

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Esra GÖKMEN tarafından hazırlanan “Diyabetik Gebe Farelerin Plasentalarında ve Fetuslarında Endoplazmik Retikulum Stres Belirteçlerinin Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/02/2016

Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Kemal ERGİN Adnan Menderes Üniversitesi
Üye : Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN Adnan Menderes Üniversitesi
Üye : Doç. Dr. Meltem KURUŞ İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecinde, bilgisi ve deneyimleriyle her zaman yol gösteren ve destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Kemal ERGİN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince bana anlayış gösteren ve destek olan, başta Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN olmak üzere tüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tez çalışmamda deney süreci boyunca, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Selen Kum, Merve Şehne, Gözde Alkan ve Gülfem Ersoy'a,

Aldığım her kararda ve attığım her adımda bütün varlıkları ile bana destek olan, yoğun çalışma tempomda beni hep kolaylayan ve bana iyi gelen canım anneme, babama ve ağabeyime tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Endoplazmik retikulum ve Endoplazmik Retikulum Stres.....	2
2.1.1. Katlanmamış Protein Cevabı.....	2
2.1.2. ER Stres ve Hücre Ölümü İlişkisi.....	4
2.1.3. ER stres ve hastalıklar.....	7
2.2. Diabetes Mellitus.....	8
2.2.1. DM ve ER stres.....	9
2.3. Karaciğer Histolojisi ve Gelişimi.....	10
2.4. Plasenta.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı.....	14
3.2. Deney Gruplarının Planlanması	14
3.3. Tip I Diyabet Oluşturma.....	15
3.3.1. Kan Şekeri Ölçümü	15
3.4. Deneyin Sonlandırılması.....	15

3.5. Fetus ve Plasenta Ağırlıklarının Ölçümü	15
3.6. İmmunohistokimyasal İnceleme.....	16
3.7. Western Blot.....	16
3.7.1. Lizat Hazırlama.....	16
3.7.2. Protein Miktarının Belirlenmesi ve Standardizasyonu.....	17
3.7.3. SDS-PAGE Western Blot Protokol.....	17
3.8. İstatistiksel Analiz.....	18
3.8.1. Şeker Değerleri.....	18
3.8.2. Plasenta-Embriyo Ağırlıkları.....	18
3.8.3. İmmunohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları.....	18
4. BULGULAR.....	19
4.1. Gruplar Arası Kan Şekeri Değerleri.....	19
4.2. Gruplar Arası Fetus ve Plasenta Ağırlıkları.....	19
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	20
4.4. Western Blot Bulguları.....	21
4.4.1. BIP Ekspresyonu.....	21
4.4.2. Herpud Ekspresyonu.....	22
4.4.3. XBP1 Ekspresyonu.....	22
5. TARTIŞMA.....	23
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	26
KAYNAKLAR.....	27
ÖZGEÇMİŞ.....	32

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AMPK	: AMP-aktive protein kinaz
Apaf1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ASK1	: Apoptoz sinyal-regüle edici kinaz 1
ATF4	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (Activating transcription factor 4)
ATF6	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (Activating transcription factor 6)
Bcl2	: B-cell lymphoma 2
CaMKK β	: Ca ²⁺ /kalmodulin-bağımlı kinaz kinaz β
CHOP	: C/EBP homolog proteini
DAPK	: Ölüm ilişkili protein kinaz 1 (Death associated protein kinase 1)
DM	: Diabetes mellitus
Dpc	: Days post coitum
DR5	: Ölüm reseptörü 5 (Death receptor 5)
eIF2 α	: Ökaryotik inisiasyon faktörü 2 alfa (eukaryotic initiation factor 2 alpha)
ER	: Endoplazmik retikulum
ERAD	: ER-ilişkili yıkım (ER-associated degradation)
GADD34	: Büyüme aresti ve DNA hasarı uyarılabilen protein 34 (Growth arrest and DNA damage inducible protein 34)
GRP78	: Glukoz ile regüle protein 78 kDA (Glucose-regulated protein of molecular weight 78)
M	: Molar
mM	: milimolar
mTORC1	: Mammalian target of rapamycin complex 1
IP3	: Inositol 1,4,5-trisfosfat
IP3R	: Inositol 1,4,5-trisfosfat reseptör
IRE1	: İnositol-gerektiren enzim-1 (Inositol-requiring enzyme-1)

JNK	: Jun N-terminal kinaz
Kc	: Karaciğer
PERK	: Protein ER kinaz (PKR)-benzeri endoplazmik retikulum kinaz
PKC θ	: Protein kinaz C-teta
PPI	: Protein fosfataz tip 1
STZ	: Streptozotosin
sXBP1	: Splays X-box bağlanma proteini 1
TRAF 2	: TNF reseptör ilişkili faktör-2
TRB3	: Tribbles homologue 3
UPR	: Katlanmamış protein cevabı (Unfolded protein response)
XBP1	: X-box bağlanma proteini 1 (X-box binding protein 1)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Katlanmamış protein cevabı	4
Şekil 2. ER stres ve apoptoz	6
Şekil 3. ER stres ve otofaji	7
Şekil 4. Karaciğerin ışık mikroskobu altındaki görünümü.....	10
Şekil 5. Villüs organizasyonunda göre plasenta tipleri.....	12
Şekil 6. Fare plasentası genel görünüm.....	13

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Grup1 kc ve Grup 3 anne kc'nin Nrf2 antikoru ile boyanması.....	21
Resim 2. Plasenta dokularında BIP ekspresyonu.....	21
Resim 3. Plasenta dokularında Herpud ekspresyonu.....	22
Resim 4. Plasenta dokularında XBP1 ekspresyonu	22

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Gruların sakrifikasyon öncesi Şeker ölçüm sonuçları	19
Tablo 2. Gruların Fetus ve Plasenta Ağırlık Ortalamaları	20
Tablo 3. Gruların immunohistokimyasal skörlama sonuçları	20

ÖZET

DİYABETİK GEBE FARELERİN PLASENTALARINDA VE FETUSLARINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES BELİRTEÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI

GÖKMEN E. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2016.

Tez çalışmamda, diyabet durumunun fetal karaciğer ve plasentalarda ER stres belirteçleri açısından bir fark oluşturup oluşturmadığının tespit edilmesi amaçlandı. Bu amaç ile, dört gruptan oluşan bir deney dizaynı oluşturuldu. Bu gruplar; sıfır kontrol grubu, gebe kontrol grubu, diyabetik gebe grubu ve gebe sitrat grubudur. Belirteçlerin araştırılması için immünohisto kimyasal tekniklerin yanı sıra western blot tekniği de kullanılmıştır. Yapılan deneylerin sonuçlarına göre, diyabetik grubun fetal karaciğer dokularında, diğer gruplara kıyasla incelemiş olduğumuz Nrf2, GADD 153, BIP, Xbp1 ve Herpud antikoru açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Plaseenta dokularında; BIP, Xbp1 ve Herpud antikoru ile yapılan western blot sonuçlarına göre ise, diyabet grubundaki plasentaların bu belirteçler açısından diğer gruplara kıyasla azalma gösterdiğini saptadık. Gruplar arasında fetus ve plaseenta ağırlıklarını kıyasladığımız zaman ise, diyabet grubundaki fetus ve plasentalarda diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptanmıştır ($p<0.05$).

Anahtar Kelimeler: ER stres, diabetes mellitus, fetus, plaseenta.

ABSTRACT

INVESTIGATION of THE ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS MARKERS IN PLACENTAS and FETUS of DIABETIC PREGNANT MICE

GÖKMEN E. Adnan Menderes University Health Sciences Institute Histology and Embryology M.Sc. Thesis, Aydin, 2016.

In my thesis study, it was aimed to find out if diabetes cause differences in fetal liver and placenta about ER stress markers. For this purpose, experimental design is created which consist of four groups. These groups are; zero control group, pregnant control group, diabetic pregnant group and pregnant citrate group. As investigate the markers, both immunohistochemical techniques and western blot technique were used. According to the results of experimental studies, no statistically significant difference was found ($p>0.05$) for the markers that we use; Nrf2, GADD 153, BIP, Xbp1 and Herpud, in fetal liver tissue of the diabetic group compared to the other groups. As a result of western blot done with BIP, Xbp1 and Herpud antibodies in placenta, decreased expression of these markers was seen in diabetic group compared to the other groups. When we compared the weight of the fetus and placenta between groups, we have found statistically significant decreased weight in diabetic group compared to the other groups ($p<0.05$).

Key words: ER stress, diabetes, fetus, placenta.