama işlemi yapıldı.

3.1.6. Göbek Kordonu Çapı ve Damar Duvar Kalınlıklarının Ölçülmesi

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

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

3.2. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada sayısal değişkenlerin normallik dağılımı ShaphiroWilk testi ile test edilmiştir. Normal dağılan sayısal değişkenlerin üç grupta karşılaştırılması ANOVA ve LSD testleri ile, normal dağılmayan değişkenlerin üç grupta karşılaştırılması Kruskal Wallis testi ile test edilmiştir. Sayısal değişkenler için tanıtıcı istatistikler ortalama ve standart sapma ile verilmiştir. Analizlerde SPSS 22.0 Windows versiyonu kullanılmıştır. P<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Veriler

Çalışmamızda gebelerin ve bebeklerin demografik verileri karşılaştırmalarında, her grupta gebelerin ortalama yaşı ve gebelikte aldığı kilo açısından gruplar arası anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 12) ($p=0,175$, $p=0,386$). Bebeklerin doğum ağırlığı, GK ağırlığı ve uzunluğu, plasenta ağırlıkları bakımından gruplar arası anlamlı farklılık bulunmamıştır (Tablo 12) ($p=0,621$, $p=0,113$, $p=0,608$).

Tablo 11: Çalışma hastalarının demografik özellikleri

	GDM	VK-PGDM	K
Yaş	33	34,7	29,8
Hb	11,57	12,54	11,64
HbA1C	5,4	6,8	5,1
Gebelikte kilo artışı	11,7	7,7	10,1
Bebek Doğum Ağırlığı	3351	3184	3281
GK Ağırlığı	61	56,8	43,2
GK Uzunluğu	62,7	57,2	49,8
Plasenta Ağırlığı	657,8	619,2	604,2
Doğum Haftası	37,8	37	38,4

GDM Grubu; Gestasyonel diyabetli annelerden doğan bebeklerinin GK çapları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış tespit edilmiş, fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,191$). GK çaplarının VK-PGDM ile karşılaştırılmasında ise anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p=0,008$). GDM'li gebelerin AKŞ, HbA1c'lerinin karşılaştırılmasında ise kontrol grubu ile bir farklılık bulunmazken ($p=0,707$, $p=0,483$), VK-PGDM ile karşılaştırılmasında ise anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (Tablo 13, Tablo 14) ($p=0,002$, $p=0,001$).

VK-PGDM Grubu; Pregestasyonel Diyabeti olup vasküler komplikasyon geliştirmiş gebelerin AKŞ ve HbA1c'leri kontrol ve GDM grubu ile karşılaştırınca anlamlı olarak farklılık tespit edilmiştir ($p=0,001$, $p=0,002$). Bu annelerin bebeklerinin GK çaplarında ise; kontrol grubu ile fark bulunmazken, GDM'li grup ile anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (Tablo 13, Tablo 14) ($p=0,191$, $p=0,008$).

Tablo 12: Demografik verilerin gruplar arası karşılaştırması

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

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

Tablo 13: AKŞ, HbA1c ve GK çapları açısından gruplar arası karşılaştırma

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

*p<0,05

4.2. Işık Mikroskobu Bulguları

Çalışmamızda Kontrol, GDM ve VK-PGDM gruplarını oluşturan göbek kordonlarına ışık mikroskopik görünümelerini değerlendirmek için H-E, TRI ve PAS boyama yöntemleri kullanıldı.

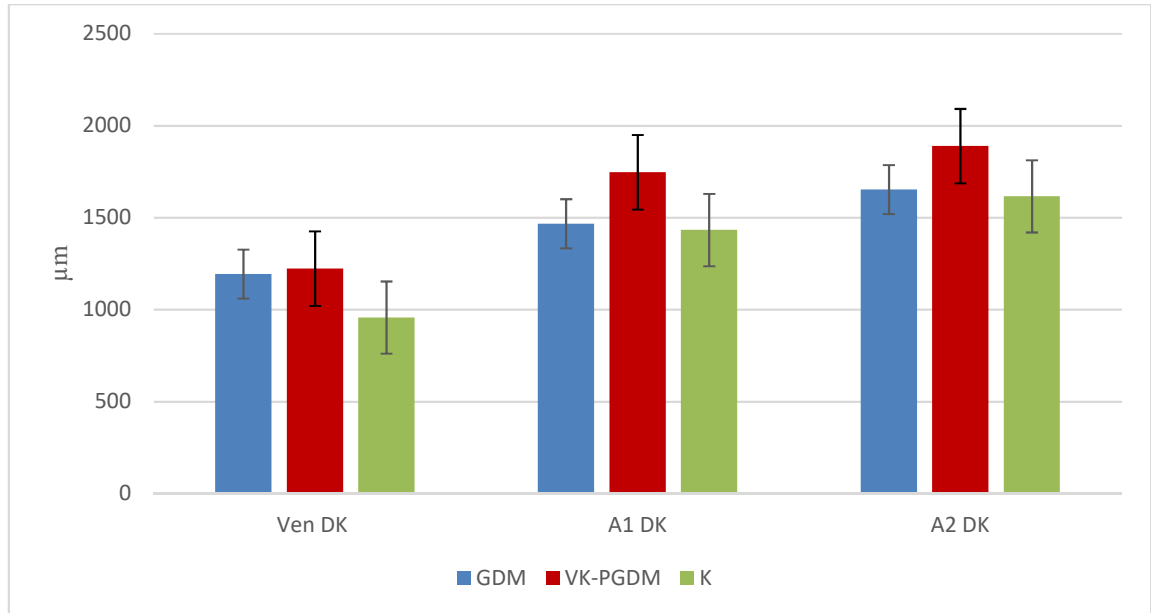
Kontrol Grubu; Amnion zarı, WJ, ven ve arterler normal histolojik yapıda izlendi. GK çapı ($1,18 \pm 0,06$) cm, ven duvar kalınlığı (Ven DK) ($957,34 \pm 237,46$) μm , birinci arterin duvar kalınlığı (A1 DK) ($1433,37 \pm 208,07$) μm , ikinci arterin duvar kalınlığı (A2 DK) ($1616,33 \pm 250,56$) μm , ven çapı ($0,32 \pm 0,08$) mm, A1 çapı ($0,22 \pm 0,06$) mm, A2 Çap ($0,26 \pm 0,05$) mm değerlerinde bulundu (Şekil 1, Tablo 15 - 16, Resim 11 - 13).

GDM Grubu; Gestasyonel diyabeti olan annelerden doğan bebeklerin göbek kordonlarının incelenmesinde; amnion zarı, damarların endoteli normal histolojik

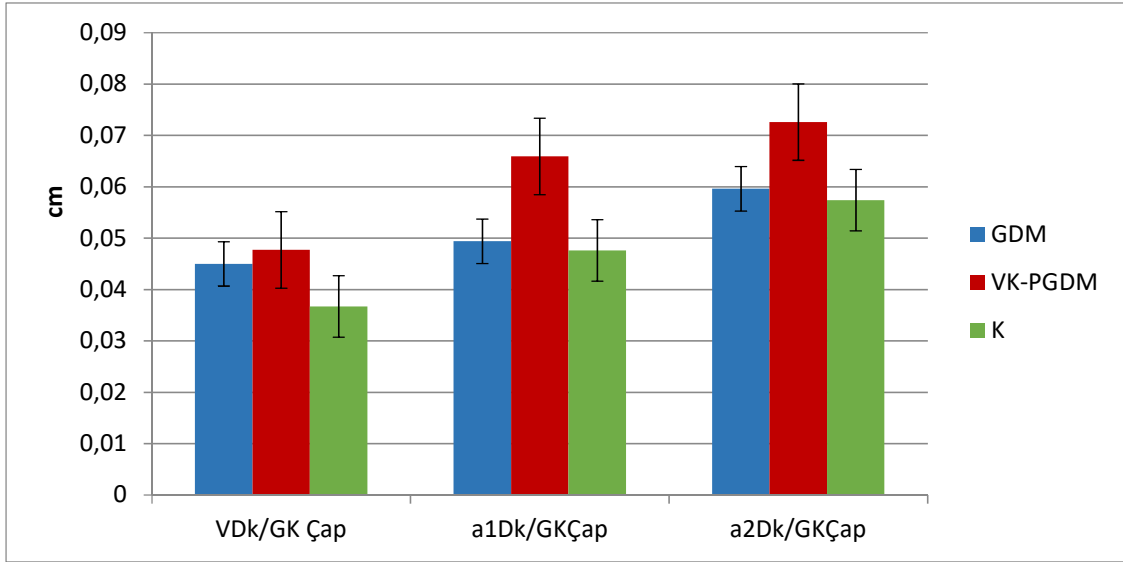
yapıda izlendi. WJ porları arasında mesafe artışı ve ödem tespit edildi. GK çapında artma ($p=0,027$), A1 çapında artma ($p=0,044$) istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Diğer duvar kalınlıklarında da sayısal olarak artma tespit edilirken, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,117$, $p=0,053$, $p=0,143$). Duvar kalınlıklarının GK çapına oranlarında da istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı ($p=0,090$, $p=0,715$, $p=0,704$), (Şekil 1, Şekil 2, Tablo 15 - 16, Resim 14 - 17).

VK-PGDM Grubu; Diyabeti olup vasküler komplikasyonu bulunan gebelerin bebeklerinin göbek kordonlarının incelenmesinde; amnion zarı ve damarların endoteli normal histolojik yapıda izlendi. GK çapında diğer gruplara göre azalma olduğu görülmüş, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,123$). A1 çapında artma ($p=0,027$) bulunmuş, diğer duvar kalınlıklarında istatistiksel olarak fark saptanmadı ($p=0,090$, $p=0,715$, $p=0,704$). Duvar kalınlıklarının GK çapına oranlarında ise; A1 DK / GK Çap oranında artma ($p=0,002$), A2DK / GK Çap oranında artma ($p=0,002$) saptanırken Ven DK / GK Çap oranında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,09$), (Şekil 1 - 2, Tablo - 16, Resim 18 - 23). TRI ve H-E boyamalarda damar duvarlarının kalınlaştığı görsel olarak da desteklendi (Resim 20, 22)

Tüm grupların PAS ile boyanmasında glikojen depolanmasına yönelik bulguya rastlanmadı (Resim 24 - 26).



Şekil 1: Damar duvar kalınlıklarının gruplar arası karşılaştırılması



Şekil 2: Damar duvar kalınlıklarının GK Çapına oranlarının gruplar arası karşılaştırılması

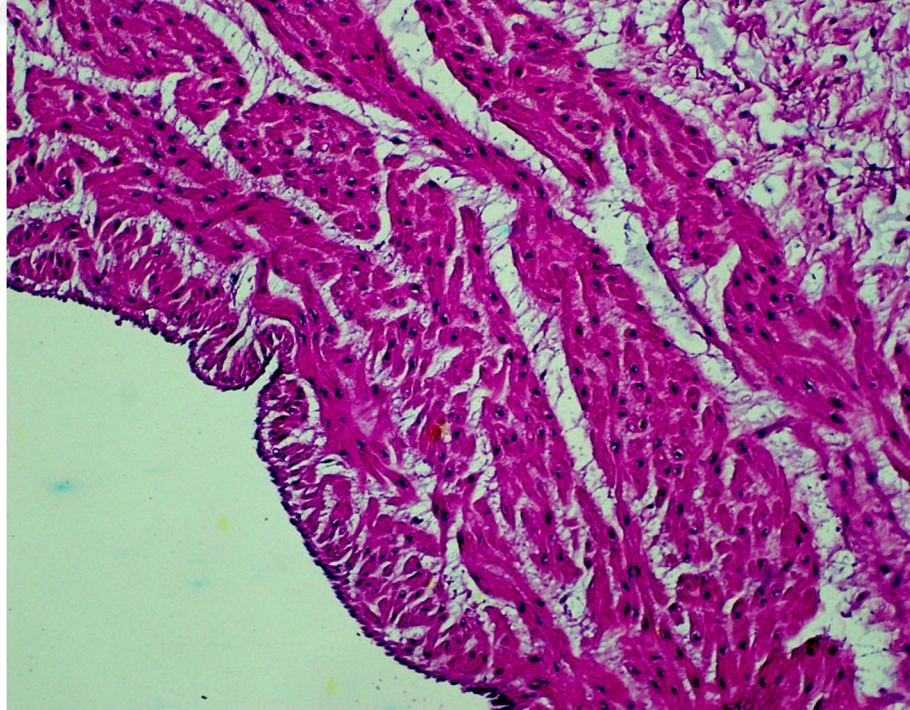
Tablo 14: Damar duvar kalınlıkları gruplar arası sayısal verileri

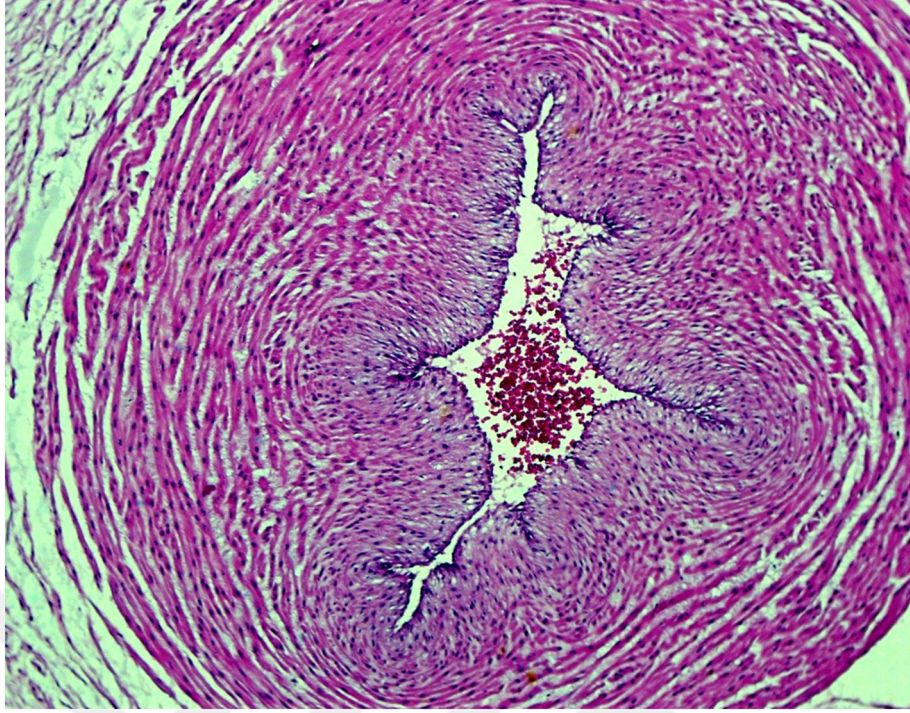
		N	Ortalama ± Std.Sapma	P
Ven DK	GDM	7	1193,59 ± 198,77	0,117
	VK-PGDM	7	1223,01 ± 296,67	
	K	7	957,34 ± 237,46	
	Total	21	1124,65 ± 264,61	
A1 DK	GDM	7	1467,17 ± 287,83	0,053
	VK-PGDM	7	1746,66 ± 228,51	
	K	7	1433,37 ± 208,07	
	Total	21	1549,06 ± 272,40	
A2 DK	GDM	7	1653,26 ± 238,62	0,143
	VK-PGDM	7	1888,86 ± 302,15	
	K	7	1616,33 ± 250,56	
	Total	21	1719,48 ± 280,36	

Tablo 15: Damar çaplarının gruplar arası sayısal verileri

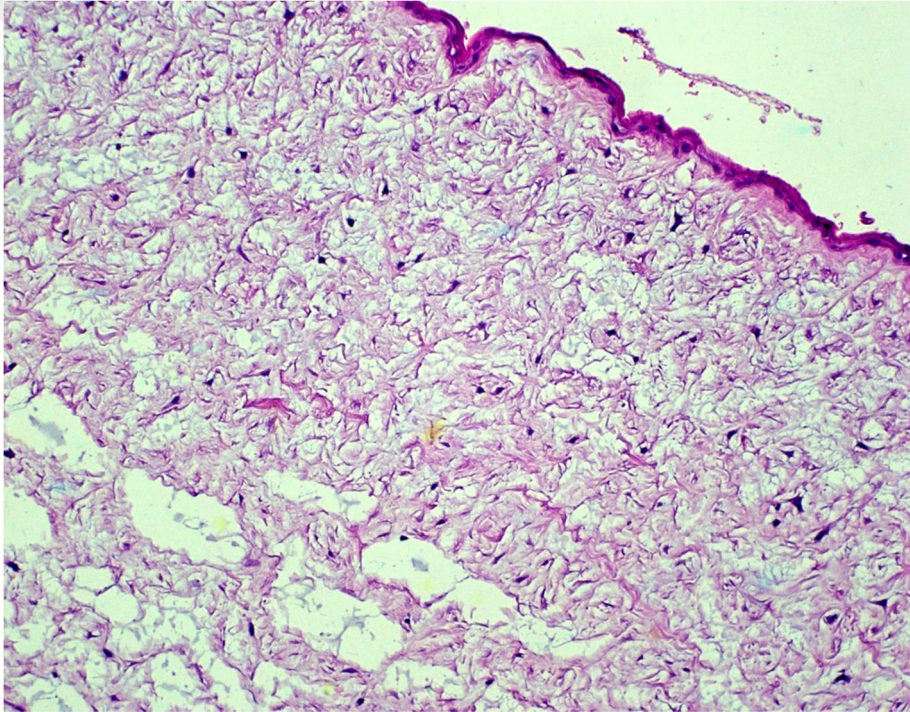
		N	Ortalama $\pm$ Std.Sapma	P
V ap/mm*	GDM	7	0,281 $\pm$ 0,03	0,277
	VK-PGDM	7	0,277 $\pm$ 0,04	
	K	7	0,324 $\pm$ 0,08	
	Total	21	0,294 $\pm$ 0,05	
A1 ap/mm*	GDM	7	0,160 $\pm$ 0,04	0,044**
	VK-PGDM	7	0,157 $\pm$ 0,05	
	K	7	0,225 $\pm$ 0,06	
	Total	21	0,181 $\pm$ 0,05	
A2 ap/mm*	GDM	7	0,227 $\pm$ 0,04	0,129
	VK-PGDM	7	0,207 $\pm$ 0,06	
	K	7	0,268 $\pm$ 0,05	
	Total	21	0,234 $\pm$ 0,05	

*ANOVA testi, **p<0,05,

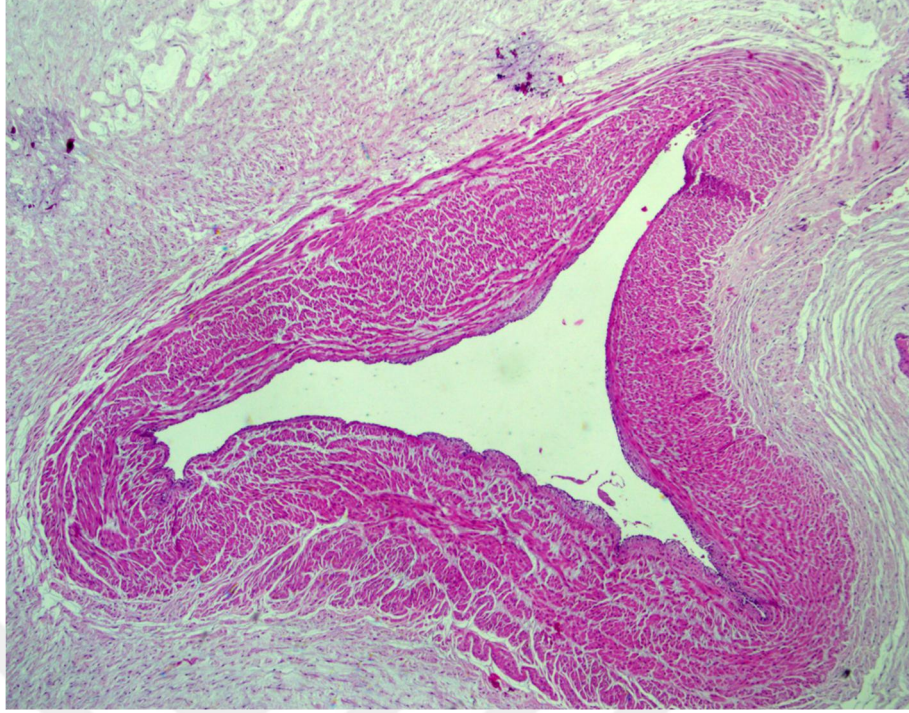
**Resim 11:** Kontrol grubu ven duvarı ve endotel ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 20×)



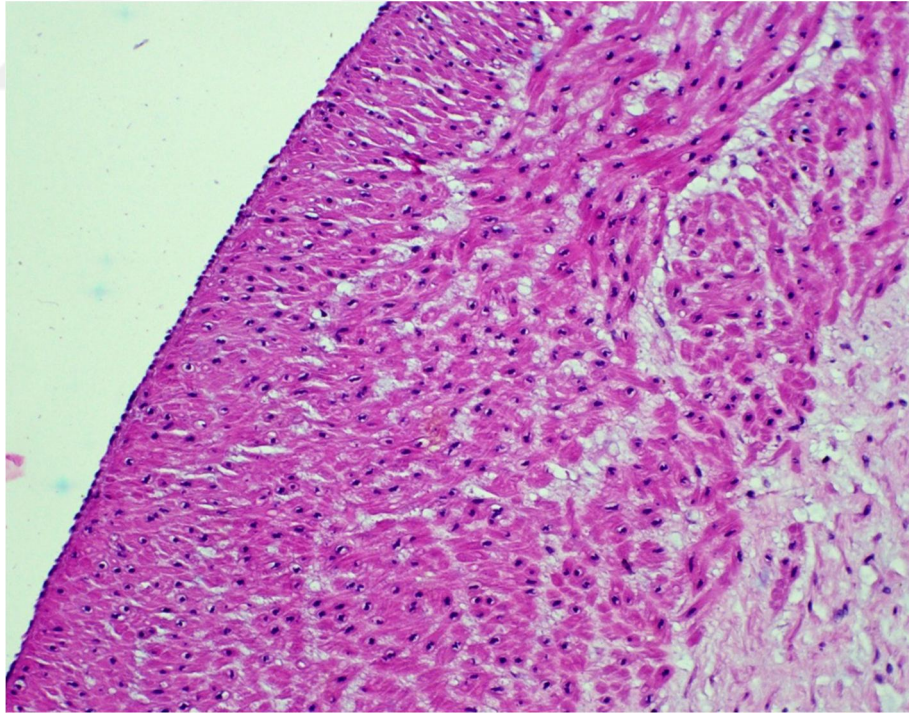
Resim 12: Kontrol grubu arter ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 20×)



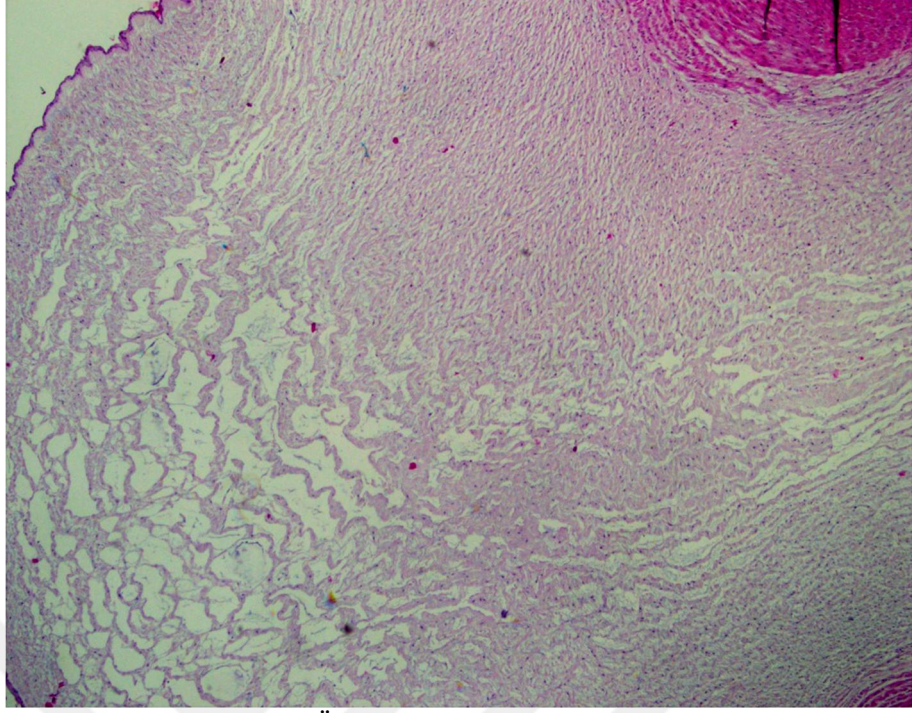
Resim 13: Kontrol grubu WJ, amnion zarı ve WJ porları ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 20×)



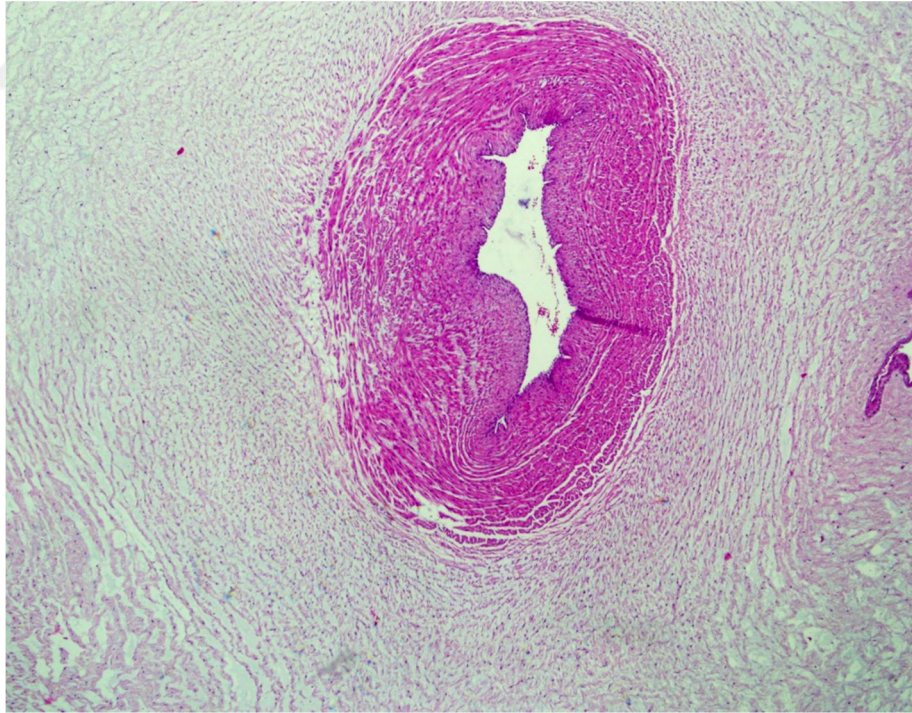
Resim 14: GDM grubu genişlemiş umblikal ven ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 4×)



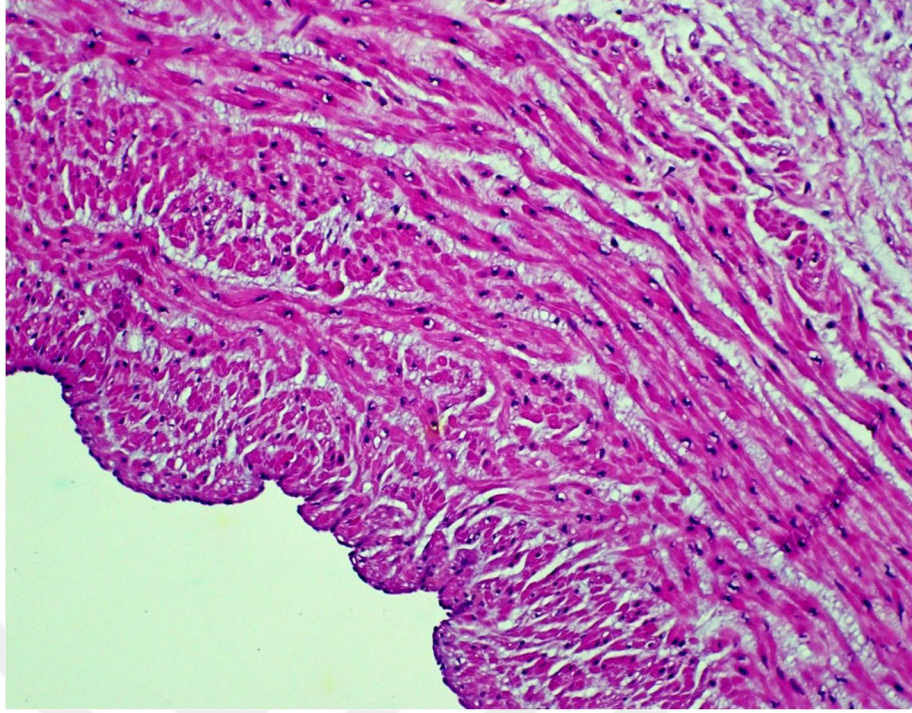
Resim 15: GDM grubu ven duvarı ve endoteli ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 20×)



Resim 16: GDM grubu WJ, Ödemli porlar ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 4×)



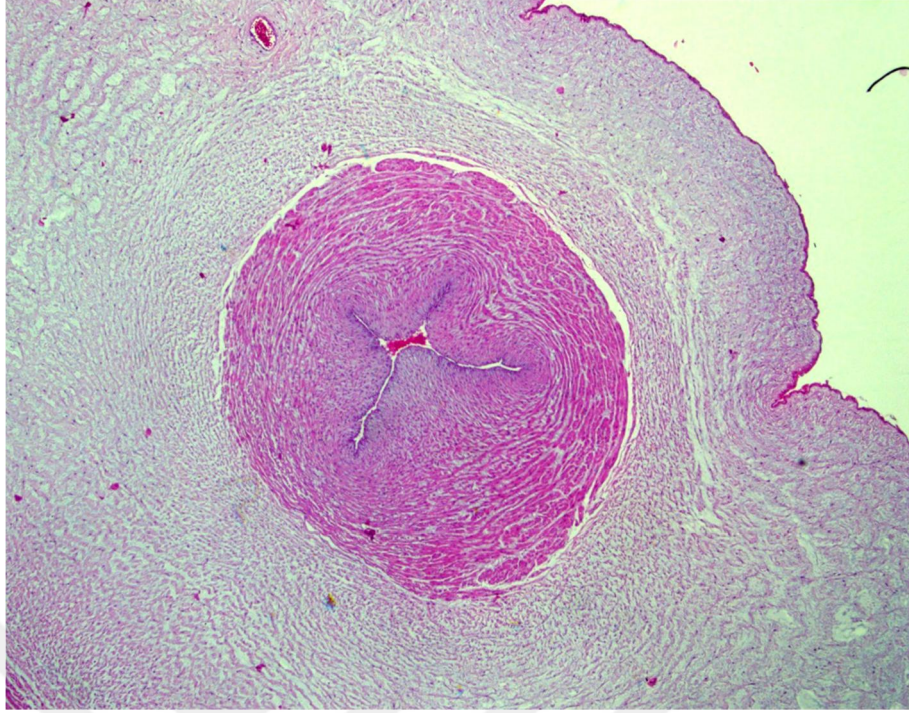
Resim 17: GDM grubu arteri ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 4×)



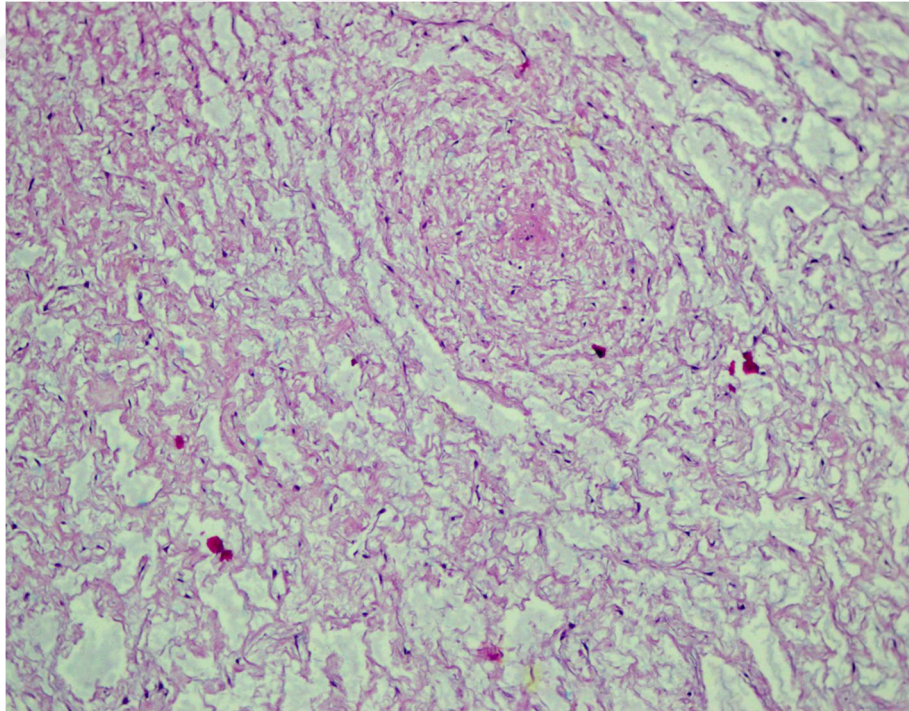
Resim 18: VK-PGDM grubu ven duvarı ve endoteli ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 20×)



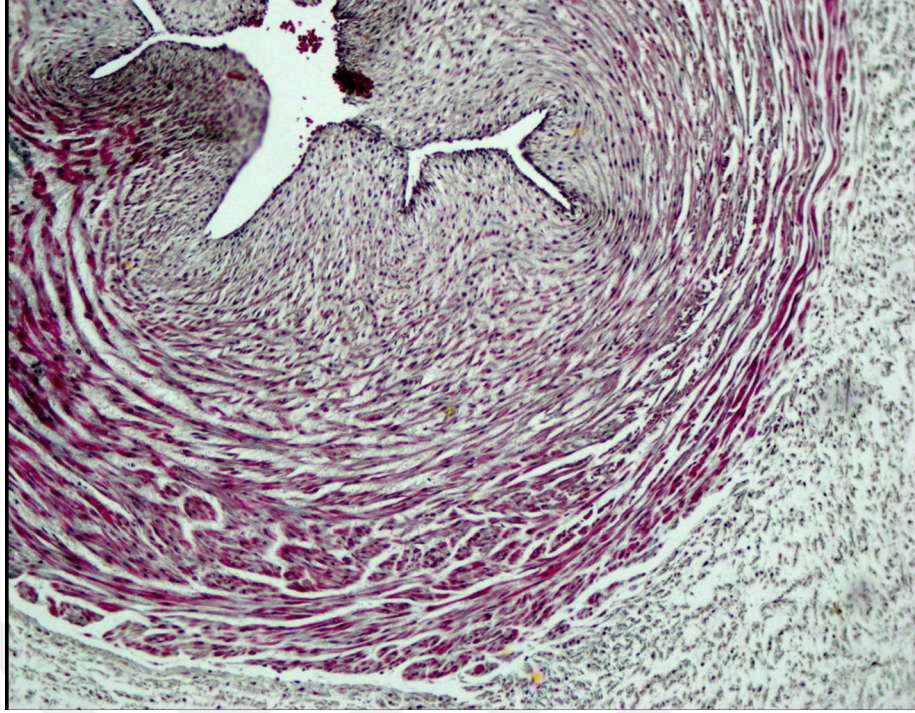
Resim 19: VK-PGDM grubu ven ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 4×)



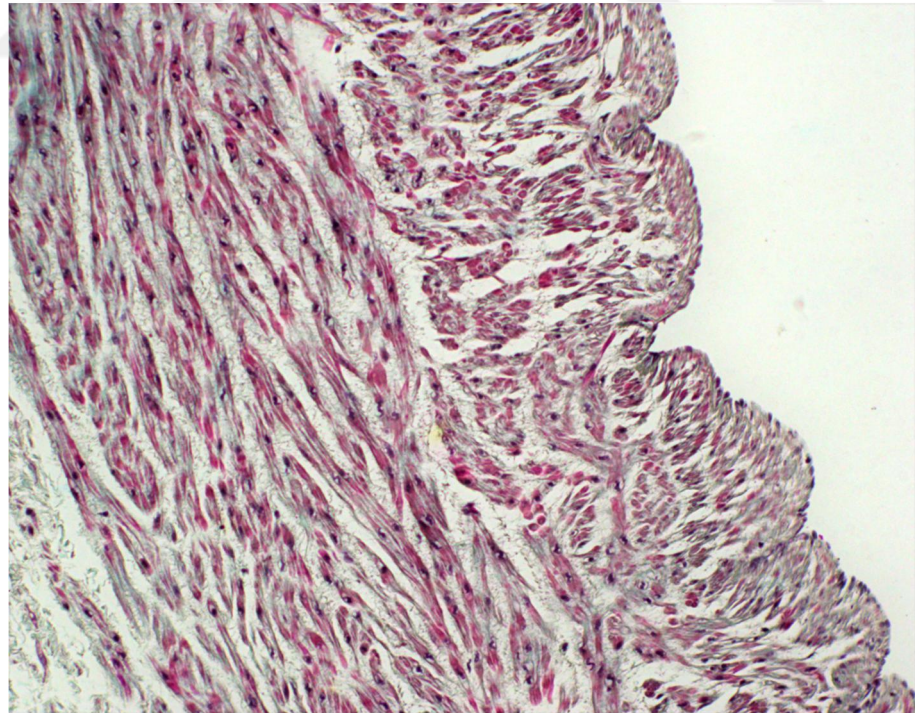
Resim 20: VK-PGDM grubu arter ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 4×)



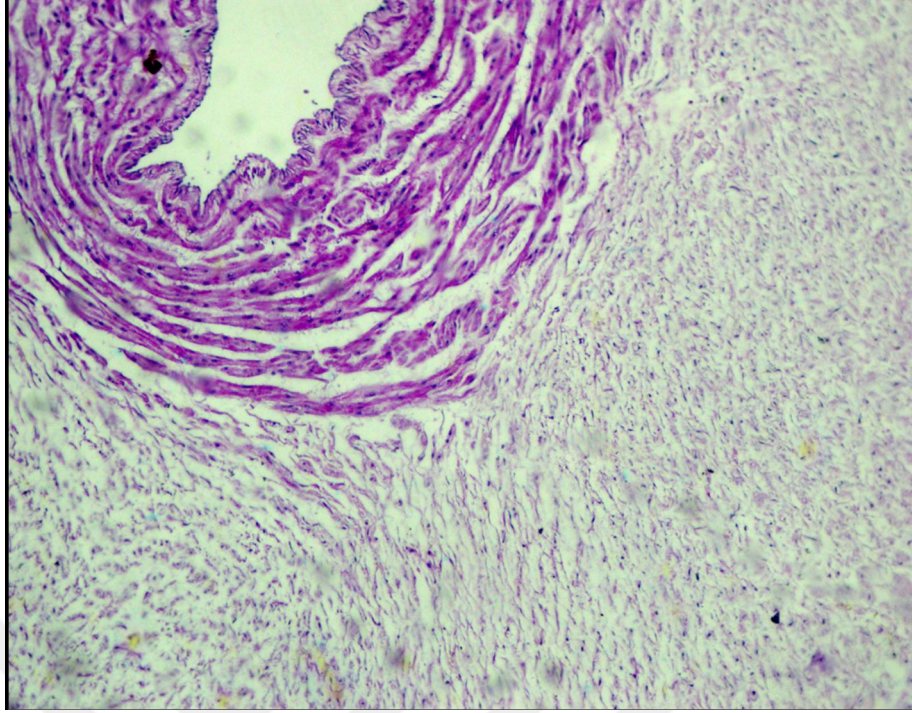
Resim 21: VK-PGDM grubu WJ ve porları ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 10×)



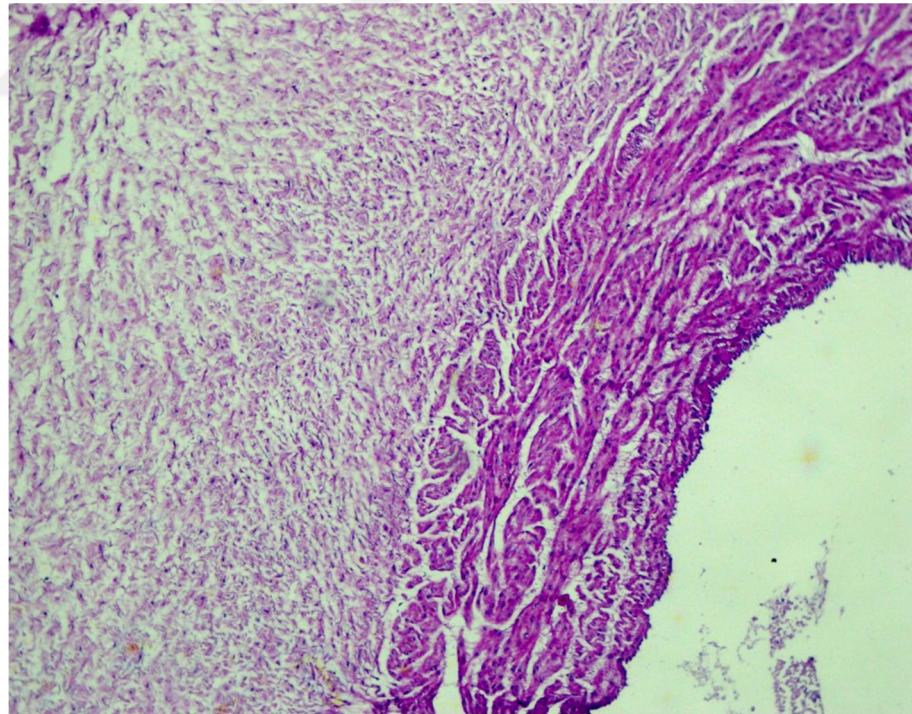
Resim 22: VK-PGDM grubu arter duvarı ışık mikroskopik görüntüsü (TR1,10×)



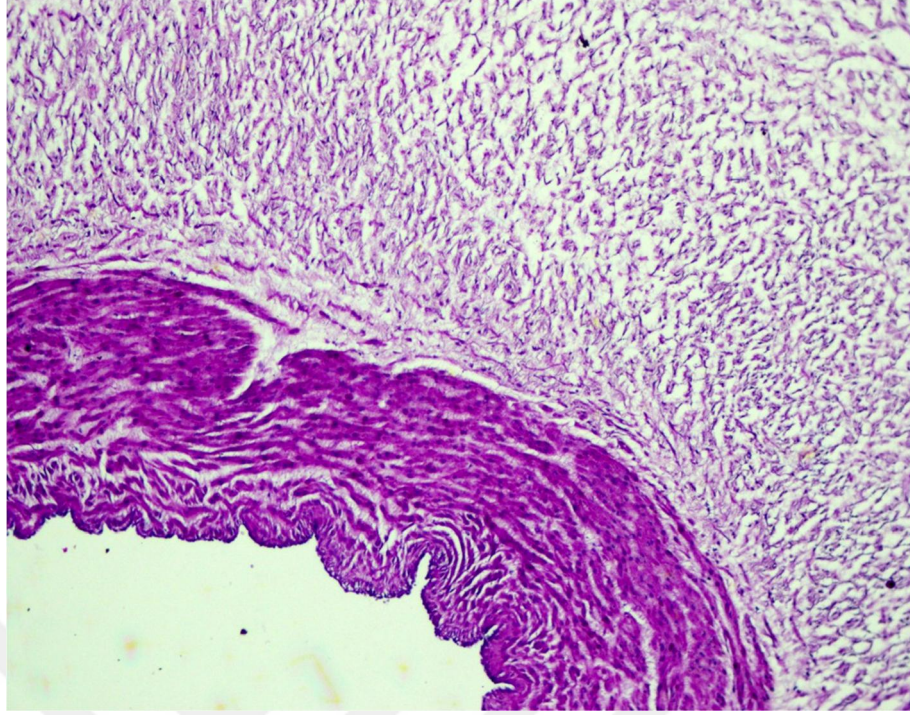
Resim 23: VK-PGDM grubu ven duvarı ve endotel ışık mikroskopik görüntüsü (TR1,20×)



Resim 24: Kontrol grubu ışık mikroskopik görüntüsü (PASX10)



Resim 25: GDM grubu ışık mikroskopik görüntüsü (PASX10)



Resim 26: VK-PGDM grubu ışık mikroskopik görüntüsü (PASX10)

4.3. Flow-sitometri Bulguları

Çalışmamızda Kontrol, GDM ve VK-PGDM gruplarının WJ-MKH'lerini sayısal olarak değerlendirmek için; WJ'den enzimatik yöntemle hücreler izole edildi. Bu hücreler içinde mezenkimal kök hücreleri sayabilmek için; MKH'lerde (+) olduğu bilinen CD44, CD73, CD90, CD105 belirteçler ve (-) olduğu bilinen CD34 ve CD45'i de bulunduran (+) ve (-) kokteyl belirteçlerinin karışımını içeren mezenkimal kök hücre sayım kiti kullanıldı.

Kontrol Grubu: CD90 (+) hücrelerin sayısı ($2731,14 \pm 751,91$), CD90 (+) hücrelerin yüzdesi ($3,4 \pm 1,94$), CD44 (+) hücrelerin sayısı ($2523,29 \pm 647,67$), CD44 (+) hücrelerin yüzdesi ($3,29 \pm 1,82$), CD73 (+) hücrelerin sayısı ($2256,5 \pm 796,76$), CD73 (+) hücrelerin yüzdesi ($3,34 \pm 2,13$), CD105 (+) hücrelerin sayısı ($2401,43 \pm 1071,23$), CD105 (+) hücrelerin yüzdesi ($3,41 \pm 1,74$), (+) ve (-) karışım kokteyli hücre sayısı ($2524,86 \pm 842,12$), (+) ve (-) karışım kokteyli hücre yüzdesi ($4,12 \pm 1,85$) olarak bulundu (Tablo 17, Şekil 4, Şekil 6).

GDM Grubu: CD90, CD44, CD73, CD105 hücre sayılarının Kontrol grubu ile karşılaştırılmalarında anlamlı bir artış saptandı (Tablo 17, Şekil 3, Şekil 6).

(+), (-) karışım kokteyli grubunda ise sayısal olarak artış görüldü fakat bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı (Tablo 17, Şekil 3, Şekil 6), ($p=0,008$, $p=0,008$, $p=0,027$, $p=0,040$, $p=0,206$).

CD90, CD105, CD44, CD73 ve (+), (-) karışım kokteyli hücre yüzdelерinin kontrol grubu ile karşılaştırılmasında anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 18, Şekil 7), ($p=0,491$, $p=0,995$, $p=0,124$, $p=0,077$, $p=0,440$).

CD90, CD44, CD73, CD105, (+), (-) karışım kokteyli grubunun hücre sayılarının VK-PGDM ile karşılaştırılmalarında anlamlı bir artış bulundu (Tablo 17, Şekil 3, Şekil 6) ($p=0,001$).

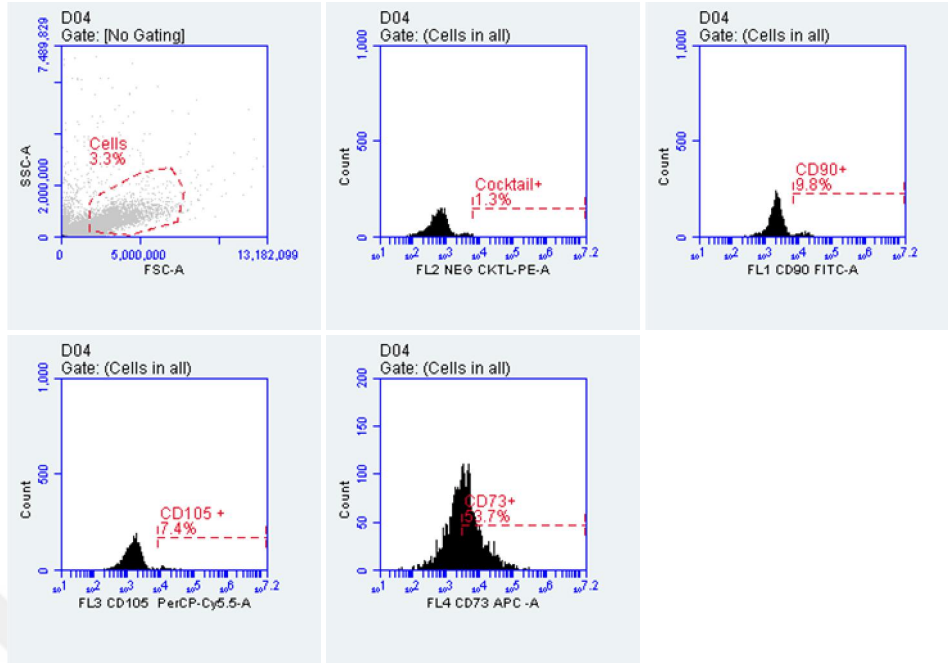
CD90, CD105 ve (+), (-) karışım kokteyli belirteçlerin hücre yüzdelерinin VK-PGDM grupları ile karşılaştırılmasında anlamlı bir artış bulunurken ($p=0,011$, $p=0,020$, $p=0,020$); CD44 ve CD73 hücre yüzdelерinin karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0,124$, $p=0,077$) (Tablo 18, Şekil 7).

VK-PGDM Grubu: CD90, CD105, CD44, CD73 ve (+), (-) karışım kokteyli hücre sayılarının kontrol grubu ile karşılaştırılmasında anlamlı bir azalma bulundu (Tablo 17, Tablo 19, Şekil 3, Şekil 5, Şekil 6) ($p=0,015$, $p=0,013$, $p=0,003$, $p=0,037$, $p=0,025$).

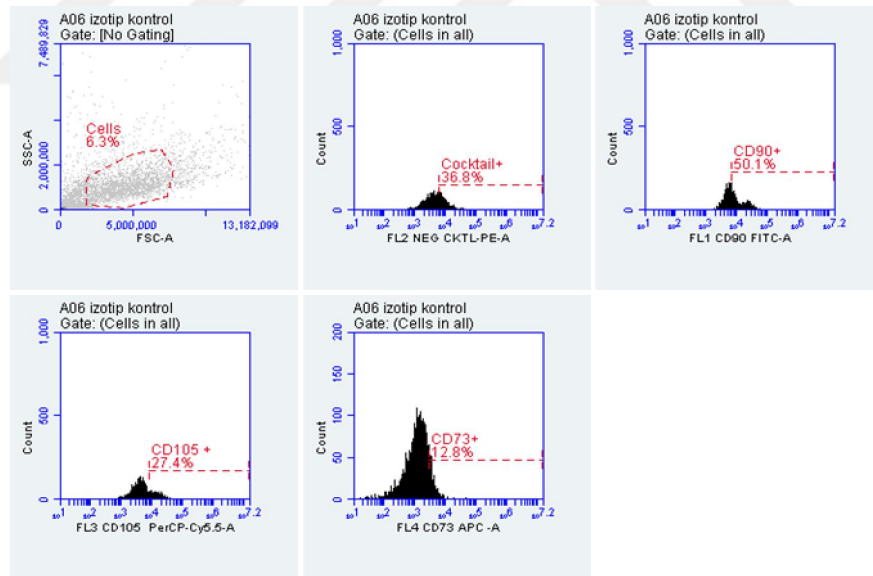
CD90, CD105, CD44, CD73 ve (+), (-) karışım kokteyli hücre sayılarının GDM grubu ile karşılaştırılmasında da anlamlı bir azalma bulundu (Tablo 17, Tablo 19, Şekil 5, Şekil 6) ($p=0,001$).

CD105, ve (+), (-) karışım kokteyli hücre yüzdelерinin kontrol grubu ile karşılaştırılmalarında anlamlı bir azalma bulunurken ($p=0,020$, $p=0,004$) CD90, CD44, CD73 belirteçlerinin yüzdesi açısından anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 18, Şekil 7) ($p=0,064$, $p=0,124$, $p=0,077$).

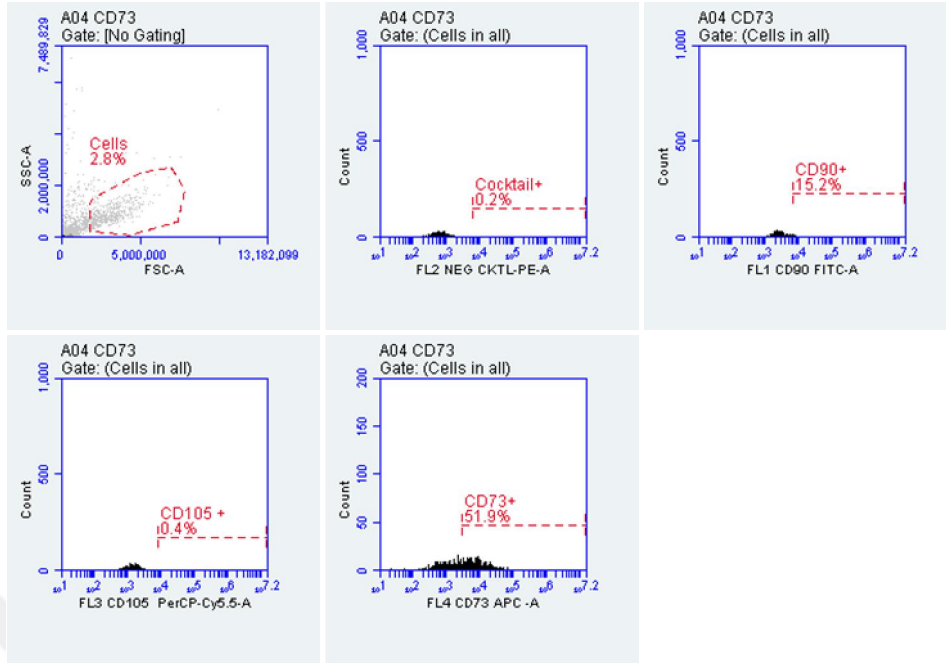
CD90, CD105 ve (+), (-) karışım kokteyli belirteçlerin hücre yüzdelерinin GDM grupları ile karşılaştırılmasında anlamlı bir azalma saptanırken ($p=0,011$, $p=0,020$, $p=0,020$); CD44 ve CD73 belirteçleri hücre yüzdelерinin karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 18, Şekil 7) ($p=0,124$, $p=0,077$).



Şekil 3: WJ-MKH lerinin flow-sitometrik değerlendirmesi GDM grubu .



Şekil 4: WJ-MKH lerinin flow-sitometrik değerlendirmesi kontrol grubu



Şekil 5: WJ-MKH lerinin flow-sitometrik değerlendirmesi VK-PGDM grubu.

Tablo 16: CD90, CD44, CD105, CD73, (+) ve (-) karışım kokteyl antikorlarının gruplara göre sayı dağılımları.

		N	Ortalama±SD	P
CD90*	GDM	7	4541,0 ± 1736,39	0,001**
	VK-PGDM	7	1117,2 ± 490,60	
	K	7	2731,1 ± 751,91	
	Total	21	2796,4 ± 1788,82	
CD44*	GDM	7	3817,8 ± 1162,69	0,001**
	VK-PGDM	7	1060,7 ± 464,62	
	K	7	2523,2 ± 647,66	
	Total	21	2467,2 ± 1388,57	
CD105*	GDM	7	3422,1 ± 877,65	0,001**
	VK-PGDM	7	1131,0 ± 569,81	
	K	7	2401,4 ± 1071,22	
	Total	21	2318,1 ± 1262,93	
CD73*	GDM	7	3616,2 ± 1458,14	0,001**
	VK-PGDM	7	985,1 ± 468,85	
	K	6	2256,5 ± 796,75	
	Total	20	2287,4 ± 1477,70	
Kokteyl*	GDM	7	3289,5 ± 1594,85	0,005**
	VK-PGDM	7	1101,2 ± 553,85	
	K	7	2524,8 ± 842,11	
	Total	21	2305,2 ± 1389,66	

*ANOVA testi, **p<0,05

Tablo 17: CD90, CD44, CD105, CD73, (+) ve (-) karışım kokteyl antikorlarının gruplara göre hücre yüzdeleri dağılımları

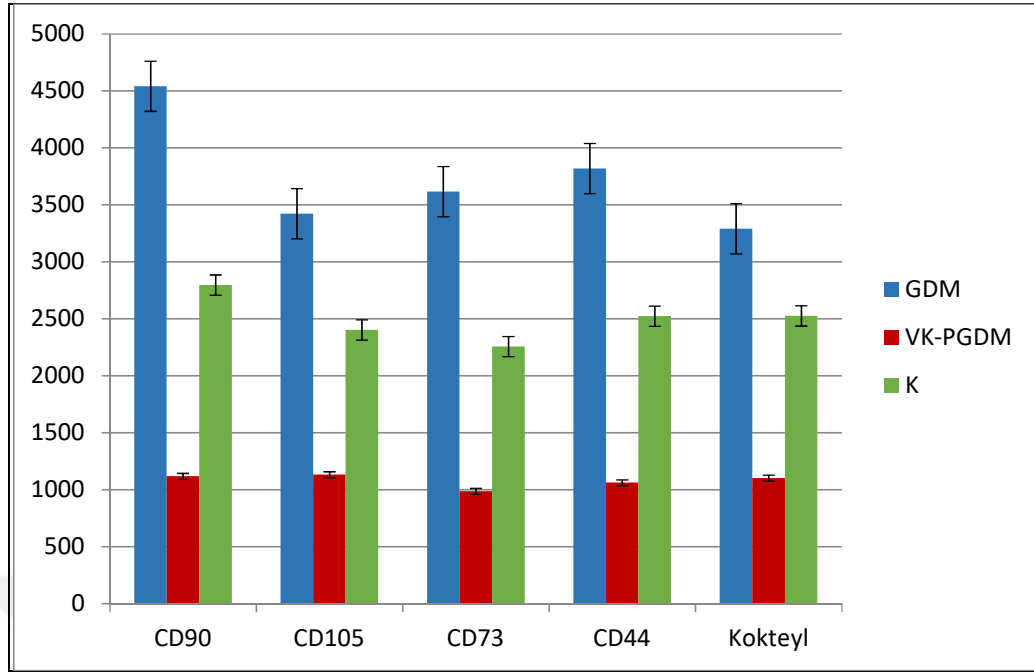
		N	Ortalama $\pm$ Std.Sapma	P
CD90%†	GDM	7	3,85 $\pm$ 1,23	0,032**
	VK-PGDM	7	1,75 $\pm$ 0,72	
	K	7	3,38 $\pm$ 1,93	
	Total	21	2,99 $\pm$ 1,60	
CD44%*	GDM	7	3,22 $\pm$ 1,00	0,124
	VK-PGDM	7	1,96 $\pm$ 0,81	
	K	7	3,29 $\pm$ 1,82	
	Total	21	2,82 $\pm$ 1,37	
CD105%*	GDM	7	3,42 $\pm$,90	0,029**
	VK-PGDM	7	1,80 $\pm$,57	
	K	7	3,41 $\pm$ 1,74	
	Total	21	2,88 $\pm$ 1,36	
CD73%*	GDM	7	3,38 $\pm$ 1,17	0,077
	VK-PGDM	7	1,71 $\pm$ 0,69	
	K	7	3,34 $\pm$ 2,13	
	Total	21	2,81 $\pm$ 1,60	
Kokteyl%*	GDM	7	3,58 $\pm$ 1,01	0,009**
	VK-PGDM	7	1,86 $\pm$,56	
	K	7	4,12 $\pm$ 1,85	
	Total	21	3,18 $\pm$ 1,55	

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

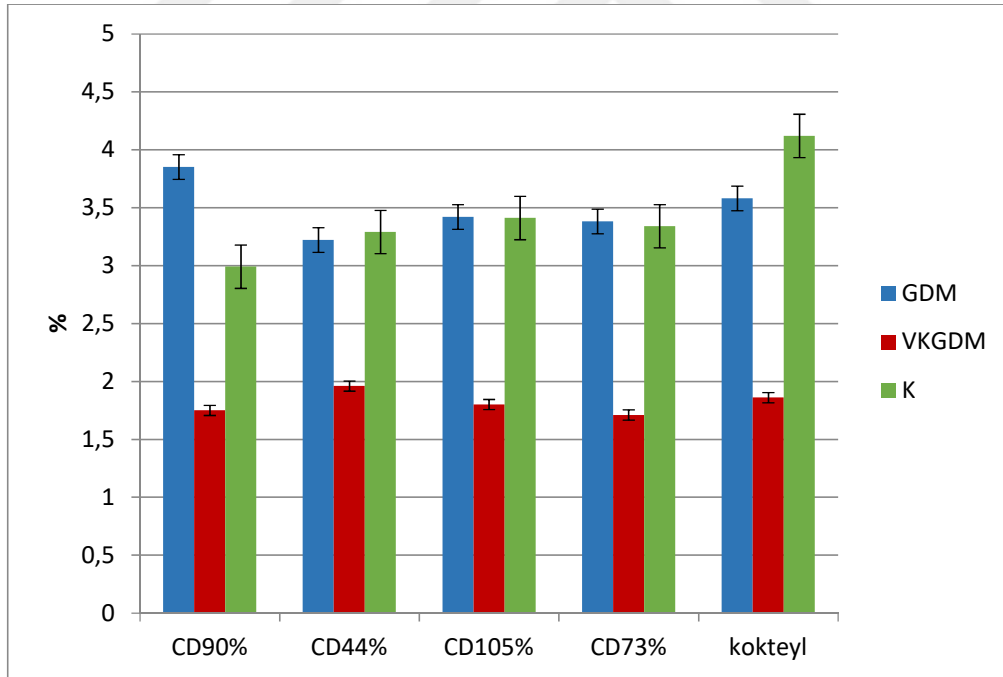
Tablo 18: CD90, CD44, CD105, CD73, (+) ve (-) karışım kokteyl antikorlarının gruplar arası hücre sayılarının karşılaştırmalı değerlendirilmesi

Çoklu karşılaştırmalar			
Bağımlı değişken			P
CD90	GDM	VK-PGDM	0,001*
		K	0,008*
	VK-PGDM	GDM	0,001*
		K	0,015*
	K	GDM	0,008*
		VK-PGDM	0,015*
CD44	GDM	VK-PGDM	0,001*
		K	0,008*
	VK-PGDM	GDM	0,001*
		K	0,003*
	K	GDM	0,008*
		VK-PGDM	0,003*
CD105	GDM	VK-PGDM	0,001*
		K	0,040*
	VK-PGDM	GDM	0,001*
		K	0,013*
	K	GDM	0,040*
		VK-PGDM	0,013*
CD73	GDM	VK-PGDM	0,001*
		K	0,027*
	VK-PGDM	GDM	0,001*
		K	0,037*
	K	GDM	0,027*
		VK-PGDM	0,037*
Kokteyl	GDM	VK-PGDM	0,001*
		K	0,206
	VK-PGDM	GDM	0,001*
		K	0,025*
	K	GDM	0,206
		VK-PGDM	0,025*

*p<0,05



Şekil 6: CD90, CD105, CD73, CD44, (+) ve (-) kontrol kokteyli (+) olan hücre sayılarının gruplar arası karşılaştırılmasını gösteren grafik

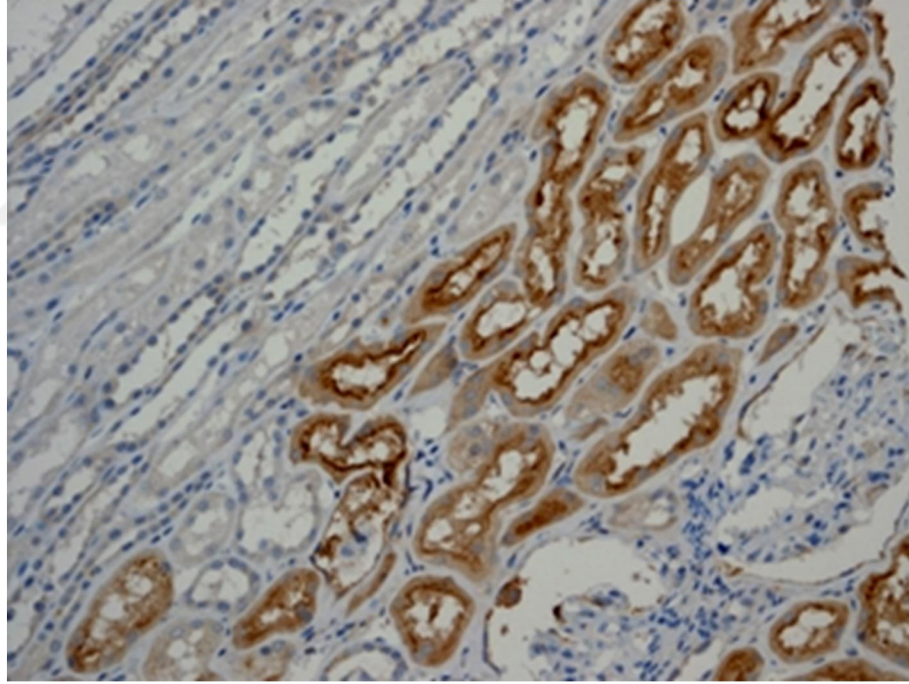


Şekil 7: CD90, CD105, CD73, CD44, (+) ve (-) kontrol kokteyli hücre yüzdelерinin gruplar arası karşılaştırılmasını gösteren grafik

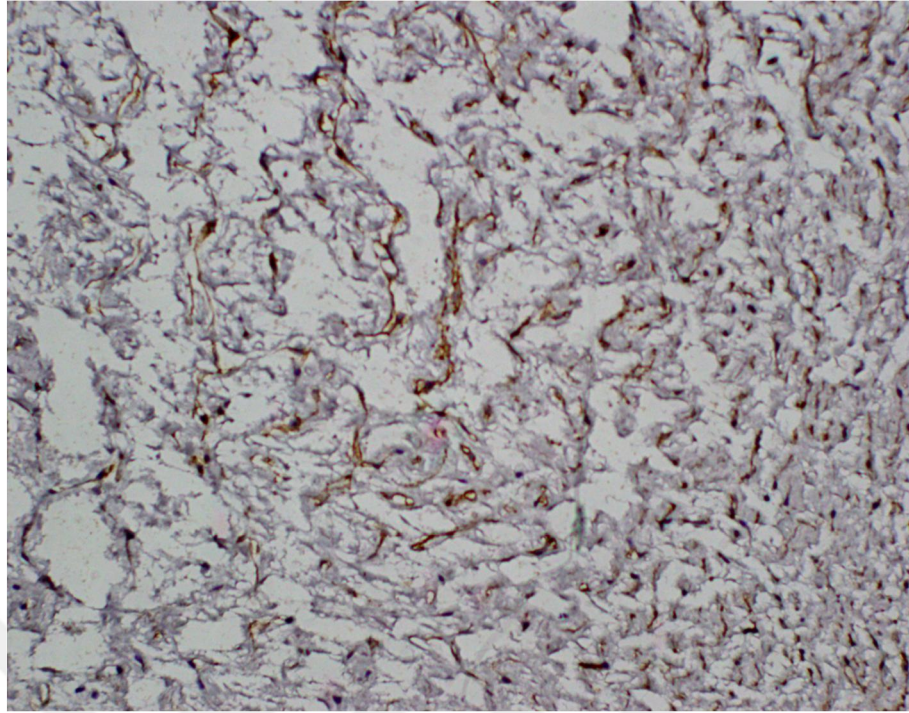
4.4. İmmünohistokimya Bulguları

İmmün boyamada Kontrol, GDM ve VK-PGDM gruplarının WJ-MKH'lerini görsel olarak değerlendirmek için; MKH'lerde (+) olduğu bilinen CD90, CD105, CD73 ve (-) olduğu bilinen CD34 ve CD45 antikorları kullanıldı. Pozitif kontrol dokuları olarak CD90 için böbrek, diğer antikorlar için tonsil dokuları kullanıldı. (-) kontrol olarak primer Ab yerine PBS solusyonu uygulandı (Resim 27, Resim 31, Resim 35 Resim 39, Resim 43).

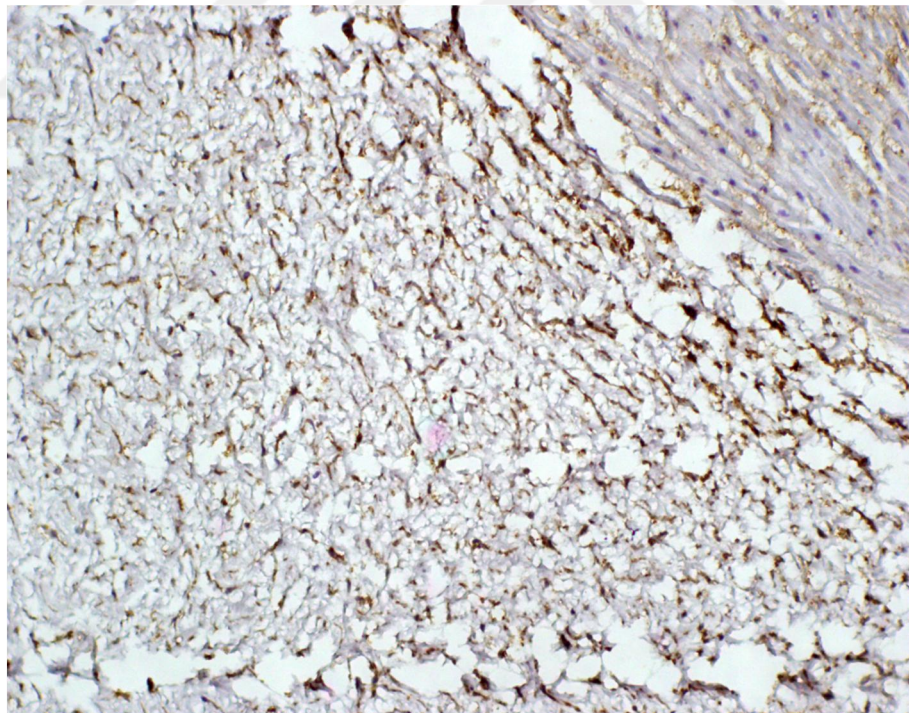
CD90, CD105, CD73 antikorları kullanarak yapılan immünohistokimyasal boyamada flow-sitometri verileri ile uyumlu olarak GDM'li grupta en yoğun boyanma, VK-PGDM'li grupta ise en az boyanma olduğu görüldü (Resim 28 - 38). CD34 ve CD45 antikorları kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyamada ise her üç grupta WJ'nde boyanma izlenmedi (Resim 40 - 46).



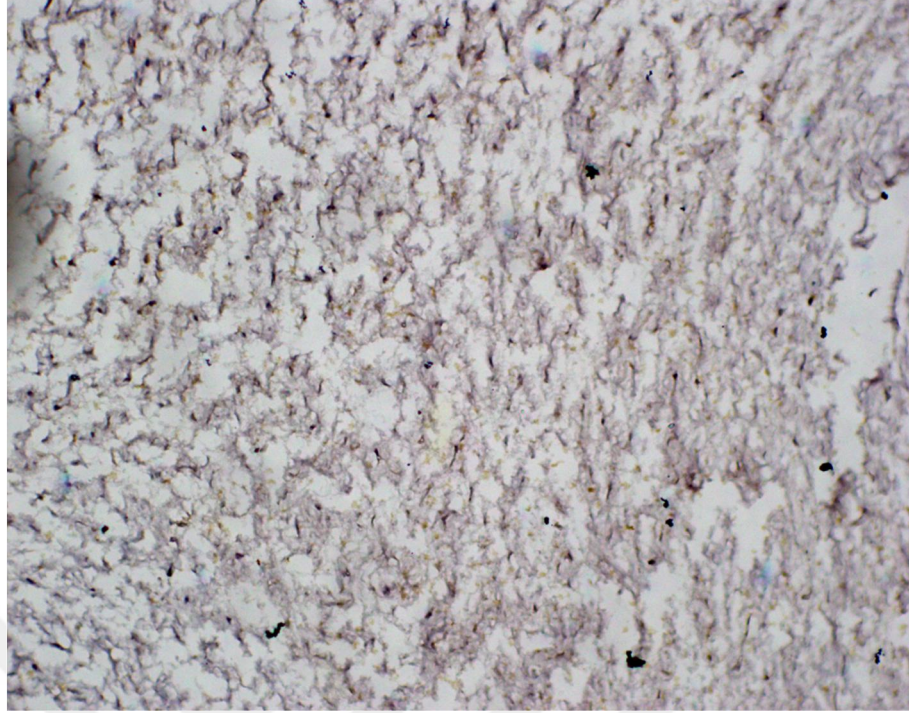
Resim 27: CD90 pozitif kontrol, böbrek dokusu(10X)



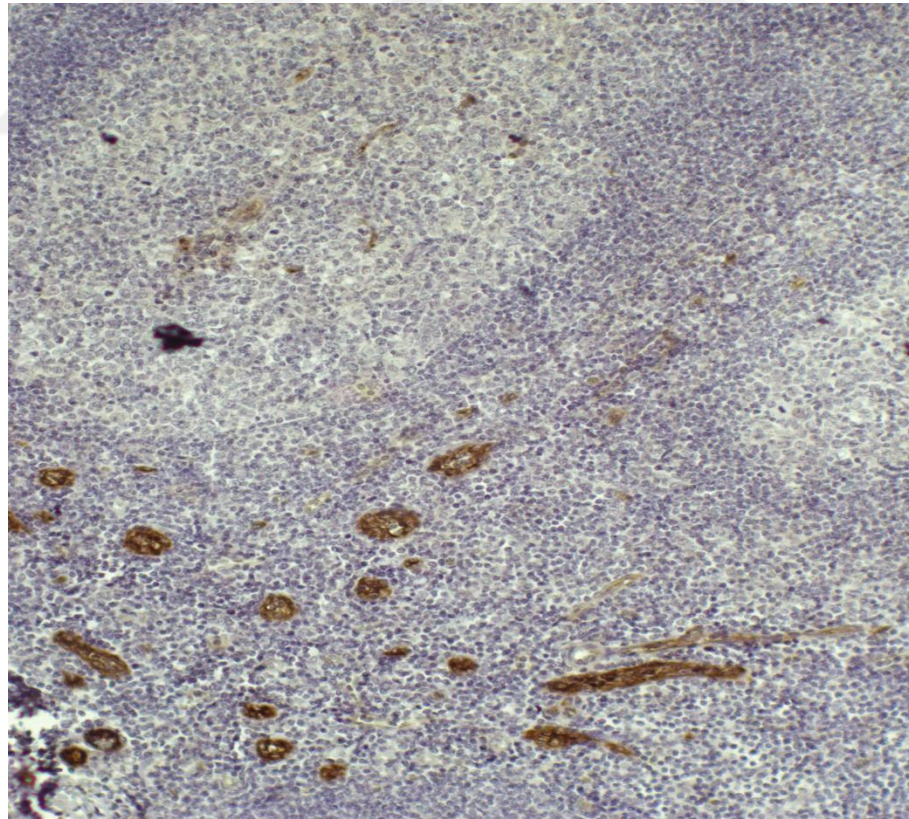
Resim 28: CD90 Kontrol grubu WJ (10X)



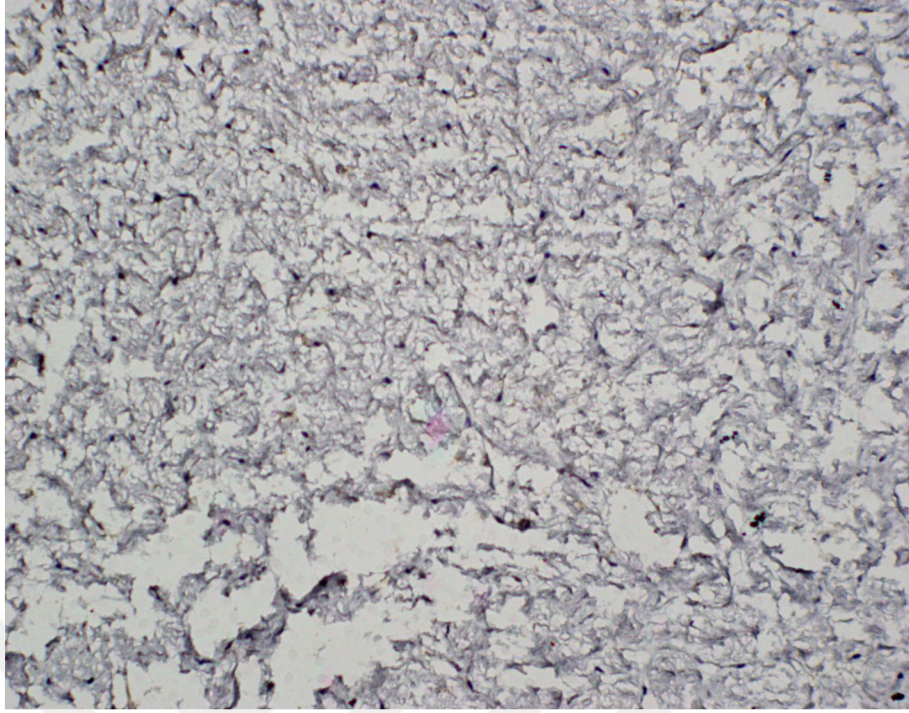
Resim 29: CD90 GDM grubu WJ (10X)



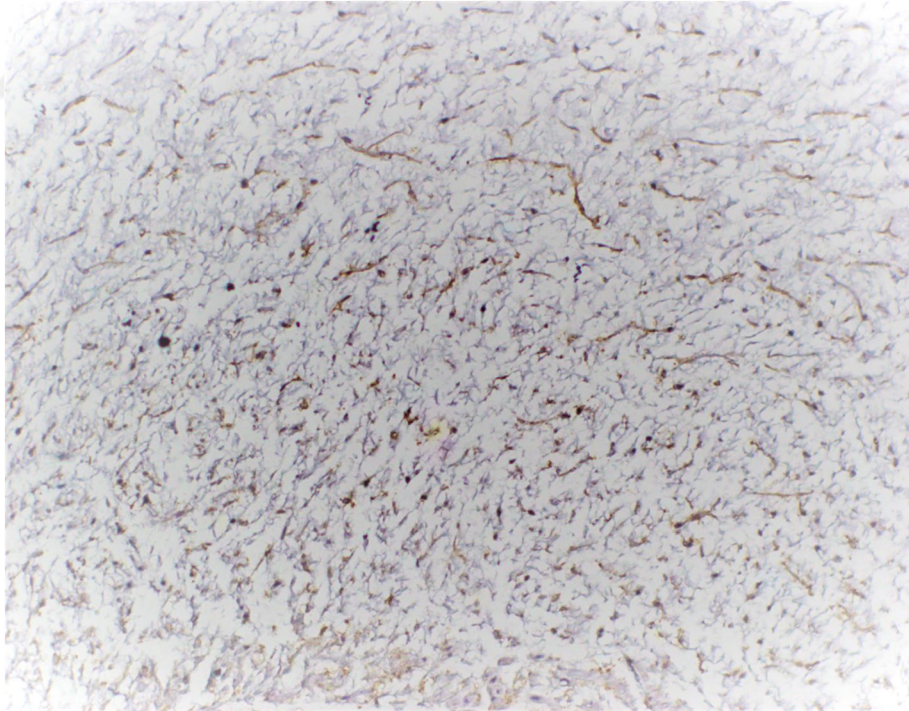
Resim 30: CD90 VK-PGDM grubu WJ (10X)



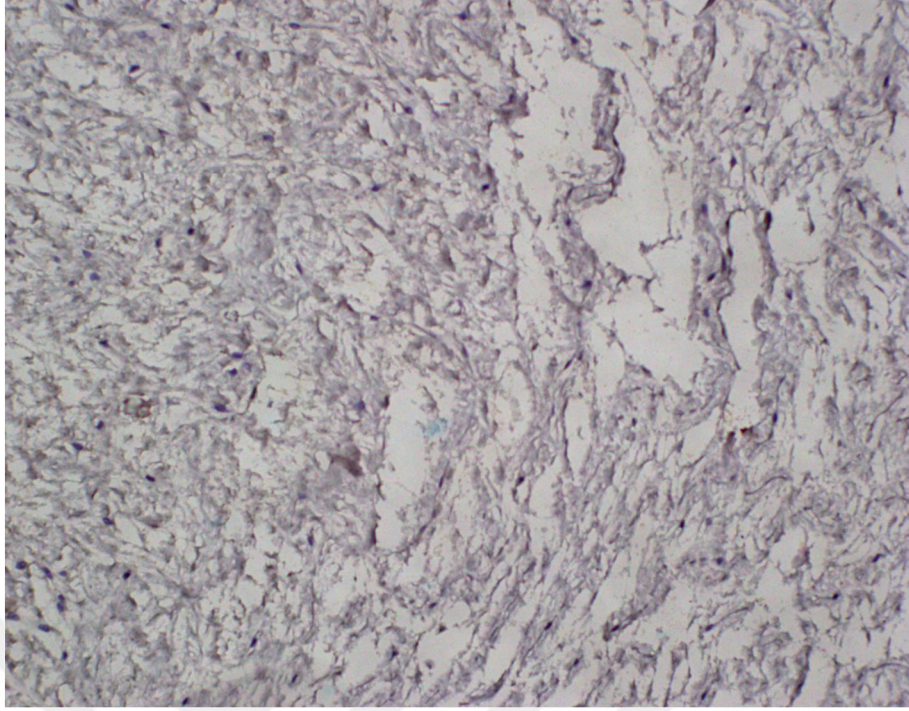
Resim 31: CD105 pozitif kontrol tonsil dokusu (10X)



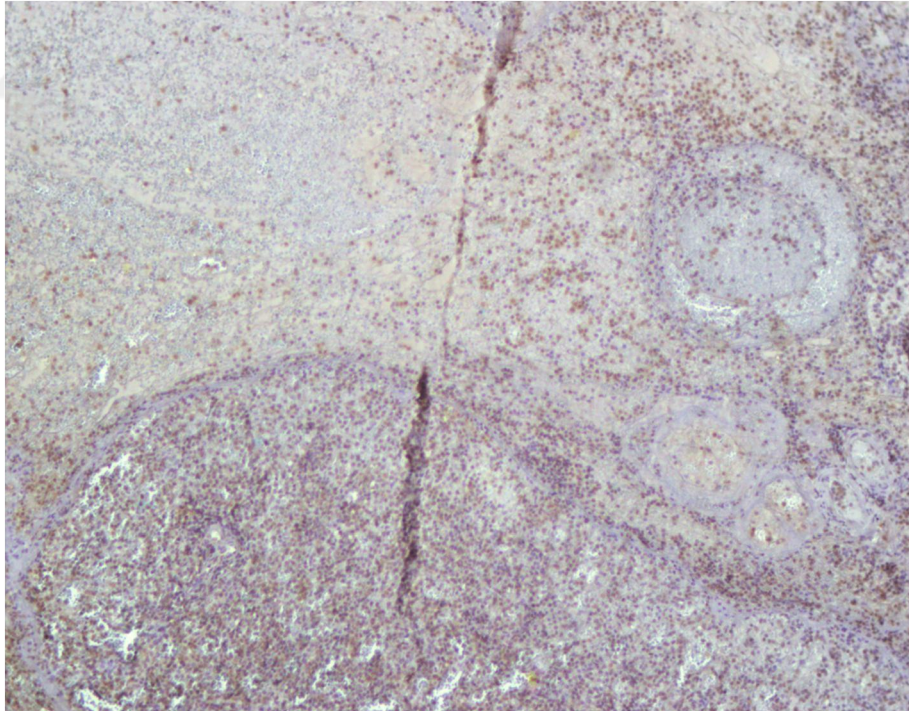
Resim 32: CD105 kontrol grubu WJ (10X)



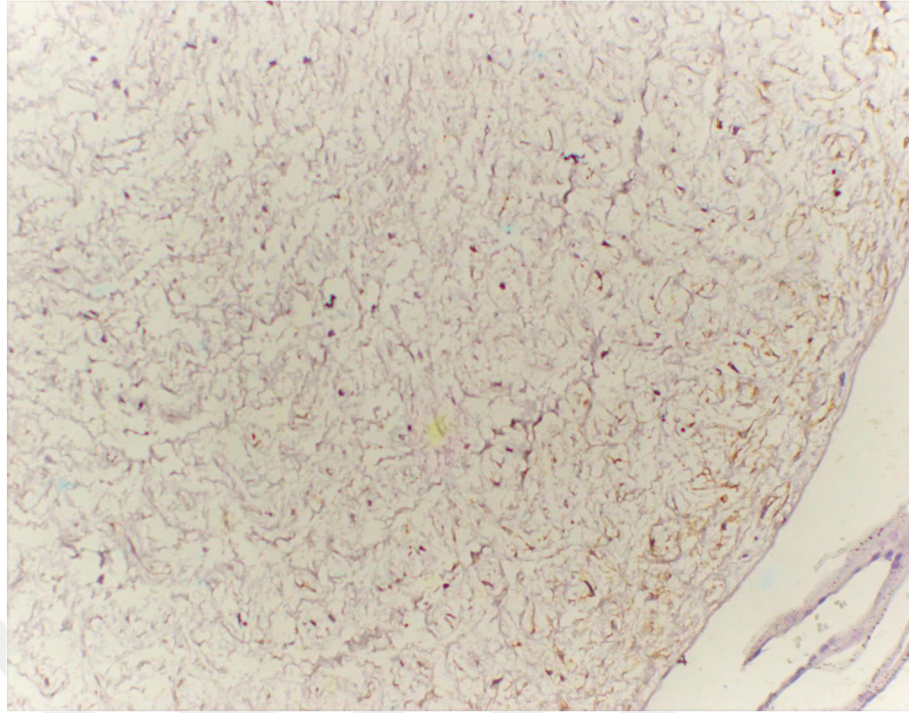
Resim 33: CD105 GDM grubu WJ (10X)



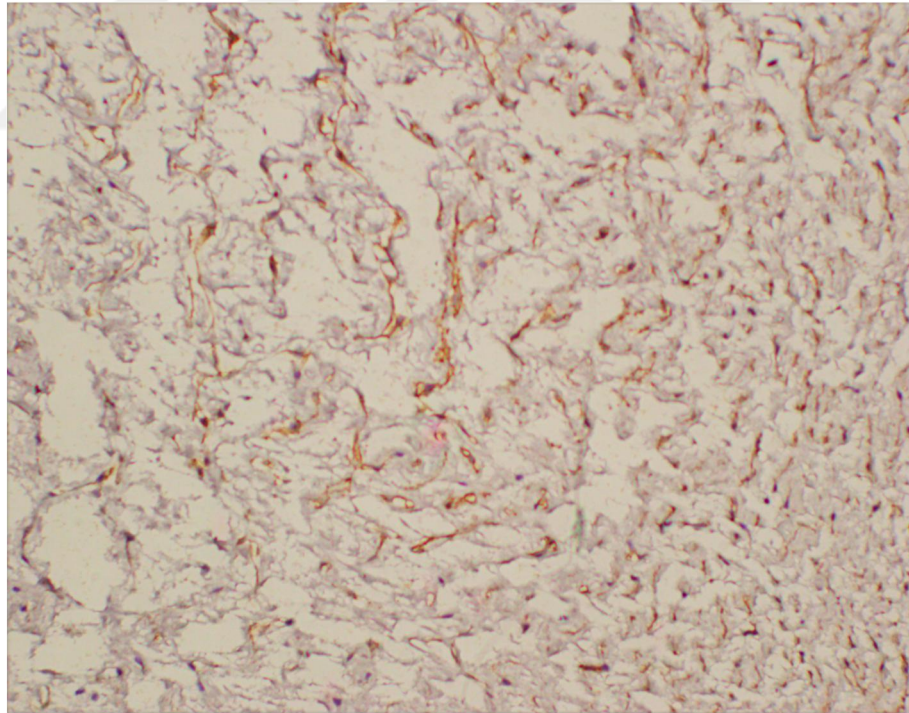
Resim 34: CD105 VK-PGDM grubu WJ (10X)



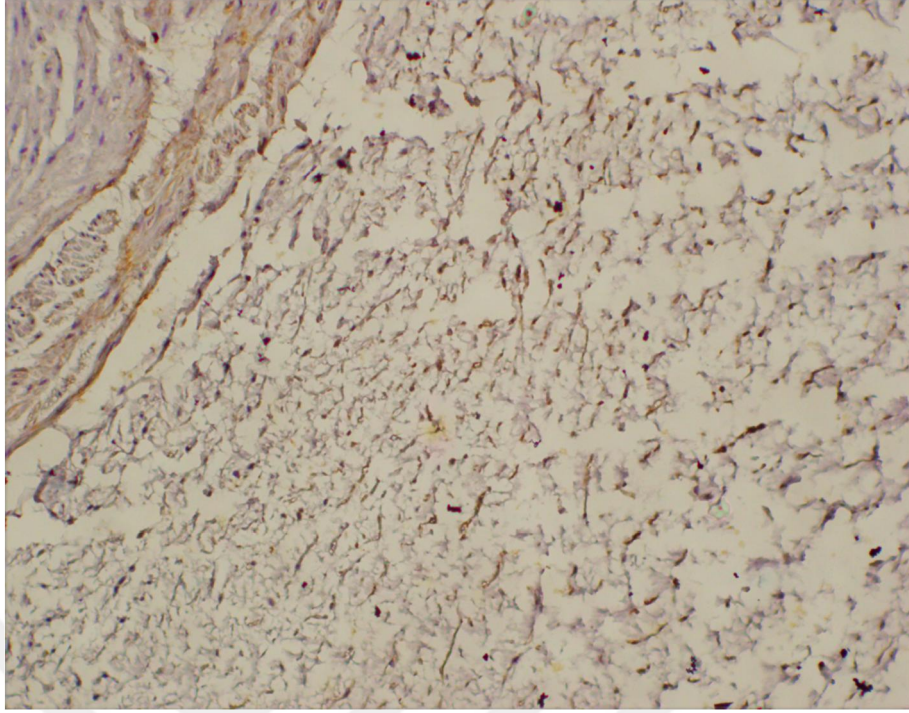
Resim 35: CD73 pozitif kontrol tonsil dokusu (4X)



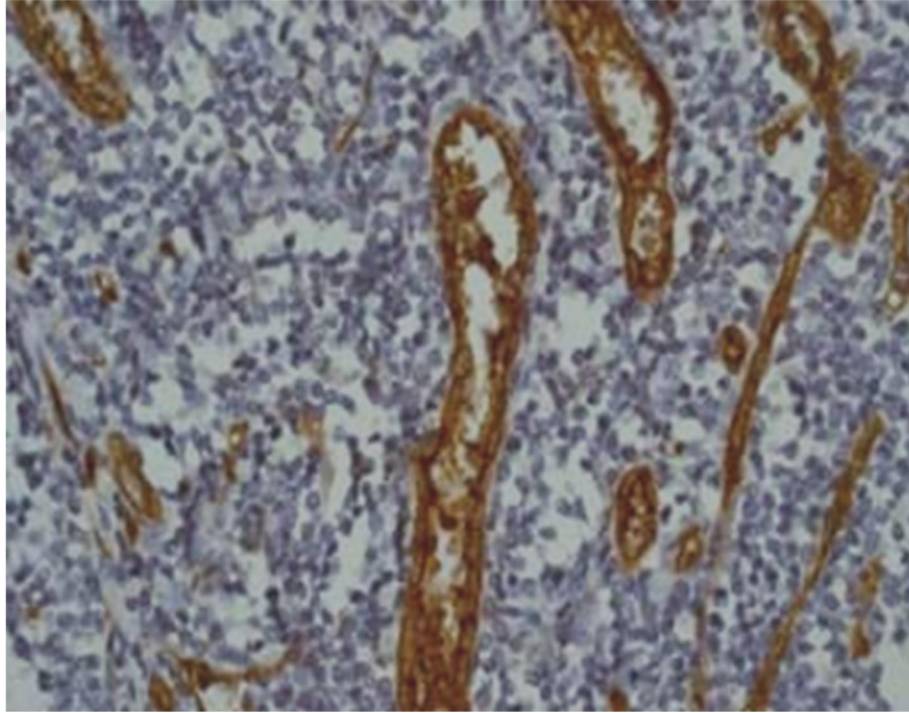
Resim 36: CD73 kontrol grubu WJ (10x)



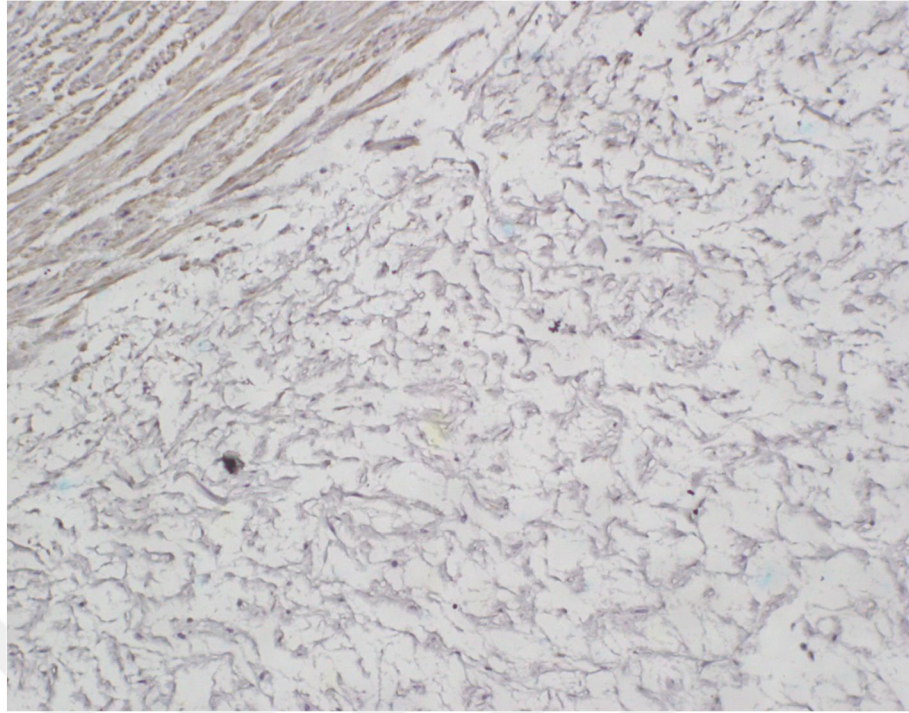
Resim 37: CD73 GDM grubu WJ (10X)



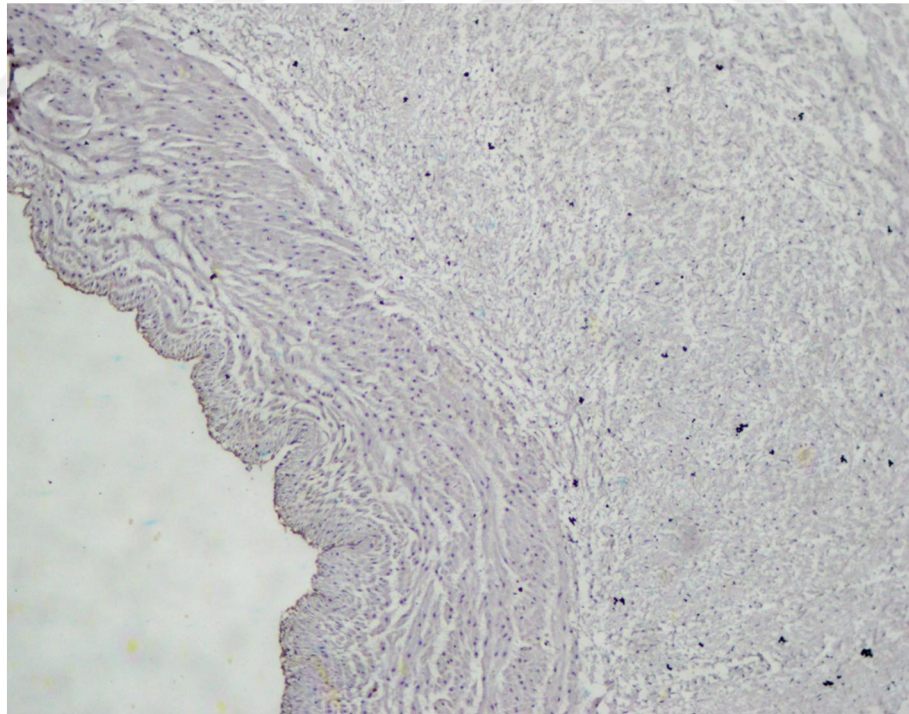
Resim 38: CD73 VK-PGDM grubu WJ (10X)



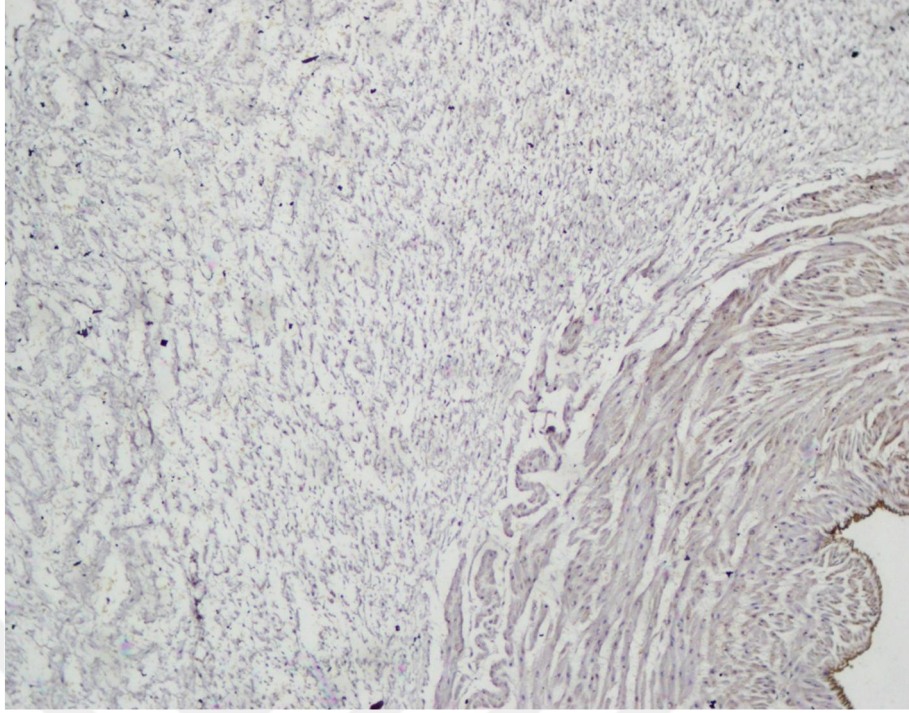
Resim 39: CD 34 pozitif kontrol tonsil dokusu (10X)



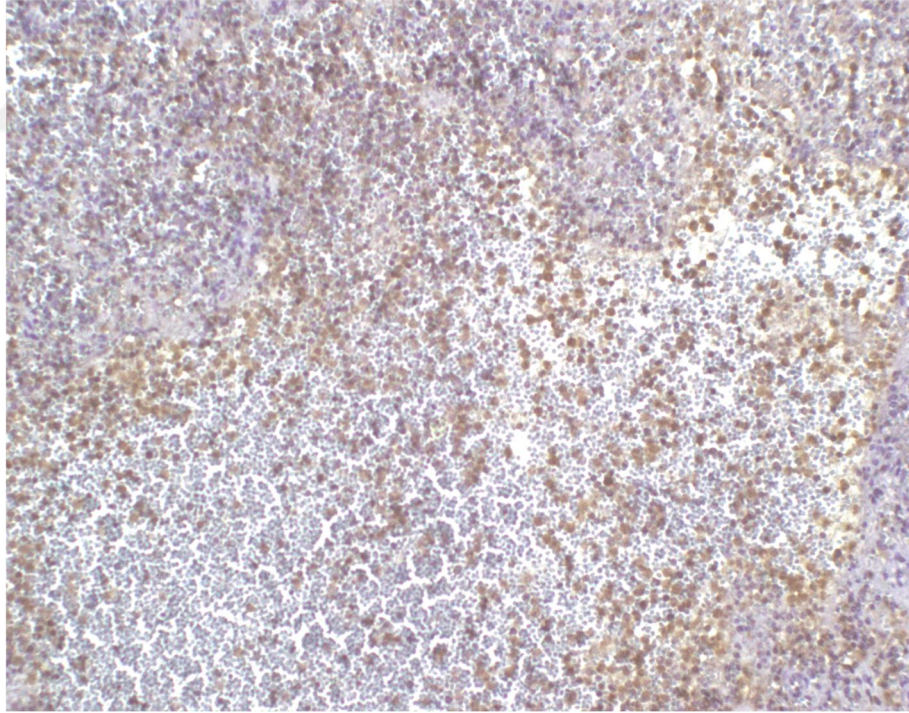
Resim 40: CD34 kontrol grubu WJ (10X)



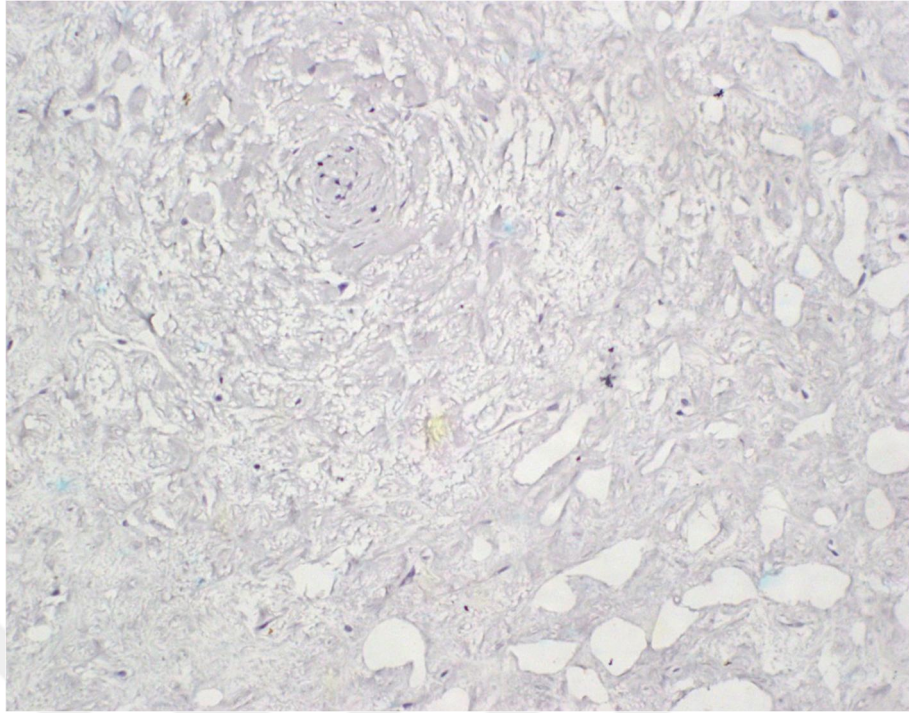
Resim 41: CD34 GDM grubu WJ (4X)



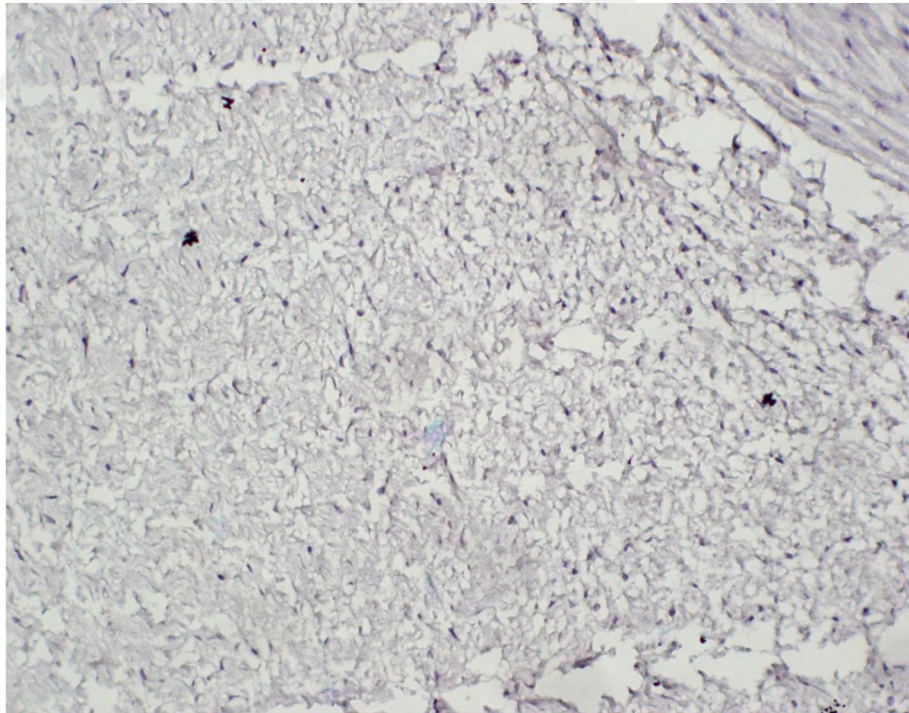
Resim 42: CD34 VK-PGDM grubu WJ (4X)



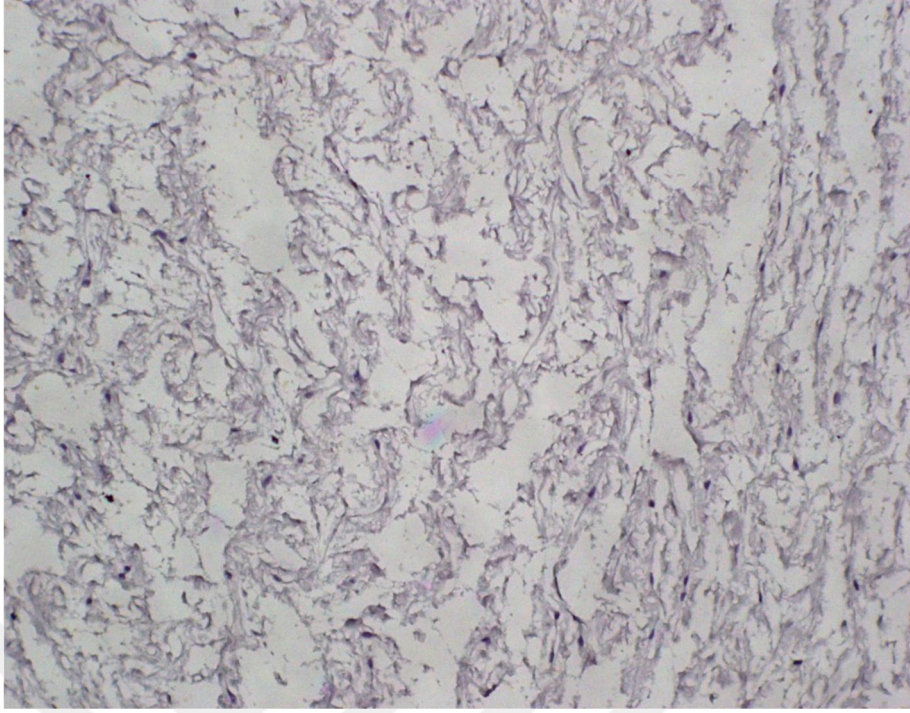
Resim 43: CD45 pozitif kontrol tonsil dokusu (10X)



Resim 44: CD45 kontrol grubu WJ (10X)



Resim 45: CD45 GDM grubu WJ (10X)



Resim 46: CD45 VK-PGDM grubu WJ (10X)

5. TARTIŞMA

Diyabet insülin eksikliği yada dokularda insülin etkisinin azalması sonucu kan şekeri yüksekliği ile seyreden kronik bir hastalıktır. Yüksek kan şekeri kısa dönemde diyabetik ketoasidoz gibi akut komplikasyonlar yapar. Uzun dönemde ise; ileri glikozilasyon son ürünleri, serbest oksijen radikalleri (ROS), Protein Kinaz C (PKC) yolağı aktivasyonu, TNF- α ve IL'ler gibi inflamasyon mediyatörlerinin artışı ile endotel hasarı yaparak dokularda geri dönüşümsüz makrovasküler ve mikrovasküler hasara sebep olmaktadır.

Gebelik, fertilizasyondan başlayarak miadında bir fetus oluşumuna kadar yaklaşık 40 hafta süren ve bebeğin oluşumunu devam ettirdiği bir süreçtir. Bu süreçte annenin metabolik durumu bebek gelişiminin aynası olmaktadır. Annenin diyabete maruz kaldığı süre, diyabetin şiddeti ve annenin diyabetten etkilenme durumuna göre fetal klinik değişmektedir. Bu nedenle diyabeti olan gebelerde fetal ve maternal riski belirlemek için 1949 yılında Priscilla White tarafından gebelikte diyabetin sınıflandırması yapılmıştır [6]. Bu sınıflandırmaya göre yapılan çalışmalarda, vasküler komplikasyon gelişmiş annelerin bebekleri ile vasküler komplikasyon geliştirmeyen ya da gebeliği sırasında diyabet teşhisi konan annelerin bebekleri arasında farklılıklar olduğu görülmüştür [77, 94].

GDM'li anne bebeklerinde prematürite, makrozomi, doğum travmaları, konjenital anomaliler, kardiyak problemler, solunum problemleri ve hipoglisemi, hipokalsemi, hiperbilirubinemi, polisitemi gibi sorunlar öncelikli olarak görülmektedir [83, 84, 87, 89].

VK-PGDM'li anne bebeklerinde daha çok konjenital malformasyonlar, ölü doğum, ani bebek ölümü, intrauterin gelişme geriliği, gebelik yaşına göre düşük doğum ağırlığı sıklığında artış görülürken, GDM'li annelerin bebeklerinde görülen solunum sıkıntısı bu bebeklerde nadiren izlenmektedir [95, 96].

Çalışmamızda GDM'li, VK-PGDM'li (White F Grubu) ve herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan normal gebelerin bebekleri ve göbek kordonları incelenmiştir. Verilerimize göre gebelerin yaş ortalamaları ve gebelikte aldığı kilo, GK ağırlığı ve uzunluğu bakımından gruplar arası anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,175$, $p=0,386$, $p=0,122$, $p=0,113$). Ayrıca, bebeklerin doğum ağırlığı ortalamalarında GDM'li grupta artış görülmüş, bu artış istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi ($p=0,621$). Dilbaz ve arkadaşları 2004, Saraç ve arkadaşları 2015 yıllarında yapmış olduğu çalışmalarda; GDM'li anne bebeklerinde, makrozomi oranını yüksek olarak tespit etmişlerdir [94, 97]. Bizim çalışmamızda GDM'li gebelerin çoğunun, gebelikte takipleri düzenli olarak yapılmış ve kan glukoz düzeyleri kontrolü sağlanmıştır. Böylece GDM'li gebelerin HbA1c düzeyleri normal aralığın üst sınırlarında tespit edilmiştir. Bu durum bebeklerin diyabetik ortamdan daha az etkilenmesini açıklar niteliktedir. Diğer taraftan Haeri ve arkadaşları çalışmalarında, vasküler komplikasyon gelişmiş anne bebeklerinde düşük doğum ağırlığının daha fazla görüldüğünü, komplikasyon sayı ve şiddetindeki artışa göre bebeklerin düşük doğum ağırlıklı olma oranlarının da arttığını göstermişlerdir [79].

Çalışmamız tekli komplikasyonlu (nefropati) gebelerle yapıldı ve VK-PGDM'li grupta bebeklerin doğum ağırlığı ortalamalarında azalma görülürken istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmedi ($p=0,621$). Bu sonuç gebelikte bebeklerin etkilenme oranında çoklu komplikasyonların ve maruziyet süresinin önemini vurgular niteliktedir.

Çalışmamızda plasenta ağırlıkları ortalaması GDM'li grupta diğer gruplara göre yüksek tespit edilirken bu artış anlamlı bulunmadı ($p=0,608$). Taricco ve arkadaşlarının çalışmalarında GDM'li gebelerin plasenta ağırlıklarında belirgin artış tespit edilmiştir. Daskalakis ve arkadaşlarının çalışmasında ise GDM'li plasenta ağırlıklarının normal plasenta ağırlıklarına göre yüksek olduğu, fakat bu ağırlık artışının anlamlı olmadığı saptanmıştır [98, 99]. Diyabetli hastalarda kandaki artmış glukoz, pek çok proteinle beraber hemoglobine de bağlanır. Bu, dokulara taşınan oksijen miktarını azaltır, dokular hipoksik ortama maruz kalırlar. Ilımlı seviyedeki hipoksi, damarlanma artışını tetikler ve diğer dokularda olduğu gibi plasantanın damarlanması dolayısı ile kütlesi de artar. Ancak bu artış, diyabetin tipi, gebelik süresince diyabetin regülasyonu ve hastanın tedaviye uyumu ile değişmektedir.

Diyabet tedavisinde yakın takip ve sıkı kan şekeri kontrolü ile kan glukoz düzeyleri normal sınırlarda tutulmaya çalışılmaktadır. Bu kontrolün uzun dönem

göstergesi kan HbA1c seviyesidir. Günümüzde GDM tespit edilen gebelerin tedavi ve takipleri de düzenli olarak yapılabilir. Böylece gelişen fetus ve fetal ekler diyabetik ortamdan daha az etkilenmektedir. Çalışmamızda GDM'li gebelerin HbA1c ortalamaları da kontrol grubuna göre yüksek, fakat normal sınırların üst seviyesinde tespit edildi ($p=0,483$). Bu durum; literatürde ve çalışmamızda istatistiksel olarak bebek doğum ağırlıkları ve plasenta ağırlıkları açısından gruplar arası farklılık bulunmamasını açıklar niteliktedir.

Binbir ve arkadaşları diyabetli gebelerde yaptıkları bir çalışmada; HbA1c seviyelerinin fetal makrozomi göstergesi olup olmadığını araştırmışlar fakat HbA1c seviyeleri ile makrozomi arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır. Çalışmalarında GDM ve PGDM'li hastaları ayrı gruplar olarak değerlendirmemiş, üstelik PGDM'li hastaların vasküler komplikasyon varlığını göz ardı etmişlerdir [91]. Oysa HbA1c seviyeleri bu gruplar arasında farklılık göstermektedir ki vasküler komplikasyon geliştirmiş hastalar en yüksek HbA1c seviyesi olan hastalardır. Vasküler komplikasyon geliştirmiş gebelerin bebeklerinde zaten düşük doğum ağırlığı beklenmektedir. Bizim çalışmamızda HbA1c değeri açısından GDM'li grup ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmazken ($p=0,483$), VK-PGDM ile GDM ve Kontrol grupları arasında artma tespit edildi ($p=0,001$). VK-PGDM'li grupta bebeklerin doğum ağırlıkları da diğer gruplardan düşük olarak saptandı fakat bu düşüş anlamlı bulunmadı ($p=0,621$).

Çalışmamızda ayrıca GK'nunda histolojik olarak; GK çapı, amnion zarı, WJ, damar duvar yapıları, damar endoteli incelendi. Alam ve arkadaşları ise çalışmalarında GDM ve Pregestasyonel DM'li grupların damar endotellerinde erozyon ve rüptür bulgularına rastlamışlardır. Kaya ve arkadaşları da GDM'li GK damar endotelinde yine erozyon bulguları tespit etmişlerdir [93, 100]. Alam, Al-Kazzas ve Kaya GDM'li GK ile yaptıkları çalışmalarda GK çaplarında artış tespit etmişlerdir [9, 100, 101]. Bizim çalışmamızda da GK çapı GDM'li grupta anlamlı bir şekilde artmış olarak bulundu ($p=0,027$). Diyabetli gebelerde yüksek kan şekeri fetusa geçmekte ve fetus buna cevap olarak insülin salgılanmasını artırmaktadır. İnsülin glukozu dokuya almakta, gerektiği kadarını metabolize edip, glukozun fazlasını yağ olarak depolamaktadır. Aynı zamanda insülin büyüme hormonu ve tüm büyüme faktörlerini de artırıcı etkiye sahiptir. Yüksek kan glukozuna maruz kalmış fetusların dokularının büyük olması beklenmektedir ki bu durum, GK çapı artışının da temel nedeni olarak düşünülmektedir.

Bir diğerk bulgumuz da GDM’li grupta WJ’ndeki porların genişlemiş olduğu tespitidir ki bu durum WJ’sinde ödem lehine değerdendirildi. Kaya ve ark. da çalışmalarında GDM’li grupta WJ porlarında ödemden kaynaklanan genişlemeler tespit etmişlerdir. Weisman ve arkadaşları ise göbek kordonu ve damarlarını gebelik sırasında ultrasonografik olarak değerdendirmiştir. GDM’li grupta GK çapında artış tespit ederken damar çaplarında kontrol grubu ile fark izlememiş ve GK çapının bu artışını WJ’ndeki genişlemeye bağlamışlardır [12, 100].

Çalışmamızda GDM’li grupta, damar endotelinde hasara rastlanmazken, damar duvar kalınlıklarında artış tespit edildi fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,117$, $p=0,053$, $p=0,143$). Damar duvar kalınlıklarının GK çapına oranında da yine farklılık saptanmadı ($p=0,090$, $p=0,715$, $p=0,704$). Blanco ve arkadaşları da çalışmalarında GDM’li grupta damar duvar kalınlıklarında artma tespit etmiş fakat bu artış yine istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır [102].

VK-PGDM grubumuzda A1 çapında artma ($p=0,027$) tespit edildi. Diğerk arter (A2) ve ven duvar kalınlıklarında ki artma anlamlı bulunmadı ($p=0,090$, $p=0,715$, $p=0,704$). Duvar kalınlıklarının GK çapına oranlarında ise; arterlerin; A1 ve A2 DK / GK çap oranında artma ($p=0,002$) saptanırken, Ven DK / GK çap oranında anlamlı bir artış tespit edilmedi ($p=0,09$). Damar duvar kalınlıklarının GK çapına oranla artması aslında damar duvarlarının kalınlaştığının dolaylı bir göstergesidir. Diyabete maruz kalınan sürenin artması ile damar direnci artmakta, bu da bize artan dirençle beraber damar duvarındaki kaslarda kalınlaşma olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda VK-PGDM ve Kontrol gruplarında WJ’nde histopatolojik olarak belirgin bir fark görölmedi. Fakat damar duvar kalınlığının çapa oranla artmış bulunması dolaylı olarak bu grupta WJ miktarının azalmış olduğunu göstermektedir ki genel olarak VK-PGDM’li anne bebeklerinin ve dokularının küçük olması beklenen bir bulgudur. Literatür taramamızda daha önce VK-PGDM grubunda WJ ve GK damar duvar kalınlıkları ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda WJ-MKH değerdendirmesi için; WJ enzimatik olarak sindirildikten sonra 70 µl lik hücre süzgecinden geçirilerek WJ hücreleri ayrıldı. Buradaki MKH’ler; direkt olarak taze dokudan -kültüre edilmeden- CD44, CD73, CD90, CD105 ve CD34 ile CD45’i de bulunduran (+) ve (–) kokteyl belirteçleri kullanılarak flow-sitometri cihazında sayıldı. Bu belirteçlerin sayısal verilerine göre

GDM'li grupta kullandığımız MKH belirteçleri açısından belirgin bir artış görüldü ($p=0,008$, $p=0,008$, $p=0,027$, $p=0,040$). İmmünohistokimyasal boyamalarla da bu immünreaktivite artışı görsel olarak desteklendi. Pierdomenico ve arkadaşları GDM'li grupta kültürde yapmış olduğu çalışmada, CD90 (+) hücrelerde azalma izlerken diğer belirteçlerde anlamlı artma tespit etmişler. CD90 (+) hücrelerdeki azalmanın nedenini ise bu hücrelerin plastisite azalmasına bağlamışlardır. [103].

Montanucci ve arkadaşlarının kültürde yaptığı obez ve GDM'li gebelerle olan çalışmalarında MKH belirteç sayılarının normal gebelere göre artmış olduğu, fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür [104]. Kim ve arkadaşlarının kültürde yapmış olduğu çalışmada ise diyabetik MKH sayılarının ilk pasajda normale göre yüksek olduğu fakat ilerleyen pasajlarda sayılarının giderek azaldığını tespit etmişlerdir [11]. Yine Wajid ve arkadaşları çalışmalarında da benzer sonuçlar bulmuşlardır [10]. Burada fetal insulin artışının, büyüme hormonu ile beraber diğer büyüme faktörlerini de artırmasının önemi bir kez daha görülmektedir. Taze dokudan hazırlanmış hücre süspansiyonları ve kültür için hazırlanan hücrelerde ilk sayımların yüksek çıkması, pasajlama sayısı arttıkça (insülinin etkisi ile artan büyüme faktörlerinin kesilmesi sonucu) hücre sayılarının belirgin azalması GDM'de WJ-MKH sayılarının artmasını anlamlı kılmaktadır.

Literatür taramamızda daha önce VK-PGDM'li gebelerde WJ-MKH sayıları ile yapılan çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda ilk kez VK-PGDM'li grupta WJ-MKH sayıları değerlendirildi ve CD90, CD105, CD44, CD73 ve (+), (-) karışım kokteyli hücre sayılarının kontrol ve GDM grubu ile karşılaştırılmasında anlamlı bir azalma bulundu ($p=0,015$, $p=0,013$, $p=0,003$, $p=0,037$, $p=0,025$).

VK gelişmiş gebelerde, bebek doğum ağırlığı ve plasenta ağırlığının azalması, GK çapının azalması ile uyumlu olarak; bebeğe yeterince besin gelemediği, aynı zamanda yüksek HbA1c başta olmak üzere dokulara oksijen taşınma mekanizmasındaki ileri düzey yetersizliği göstermektedir. Ilımlı düzeydeki oksijen azalması ile kök hücre sayıları artarken, hipoksi derinliğinin ve süresinin artması ile orantılı olarak bu sayılar azalmaktadır. Ki bizim çalışmamızdaki sonuçlar da GDM'deki kök hücre sayısındaki artışı ve VK-PGDM grubunda ki hücre sayısının azalmasını da açıklar niteliktedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda uzun süreli diyabeti olup vasküler komplikasyon olarak nefropati tespit edilen gebeler, gestasyonel diyabeti olan gebeler ve sağlıklı gebelerin GK dokusu ve WJ-MKH'lerini, histomorfolojik, immünohistokimyasal ve flow-sitometrik yöntemlerle inceledik. Histomorfolojik bulgularımızda; GDM'li gebelerin GK çapında artma ve WJ porlarında genişleme ve ödem izledik. VK-PGDM'li gebelerde ise GK çapında azalma, damarlarda kalınlaşma, dolaylı olarak WJ miktarında azalma tespit ettik. Bu sonuç bize uzun süreli ve yüksek doz glukoz maruziyetinin vasküler direnci artırarak damar duvarındaki kalınlığın artışına katkısını göstermiş oldu.

Çalışmamız; MKH'lerin sayısal olarak değerlendirilmesi hem primer dokuda ilk kez yapılması hem de VK-PGDM'li grubun ilk kez kullanılması açısından önem arz etmektedir.

Flow-sitometri çalışmamızda GDM'li grupta MKH belirteçlerinde artışı ve VK-PGDM'li grup MKH belirteçlerinde azalmayı anlamlı olarak bulduk WJ-MKH belirteçlerindeki bu değişimleri immünohistokimyasal yöntemle de görsel olarak destekledik.

Çalışmamızı, diyabetin GDM'li ve VK-PGDM'li gruplarda WJ'ndeki MKH sayılarını direkt olarak taze dokudan, kültüre etmeden gerçekleştirdik.

Sonuçta diyabetin uzun dönem komplikasyonu olan vaskülopatinin, doku perfüzyonunu azaltması ile yüksek düzeyde hipoksi oranlarının tüm dokuları etkilediği gibi MKH sayıları üzerinde de azaltıcı etkisinin olduğunu gözlemledik.

Günümüzde kök hücre ile tedavi edilebilen hastalık çeşitliliğindeki artış bu hücrelerle yapılacak çalışmalar için umut vaad etmektedir. Bu kök hücre kaynaklarının; kolay ulaşılabilir, zengin ve kaliteli olmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Göbek kordonu da bu özellikleri ile önemli bir kaynaktır.

Bizim çalışmamızda her ne kadar GDM'li grup WJ-MKH'leri açısından zengin olarak bulunsa da literatürdeki kültür çalışmalarında bu gruptaki kök hücre kalitesinin düşük olduğu tespit edilmiştir. İlk pasajda artan kök hücre sayı ve kalitesi ilerleyen

pasajlamalarda azalınca, sayısal artışın yanı sıra kalitenin devamlılığı da önem kazanmıştır. Ayrıca GDM'li ve VK-PGDM'li gruplarda WJ'ndeki MKH leri sadece sayısal olarak değerlendirmenin, elde edilen kök hücre kalitesini yansıtamayacağı bilgisiyle, kalite değerlendirmesi için yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulacağı kanaatindeyiz.

VK-PGDM'li grupta ise WJ-MKH'lerini ilk kez primer dokuda ve flow-sitometrik incelemede sayıca azalmış olarak tespit ettik. Bu gruptaki kök hücrelerin kalite değerlendirilmesi için gerek kültür gerekse yapılacak olan diğer çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak diyabetin dokular ve kök hücreler üzerinde yıkıcı etkisinin azaltılması için tanı, takip ve tedaviye uyumun çok önemli olduğu anlaşılmaktadır. Bu bağlamda gebeliklerin planlı olması ve gebelik öncesi kontrollerin düzenli yapılarak, varsa diyabetin tespit ve tedavi edilmesi ile kan glukoz düzeylerinin regülasyonu ve hasta uyumunun önem arz ettiği kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Can, A., *Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide kullanımları*. 2014, Ankara.
2. Ferguson, V.L. and R.B. Dodson, *Bioengineering aspects of the umbilical cord*. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology, 2009. 144: p. S108-S113.
3. Liu, S., et al., *Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells*. Cellular immunology, 2012. 278 p. 35-44.
4. P De Miguel, M., et al., *Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications*. Current molecular medicine, 2012. 12 p. 574-591.
5. Guven, D., et al., *Histomorphometric changes in the placenta and umbilical cord during complications of pregnancy*. Biotech Histochem, 2018: p. 1-13.
6. White, P., *Classification of obstetric diabetes*. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 1978. 130 p. 228-230.
7. 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 p. 1434-1439.
8. Verma, R., S. Mishra, and J.M. Kaul, *Cellular changes in the placenta in pregnancies complicated with diabetes*. Int J Morphol, 2010. 28 p. 259-264.
9. Alam, M.R., et al., *Gross and Histomorphologic Study of the Umbilical Cord in Pre-gestational Diabetes Mellitus and Gestational Diabetes Mellitus*. Bangladesh Journal of Anatomy, 2015. 12 p. 25-29.

10. Wajid, N., et al., *The effect of gestational diabetes on proliferation capacity and viability of human umbilical cord-derived stromal cells*. Cell and tissue banking, 2015. 16: p. 389-397.
11. Kim, J., et al., *Umbilical cord mesenchymal stromal cells affected by gestational diabetes mellitus display premature aging and mitochondrial dysfunction*. Stem cells and development, 2014. 24 p. 575-586.
12. Weissman, I.L., D.J. Anderson, and F. Gage, *Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. 17: p. 387-403.
13. Aksu, S., et al., *Erifkinlerde Hematopoietik Kök Hücre Transplantasyonu: Hacettepe Hematoloji Deneyimi: 2001-2004*. Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi, 2005. 4 p. 175-183.
14. Yılmaz, A.F., et al., *Akut myelositer lösemi hastalarında konsolidasyon tedavisi olarak otolog hematopoetik kök hücre nakli uygulaması*. Ege Tıp Dergisi, 2016. 55 p. 1-5.
15. 23. *Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu; Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları*. 2-6.10.2017. Kocaeli Üniversitesi.
16. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. cell, 2006. 126 p. 663-676.
17. İskender, B., S. Şanlıoğlu, and H. Canatan, *İnsan embriyonik kök hücreleri ve mikroçevre*. Journal of Clinical and Experimental Investigations, 2014. 5.
18. Ateş, U., *Kök hücreyi tanıyalım*. İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi, 2016. 1 p. 19-28.
19. Zhang, B., et al., *Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells: identification, purification, and biological characteristics*. Stem cells international, 2016.

20. Yu, B., X. Zhang, and X. Li, *Exosomes derived from mesenchymal stem cells*. International journal of molecular sciences, 2014. 15 p. 4142-4157.
21. Fatehullah, A., S.H. Tan, and N. Barker, *Organoids as an in vitro model of human development and disease*. Nature cell biology, 2016. 18 p. 246.
22. Barbara Young, P.W., Geraldine O'Dowd, *Wheater's Functional Histology A text and colour atlas* 6. ed. 2013.
23. Şeftalioğlu, A., *Genel&Özel İnsan Embriyolojisi*. 3. ed. 1998.
24. Can, A. and S. Karahuseyinoglu, *Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells*. Stem cells, 2007. 25 p. 2886-2895.
25. Nanaev, A., et al., *Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord*. Placenta, 1997. 18 p. 53-64.
26. WilliamK. Ovalle and P.C. Nahirney, *Netter's Essential Histology*. 2008.
27. Kobayashi, K., T. Kubota, and T. Aso, *Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly: expression and localization of α -smooth muscle actin*. Early Human Development, 1998. 51 p. 223-233.
28. Bańkowski, E., et al., *Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly and their alterations in EPH-gestosis*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 1996. 66 p. 109-117.
29. Stehbens*, W.E., et al., *Histopathology and ultrastructure of human umbilical blood vessels*. Fetal and pediatric pathology, 2005. 24 p. 297-315.
30. Sadler, T.W., *LANGMAN Medikal Emriyoloji*. 2011. 50-51, 63-65.
31. Ami, M.B., Y. Perlitz, and M. Matilsky, *Prenatal sonographic diagnosis of persistent right umbilical vein with varix*. J Clin Ultrasound, 1999. 27 p. 273-5.

32. Moore, K.L., T.V.N. Persaud, and M.G. Torchia, *Klinik yönleri ile İnsan Embriyolojisi*, ed. p.D.H. Dalçık. 2016.
33. Sadler, T.V., *Langman Medikal Embriyoloji*. 2011.
34. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. 8 p. 315-317.
35. Fong, C.-Y., et al., *Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells*. Stem Cell Reviews and Reports, 2011. 7 p. 1-16.
36. Ding, D.-C., et al., *Human umbilical cord mesenchymal stem cells support nontumorigenic expansion of human embryonic stem cells*. Cell transplantation, 2012. 21 p. 1515-1527.
37. Nagamura-Inoue, T. and H. He, *Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility*. World journal of stem cells, 2014. 6 p. 195.
38. Karahuseyinoglu, S., et al., *Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys*. Stem cells, 2007. 25 p. 319-331.
39. Bongso, A., C.Y. Fong, and K. Gauthaman, *Taking stem cells to the clinic: major challenges*. Journal of cellular biochemistry, 2008. 105 p. 1352-1360.
40. Tamura, M., et al., *Wharton's jelly stem cells as agents for cancer therapy*. Open Tissue Eng Regen Med J, 2011. p. 39-47.
41. Ganta, C., et al., *Rat umbilical cord stem cells completely abolish rat mammary carcinomas with no evidence of metastasis or recurrence 100 days post-tumor cell inoculation*. Cancer research, 2009. 69 p. 1815-1820.
42. Matsuzuka, T., et al., *Human umbilical cord matrix-derived stem cells expressing interferon- β gene significantly attenuate bronchioloalveolar carcinoma xenografts in SCID mice*. Lung cancer, 2010. 70 p. 28-36.

43. Fong, C.-Y., et al., *Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells undergo enhanced chondrogenic differentiation when grown on nanofibrous scaffolds and in a sequential two-stage culture medium environment*. Stem Cell Reviews and Reports, 2012. 8 p. 195-209.
44. Liu, S., et al., *Repair of osteochondral defects using human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model*. BioMed Research International, 2017. 2017.
45. Hollweck, T., et al., *Cardiac differentiation of human Wharton's jelly stem cells-experimental comparison of protocols*. Open Tissue Eng Regen Med J, 2011. 4: p. 95-102.
46. Farias, V., et al., *Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties*. Placenta, 2011. 32 p. 86-95.
47. Ramanathan, R., et al., *Role of Human Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) for Rescue of D-Galactosamine Induced Acute Liver Injury in Mice*. Journal of clinical and experimental hepatology, 2017. 7 p. 205-214.
48. Tsai, P.C., et al., *The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis*. Liver transplantation, 2009. 15 p. 484-495.
49. Arno, A.I., et al., *Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling*. Stem cell research & therapy, 2014. 5 p. 28.
50. Azari, O., et al., *Effects of transplanted mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of caprine umbilical cord on cutaneous wound healing; histopathological evaluation*. Veterinary research communications, 2011. 35 p. 211-222.
51. Doi, H., et al., *Potency of umbilical cord blood-and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for scarless wound healing*. Scientific reports, 2016. p. 18844.

52. *Diabetes mellitus ve komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem kılavuzu*, in *Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği* 2017. p. 15.
53. Ahmed, A.M., *History of diabetes mellitus*. Saudi medical journal, 2002. 23 p. 373-378.
54. Köhl, C., *Glucose metabolism during and after pregnancy in normal and gestational diabetic women*. Acta endocrinologica, 1975. 79 p. 709-719.
55. Association, A.D., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes care, 2014. 37 p. S81-S90.
56. Gavin III, J.R., et al., *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes care, 1997. 20 p. 1183.
57. Association, A.D., *Standards of medical care in diabetes-2009*. Diabetes care, 2009. 32 p. S13.
58. Atasoy, A., et al., *Diyabetik nefropatiye genel bir bakış*. Haseki Tıp Bülteni, 2015. 53: p. 16-19.
59. Derel, D., E.Y. Özbal, and M. Akyurt, *Diyabetik Nefropati Etiyopatogenezine Güncel Bir Bakış*.
60. Kurt, M., A. Atmaca, and A. Gürlek, *Diyabetik nefropati*. Acta Medica, 2004. 35 p. 12-17.
61. *Diabetic Retinopathy*. 2018 [cited 2018 24.07]; Available from: <http://www.midatlanticretina.com/patient-education/diseases-of-the-retina/diabetic-retinopathy>.
62. Sibel, İ., *Diyabetik Retinopati ve Etiyopatogenezi*. Kocatepe Tıp Dergisi, 2014. 15.
63. Cumurcu, T., İ. Yılmaz, and M. Cavdar, *Diyabetik Retinopati*.

64. Ozmert, E., *Diabetik Retinopati ve Makülopatinin Tanımı ve Sınıflaması*.
65. Terzi, M. and N. Cengiz, *Diyabetik Nöropati*. Journal of Experimental and Clinical Medicine, 2009. 21.
66. Smith, A.G. and J.R. Singleton, *Diabetic neuropathy*. CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology, 2012. 18 p. 60-84.
67. Bayram, E. and K. Elçioğlu, *Diyabetik nöropatiye güncel tedavi yaklaşımları*. 2016.
68. Singh, R., L. Kishore, and N. Kaur, *Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions*. Pharmacological research, 2014. 80: p. 21-35.
69. Behse, F., F. Buchthal, and F. Carlsen, *Nerve biopsy and conduction studies in diabetic neuropathy*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 1977. 40 p. 1072-1082.
70. White, P., *Pregnancy complicating diabetes*. The American journal of medicine, 1949. 7 p. 609-616.
71. Florence M.Brown, A.B.G.Ç.A.Ç., *Diyabet ve Gebelik. Joslin's Diabetes Mellitus*. 2008: İstanbul Medikal Yayıncılık.
72. Hod, M. and Y. Yorgev, *Goals of Metabolic Management of Gestational Diabetes: Is it all about the sugar?* Diabetes care, 2007. 30 p. S180-S187.
73. Kautzky-Willer, A., et al., *Pronounced insulin resistance and inadequate β -cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy*. Diabetes care, 1997. 20 p. 1717-1723.
74. Ersanli, Z., *Gebelikte ve Diabette Metabolik Değişiklikler*. Perinatoloji Dergisi 1, 1993: p. 70-74.
75. Di Cianni, G., et al., *Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes*. Diabetes/metabolism research and reviews, 2003. 19 p. 259-270.

76. Ylinen, K., et al., *Risk of minor and major fetal malformations in diabetics with high haemoglobin A1c values in early pregnancy*. Br Med J (Clin Res Ed), 1984. 289 p. 345-346.
77. Schwartz, R. and K.A. Teramo. *Effects of diabetic pregnancy on the fetus and newborn*. in *Seminars in perinatology*. 2000. Elsevier.
78. Garcia-Patterson, A., et al., *In human gestational diabetes mellitus congenital malformations are related to pre-pregnancy body mass index and to severity of diabetes*. Diabetologia, 2004. 47 p. 509-514.
79. Haeri, S., et al., *The association of intrauterine growth abnormalities in women with type 1 diabetes mellitus complicated by vasculopathy*. American journal of obstetrics and gynecology, 2008. 199 p. 278. e1-278. e5.
80. Dunne, F.P., *Pregestational diabetes mellitus and pregnancy*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 1999. 10 p. 179-182.
81. Abu-Sulaiman, R. and B. Subaih, *Congenital heart disease in infants of diabetic mothers: echocardiographic study*. Pediatric cardiology, 2004. 25 p. 137-140.
82. Cordero, L., et al., *Management of infants of diabetic mothers*. Archives of pediatrics & adolescent medicine, 1998. 152 p. 249-254.
83. Arvas, A., *Diyabetik anne bebeği*. Perinatoloji Dergisi, 1993. 1.
84. arieh riskin, J.A.G. *Infant of a diabetic mother*. 2018 [cited 2018 26.11]; Available from: <https://www.uptodate.com/contents/infant-of-a-diabetic-mother>.
85. Bourbon, J.R. and P.M. Farrell, *Fetal lung development in the diabetic pregnancy*. Pediatric research, 1985. 19 p. 253-267.
86. Piazze, J.J., et al., *Fetal lung maturity in pregnancies complicated by insulin-dependent and gestational diabetes: a matched cohort study*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 1999. 83 p. 145-150.

87. Ekici, F., et al., *Diyabetik anne bebeklerinin kardiyovasküler sistem hastalıkları ve izlemi*. Gazi Medical Journal, 2010. 21.
88. Karagöl, B.S., et al., *Yenidoğan yoğun bakımında yedi yıllık diyabetik anne bebeği deneyimi*. Çocuk Dergisi, 2012. 12 p. 169-176.
89. Akarsu, S., et al., *Diyabetik anne bebeğinde klinik ve laboratuvar bulguları*. Fırat Tıp Dergisi, 2008. 13 p. 199-204.
90. Howarth, C., A. Gazis, and D. James, *Associations of Type 1 diabetes mellitus, maternal vascular disease and complications of pregnancy*. Diabetic Medicine, 2007. 24 p. 1229-1234.
91. Binbir, B., et al., *The role of umbilical cord thickness and HbA1c levels for the prediction of fetal macrosomia in patients with gestational diabetes mellitus*. Archives of gynecology and obstetrics, 2012. 285 p. 635-639.
92. Cromi, A., et al., *Large cross-sectional area of the umbilical cord as a predictor of fetal macrosomia*. Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, 2007. 30 p. 861-866.
93. Alam, M.R., et al., *Gross and Histomorphologic Study of the Umbilical Cord in Pre-gestational Diabetes Mellitus and Gestational Diabetes Mellitus*. Bangladesh Journal of Anatomy, 2014. 12 p. 25-29.
94. Dilbaz, S., et al., *Diabetik Gebeliklerde Diabet Tipinin Doğum Şekline, Doğum Ağırlığına Ve Apgar Skoruna Etkisi*. Editörler Kurulu.
95. Evers, I.M., H.W. de Valk, and G.H. Visser, *Risk of complications of pregnancy in women with type 1 diabetes: nationwide prospective study in the Netherlands*. Bmj, 2004. 328 p. 915.
96. Jensen, D.M., et al., *Outcomes in type 1 diabetic pregnancies: a nationwide, population-based study*. Diabetes care, 2004. 27 p. 2819-2823.
97. Saraç, E.G., *Annelerinde Gestasyonel Diyabet Tanısı Olan Yenidoğanların Değerlendirilmeleri*. 2015, Abant İzzet Baysal Üniversitesi.

98. Taricco, E., et al., *Foetal and placental weights in relation to maternal characteristics in gestational diabetes*. Placenta, 2003. 24 p. 343-347.
99. Daskalakis, G., et al., *Placental pathology in women with gestational diabetes*. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica, 2008. 87 p. 403-407.
100. Kaya, S., *Gestasyonel diyabet, preeklampsi, hellp sendromu ve normal gebelerde göbek kordonu histopatolojik değişiklikleri*. 2015.
101. Al-Kazzaz, M.M. and A.-J.Y. Al-Hubaity, *Ultrastructural Vascular Changes Of The Human Umbilical Cord Of New-Born Babies From Diabetic Mothers*. Iraqi Journal Of Medical Sciences, 2000: p. 37.
102. Blanco, M.V., et al., *Histopathology and histomorphometry of umbilical cord blood vessels. Findings in normal and high risk pregnancies*. Artery Research, 2011. 5 p. 50-57.
103. Pierdomenico, L., et al., *Diabetes mellitus during pregnancy interferes with the biological characteristics of Wharton's jelly mesenchymal stem cells*. The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal, 2011. 4.
104. Montanucci, P., et al., *Functional Profiles of Human Umbilical Cord-Derived Adult Mesenchymal Stem Cells in Obese/Diabetic Versus Healthy Women*. Current diabetes reviews, 2018. 14 p. 24-35.