



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ - EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
THE-2016-0001

DİYABETİK GEBE FARELERİN PLASENTALARINDA VE
FETUSLARINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES
BELİRTEÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ESRA GÖKMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kemal ERGİN

AYDIN-2016

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**DİYABETİK GEBE FARELERİN PLASENTALARINDA VE
FETUSLARINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES
BELİRTEÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**ESRA GÖKMEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Kemal ERGİN**

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Koordinatörlüğü tarafından
12029 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2016

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 eğitimin 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. Immunohistokimyasal 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. Grupların sakrifikasyon öncesi şeker ölçüm sonuçları	19
Tablo 2. Grupların Fetus ve Plasenta Ağırlık Ortalamaları	20
Tablo 3. Grupların immunohistokimyasal skorlama 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 ($p>0.05$). Placenta 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 placenta 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, placenta.

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.

1. GİRİŞ

Diyabet günümüzde oldukça yaygın bir hal almaya başlamış bir hastalıktır. Moleküler mekanizmalarına bakıldığı zaman pek çok faktör görülmektedir. Bunlardan bir tanesi de ER stresidir. ER stres, pek çok patolojik durum ile ortaya çıkabilmektedir. Temel olarak bakıldığı zaman ER stresin oluşumuna sebep olan faktör, katlanmamış veya hatalı katlanmış olan proteinlerin ER lümeninde birikmesidir. Bu durum ile baş etmeye çalışan hücre pek çok yol deneyerek stresi ortadan kaldırmayı hedefler. Bunlar arasında, protein katlanmasını artırmak için şaperonların sentezi, protein translasyonunun durdurulması, katlanmamış veya hatalı katlanmış olan proteinlerin yıkımı yer almaktadır. Eğer hücre tüm bu çabalarına rağmen ER stres durumunu ortadan kaldıramıyorsa, hücre ölümü mekanizması çalışmaya başlar ve hücre ölümü gerçekleşir. ER stres ile diyabet arasında bir nevi kısır döngü olduğunu söylemek mümkündür. ER stres diyabeti tetikleyebileceği gibi, diyabette ER stresi tetikleyebilir.

Literatüre bakıldığı zaman plasenta yapı ve histolojisine dair pek çok bilgi olmakla birlikte, hastalık surumlarında plasentadaki morfolojik ve fonksiyonel değişimlerin incelenmesi ve moleküler yolların aydınlatılması ile ilgili sınırlı sayıda kaynak bulunmaktadır.

Bu tez çalışması ile, diyabetik annelerin plasentalarında ve fetuslarında meydana gelen morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerin ER stres ile bağlantısının olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endoplazmik Retikulum ve Endoplazmik Retikulum Stres

Endoplazmik retikulum (ER), ökaryotlarda protein katlanmasının düzenlendiği önemli bir organeldir. Protein sentezi, translasyon sonrası modifikasyonlar ve proteinlerin şaperonlar aracılığı ile doğru bir şekilde katlanması bu organelde gerçekleşmektedir (Schröder ve Kaufman, 2005). Bu görevlerinin yanı sıra lipid ve kolesterol biyosentezinde de görev almaktadır ve Ca^{+2} deposu olarak hizmet etmektedir (Schuldiner ve Weissman, 2013).

Salgı yollarına aktarılacak olan proteinler ER lümenine transfer edilerek burada katlanırlar. Protein sentezinin memeli organizmalardaki genel yoğunluğu göz önüne alındığında, ER'nin protein trafiğindeki ve işlenmesindeki rolünün son derece önemli olduğu ortaya çıkmaktadır (Kincaid ve Cooper, 2007). Doğru bir şekilde katlanmış olan proteinler Golgi aygıtına aktarılırken hatalı katlanmış veya katlanmamış proteinler ER lümeninde kalırlar (van der Kallen ve ark, 2009). Hatalı katlanmış veya katlanmamış olan proteinler, ER içinde bulunan ERAD (ER-associated degradation) kontrol sistemi ile yıkıma uğratarak, bu proteinlerin ER içindeki birikimi önlenmeye çalışılır (Kincaid ve Cooper, 2007).

ER lümende katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin birikimi sonucu ER stres olarak adlandırılan bir durum meydana gelir. Genel protein sentezindeki artış, hatalı katlanmış olan proteinlerin ekspresyonlarındaki artış, protein katlanmasından sorumlu olan şaperonlarda meydana gelen mutasyonlar, besinsel stres, hipoksi, Ca^{+2} homeostazisindeki anormal değişimler, diyabet ve viral enfeksiyonlar ER'de protein birikimine neden olabilecek olan etmenler arasındadır (Kincaid ve Cooper, 2007). Bu durumlar katlanmamış protein cevabının (UPR) uyarılmasını tetikler.

2.1.1. Katlanmamış Protein Cevabı

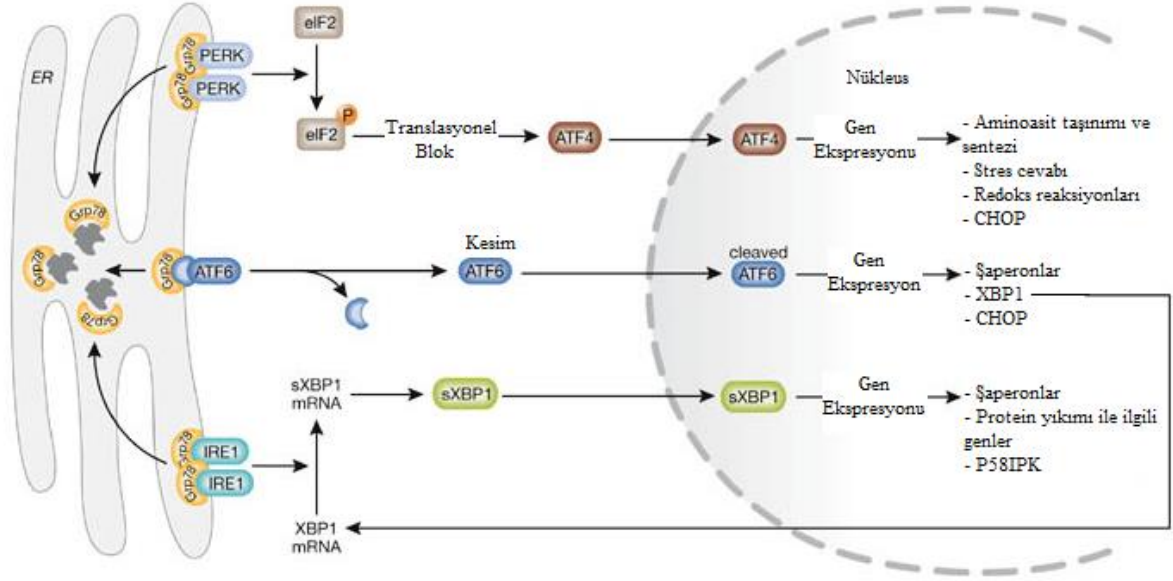
UPR, ER fonksiyonundaki homeostazinin yeniden sağlanması için gerekli olan ve evrimsel süreçte korunmuş olan önemli bir sinyal mekanizmasıdır. UPR'nin uyarılması sonucunda, stres adaptasyonu başarılarak, hücre normal sürecine geri dönebileceği gibi; stres

baş edilebilecek düzeyden daha fazla ise hücre ölümü gerçekleşecektir (van der Kallen ve ark, 2009).

UPR mekanizması hücre içerisinde temel olarak üç yoldan ilerleyebilir: Bunlar; 1. PERK (protein ER kinase (PKR) -like endoplasmic reticulum kinase), 2. IRE1 (inositol-requiring enzyme-1) ve 3. ATF6 (activating transcription factor 6) adı verilen, ER membranında yerleşik olan üç transmembran protein üzerinden ilerleyen yolaklardır. PERK ve IRE1, tip I ER transmembran kinaz iken ATF6, tip II ER transmembran transkripsiyon faktörüdür. Eğer hücre, ER stres şartları altında değil ise, GRP78 (glucose-regulated protein) adı verilen şaperon, PERK, IRE1 ve ATF6 transmembran proteinlerine bağlanarak aktivitelerini inhibe eder (Osowski ve Urano, 2011).

Hatalı katlanmış veya katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikmeye başlaması ile GRP78 şaperonu, PERK, IRE1 ve ATF6'dan ayrılır. Ardından PERK ve IRE1 homodimerize olur ve otofosforilasyon geçirerek aktive olurlar. ATF6 ise Golgi aygıtına aktarılır ve proteolitik kesimi gerçekleştirilir. Böylece UPR sinyal yolağında görevli olan başlangıç bileşenlerinin aktivasyonu gerçekleşmiş olur (Schontal, 2012b).

PERK aktive olduktan sonra, sahip olduğu kinaz aktivitesi ile eIF2 α ' yı (eukaryotic initiation factor 2 alpha) fosforile eder. eIF2 α 'nın fosforilasyonu ile genel translasyon, başlık-bağımlı, durdurulmuş olur. Bu aşamadan itibaren sadece ATF4 (activating transcription factor 4) gibi belirli genlerin ifadenmesi söz konusudur (Harding ve ark, 2002). IRE1'in, hem serin-treonin kinaz, hem de endoribonükleaz aktivitesi vardır. Aktive olması durumunda; XBP1 (X-box binding protein 1) mRNA'sı splay edilir. Böylece aktif XBP1 transkripsiyon faktörünü kodlayan sXBP1 elde edilmiş olur (Haze ve ark, 1999; Schontal, 2012). Diğer transmembran protein olan ATF6 ise, lösin fermuarlı transkripsiyon faktörüdür. ER stresin tetiklenmesi sonucunda, Golgi aygıtına aktarılarak proteolitik kesim geçirir ve böylece aktive olur (Engin ve Hotamisligil, 2010). Aktive olan ATF6, nükleusa aktarılır ve alt yolaklarında bulunan genlerin aktivasyonunu sağlar (Haze ve ark, 1999). Bu üç yolağın aktivasyonu sonucu ortaya çıkan ATF4, sXBP1 ve ATF6 transkripsiyon faktörleri nükleusa transfer edilir ve ER stres ile başa çıkmak için gerekli olan pek çok gen ekspresyonu indüklenir (Schontal, 2012b) (Şekil 2.1).



Şekil 1. Katlanmamış protein cevabı (Szegezdi ve ark, 2006).

2.1.2. ER Stres ve Hücre Ölümü İlişkisi

Hatalı katlanmış veya katlanamamış olan proteinlerin birikimi nedeniyle ortaya çıkan ER stresinin üstesinden gelmek için UPR yolağı aktive edilmektedir. Ancak, eğer ER stres şiddetli ise ve uzun sürüyorsa, UPR'nin aktivasyonu ER stres ile baş etmek ve normal hücre fonksiyonunu yenilemek için yetersiz kalır. Bu durumda ise, ER stres hücre ölümüne yol açar (Rasheva ve Domingos, 2009). Bu hücre ölümü mekanizması apoptoz veya otofaji olabilir.

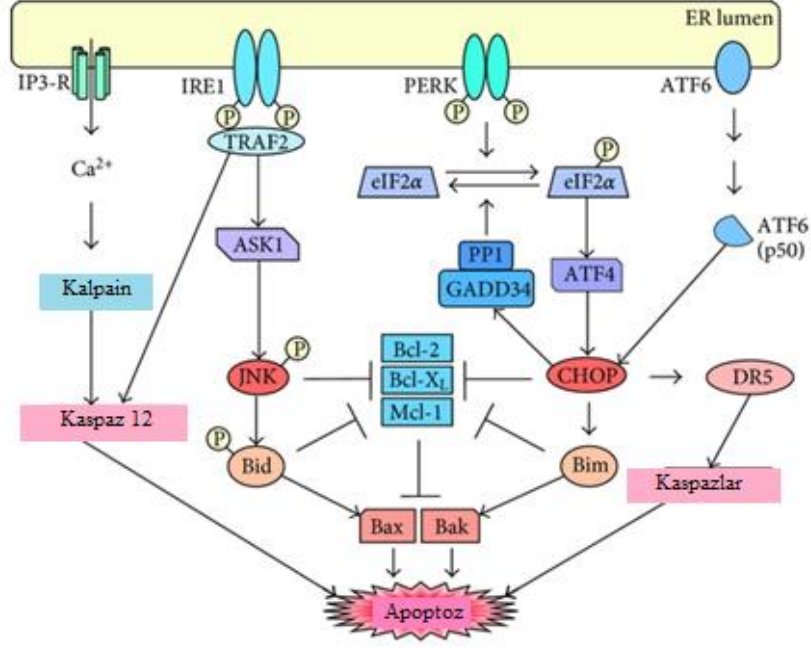
Apoptozda iki yolak bulunur: dış yolak veya ölüm reseptörleri yolağı ve iç yolak veya mitokondrial yolak (van der Kallen ve ark, 2009). Dış yolak hücre yüzey reseptörlerinin bireysel etkileşimleri, kaspazların çağırılması ve kaspaz yolağının aktive edilmesi ile tetiklenir. İç yolak ise proapoptotik BH3-only proteinler, Bad, Bax ve Bak, ile antiapoptotik proteinler, Bcl2 (B-cell lymphoma 2), arasındaki denge ile kontrol edilir. Bax ve Bak mitokondri membranı üzerinde membran geçirgenliğini değiştirerek sitokrom c'nin mitokondriden salınmasını sağlar. Bu durum Apaf1 (Apoptotic protease activating factor-1) ve prokaspaz 9 arasında kompleks oluşturulmasını kolaylaştırır. Böylece yolda bulunan kaspazların aktivasyonunu sağlayan süreç başlamış olur (Rutkowski ve Kaufman, 2004).

ER stres sonucu tetiklenmiş olan apoptoz, doğrudan ER membranında yerleşik olan transmembran ER stres sensörleri tarafından değil, bunlar tarafından aktive edilmiş alt bileşenlerce uyarılır, örn: CHOP (C/EBP homologous protein), JNK (Jun N-terminal kinase) (van der Kallen ve ark, 2009). ER stres tarafından uyarılmış apoptoz için üç temel yolak aydınlatılmıştır. Bunlardan biri; PERK/eIF2 α tarafından uyarılan ATF4 aracılığı ile aktive edilen CHOP/GADD153 kompleksini içeren yolak, diğeri IRE1 aracılığıyla aktive edilen ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) / JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) yolağı, sonuncusu ise ER'da lokalize olan sistein proteaz olan kaspaz 12'nin aktivasyonudur (Szegezdi ve ark, 2006; Kim ve ark, 2008).

PERK/eIF2 α yolağında, eIF2 α ' nin fosforilasyonu ile genel translasyon durmuş olsa da ATF4 translasyonu devam eder. ATF4, CHOP' u aktive eder. Aynı zamanda ATF6' da CHOP ekspresyonunu uyarabilir (Schonthal, 2012a). CHOP, GADD34 (growth arrest and DNA damage inducible protein 34) ekspresyonunu indükler. GADD34, PPI (protein phosphatase type 1) ile etkileşim kurarak eIF2 α ' nin defosforilasyonunu sağlar. Böylece genel translasyon yeniden aktive edilmiş olur (Novoa, 2001). Ayrıca CHOP, Bcl2 ailesine ait antiapoptotik proteinleri inhibe ederken, proapoptotik proteinlerin uyarılmasını sağlar (McCullough ve ark, 2001; Puthalakath ve ark, 2007). CHOP'un diğeri bir görevi ise hücre yüzey ölüm reseptörü DR5 (death receptor 5)'in ekspresyonunun uyarılmasıdır. DR5, hücrenin pro-apoptotik uyarıya hassas hale gelmesini sağlar. Bunu, kaspaz 12'yi içeren dış apoptotik yolağın üzerine etkileyerek yaptığı düşünülmektedir (Yamaguchi ve Wang, 2004).

IRE1 yolağında ise; IRE1, TRAF 2 (TNF receptor associated factor-2) ile etkileşime geçer. Ardından aktive olan TRAF2, ASK1' i aktive eder. ASK1 aktive olduktan sonra JNK'yı fosforilleyerek aktive eder. Aktive olan JNK proapoptotik BH3-only proteinleri fosforilleyerek aktive eder ve antiapoptotik Bcl2 ailesi üyelerinden bazılarını inaktive eder. Bu durumu apoptoz izler. TRAF2' nin IRE1 ile etkileşimi, ayrıca kaspaz 12' nin aktivasyonunu da sağlar (Schonthal, 2012a).

Üçüncü yol ise, ER lümeninden IP3 (Inositol 1,4,5-trisphosphate) reseptörleri aracılığı ile kalsiyum salınımının olması ve böylece kalpain aktivasyonunun gerçekleşmesi ve sonuç olarak da kaspaz 12'nin aktivasyonunun gerçekleşmesidir (Orrenius ve ark, 2003). Her üç yolağın sonucunda kaspaz yolağı aktive edilmiş olur (Şekil 2.2).

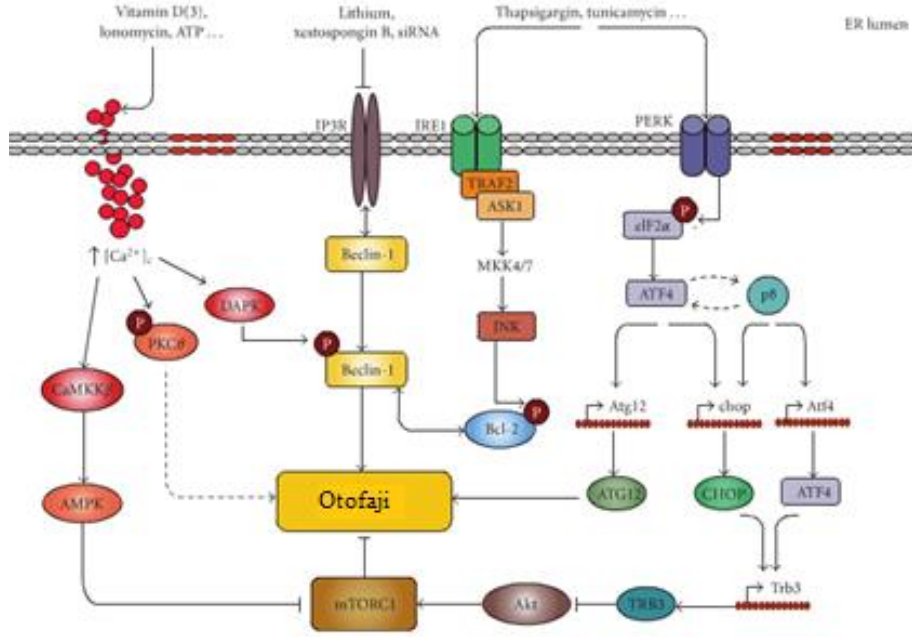


Şekil 2. ER stres ve apoptoz (Schonthal, 2012a).

Hücrelerde, ER stres ile baş edilemediği durumlarda makrotofajinin indüklendiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Ogata ve ark, 2006; Sakaki ve Kaufmann, 2008). Bu süreç için, eIF2α'nın fosforilasyonu önemli rol oynar. eIF2α fosforilasyonunun ardından eksprese olan ATF4, otofajide izolasyon membranının uzama aşaması için gerekli olan Atg12'nin ekspresyonunu sağlar (Kouroku, 2007). Ayrıca ATF4 ve stres ile regüle olan protein p8, TRB3 (Tribbles homologue 3) pseudokinazı regülasyonu artırılmasını uyarır. TRB3, Akt/mTORC1 yolunu inhibe ederek, otofajinin uyarılmasını sağlamaktadır. Bunun dışında IRE1 ile otofajinin indüklendiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. ER stres durumunda; IRE1, TRAF2 ve ASK1'in aktivasyonunu sağlar. Ardından ASK1 ile JNK aktive edilir. JNK aktivasyonu ile Bcl2'nin fosforilasyonu artar (Verfaillie, 2010). Otofajinin, normal şartlarda düşük seviyede tutulmasını sağlayan bir etkileşim Beclin1 ve Bcl2 arasında gerçekleşir. Bcl2, Beclin1'e bağlanarak onun nükleasyon aşamasına katılmasını önler. Böylece otofaji baskılanmış olur. Bcl2'nin JNK tarafından fosforillenmesi ile Bcl2, Beclin1'den ayrılır ve otofaji indüklenmiş olur (Pyo, 2012).

ER stres kaynaklı otofaji indüklenmesinde görevli diğer mekanizma ise ER lümeninden kalsiyum salınımıdır. Bu duruma dair üç yolak tanımlanmıştır. Bunlardan bir

tanesinde; CaMKK β (Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase β), AMPK 'y1 (AMP-activated protein kinase) fosforiller ve aktive eder. AMPK' da mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) inhibisyonunu sağlar. Böylece otofaji indüklenmiş olur. Diğerinde ise kalsiyum salınımına bağlı olarak DAPK (death associated protein kinase 1) aktive olur ve aktivasyonun ardından DAPK, Beclin1'i fosforilleyerek Bcl2 den ayrılmasını sağlar. Üçüncü yolakta ise PKC θ (Protein kinase C-theta)'nın aktivasyonu ile otofajinin indüklenebileceği düşünülmektedir. Beclin1 , Bcl2 etkileşiminin bozulması ile, otofajinin indüklenmesi için diğer bir yol ise ER membranında bulunan, IP3R (inositol 1,4,5-triphosphate receptor) aracılığı ile olur. IP3R, Beclin 1 ile etkileşime geçebilir (Choe ve Ehrlich, 2006). Farmakolojik olarak IP3R inhibe edildiğinde, Beclin1'den ayrılır. Bu durum otofajinin gerçekleşmesini sağlar (Sarkar, 2005) (Şekil 2.3).



Şekil 3. ER stres ve otofaji (Verfaillie ve ark, 2010).

2.1.3. ER Stres ve Hastalıklar

Katlanmamış veya hatalı katlanmış olan proteinler, ER lümeninde veya sitozolde agregatlar oluşturur. Bu kümelenmeler hücre için oldukça toksiktir (Bence, 2001). Hatalı katlanmış olan proteinler nedeniyle ortaya çıkan hastalıklara, 'konformasyonel hastalıklar'

yada ‘katlanma hastalıkları’ denir. Sonuç olarak ER stres ile, Alzheimer ve Parkinson gibi pek çok nörodejeneratif hastalıklar, bipolar bozukluklar, inflamasyon, iskemi, diyabet, kardiyovasküler rahatsızlıklar, kanser, karaciğer ve böbrek hastalıkları arasında yakın bağlantılar bulunmuştur (Yoshida, 2007).

2.2. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM), hiperglisemi ile karakterize olan ve insülin etkisinin/salgılanmasının bozulması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır (Araki ve ark, 2003). Diyabet, pek çok ağır akut ve kronik komplikasyonları olan nedeniyle morbiditesi ve mortalitesi yüksek olan ve dünya çapında giderek büyüyen bir görülme sıklığına sahip metabolik hastalıktır. DM’nin üç ana tipi bulunmaktadır. Bunlardan ilki, Tip I diyabet (insülin-bağımlı diyabet), pankreatik β hücrelerinin harabiyeti ve insülin üretimindeki başarısızlık ile karakterizedir ve bu harabiyet immün sistem aracılıklı ortaya çıkmaktadır (Dahlquist, 1998). DM’nin ikinci tipi; Tip II diyabet (insülin-bağımlı olmayan diyabet) ise hiperglisemi, insülin direnci ve β -hücre disfonksiyonu ile karakterizedir (Unger, 2013). DM’nin üçüncü tipi ise; gestasyonel diyabettir. Gestasyonel diyabet, gebelik sırasında ortaya çıkan yüksek glikoz seviyesi ile karakterize DM türüdür. Doğum sonrasında glikoz intoleransı normale dönebileceği gibi, Tip II DM gelişimine de neden olabilmektedir. (American Diabetes Association, 2009).

Gebelik sırasındaki diyabet; klinik diyabet (daha önce Tip I veya Tip II diyabet için tedavi görmüş) ve gestasyonel diyabet olarak ikiye ayrılır. Gebe kadınlarda diyabet, anne ve yeni doğana ilişkin artmış morbidite riski ile ilişkilidir. (Forsbach-Sanchez ve ark, 2005). Güncel tedavilere rağmen, Tip I veya Tip II diyabete sahip olan gebe bir kadın; artmış oranda düşük veya ölüm doğum yapma, kongenital malformasyon, plasental anomali ve hatalı intrauterin programlama riski taşımaktadır (Simeoni ve Barker, 2009; Weindling, 2009). Eğer gebe kalacak olan kişinin, gebelik öncesi tedavi edilemeyen diyabeti yoksa, gestasyon sırasında ortaya çıkan gestasyonel diyabet, organ oluşumu sürecinden sonra uyarıldığı için, erken embriyo defektleri veya kongenital malformasyon açısından bir risk oluşturmaz. Fakat, gestasyonel diyabet ile indüklenmiş olan, yavrunun ileriki yaşlarındaki hastalıkların fetoplasental bozuklukları ve intrauterin programlaması, Tip I ve Tip II diyabet tarafından indüklenen ile benzerdir. Yapılan çalışmalar kadınların Tip I diyabete erkeklerden daha yatkın

olduğunu ve gebe kadınların %5'inin diyabete sahip olduğunu göstermiştir (Reece ve ark, 2009).

2.2.1. DM ve ER stres

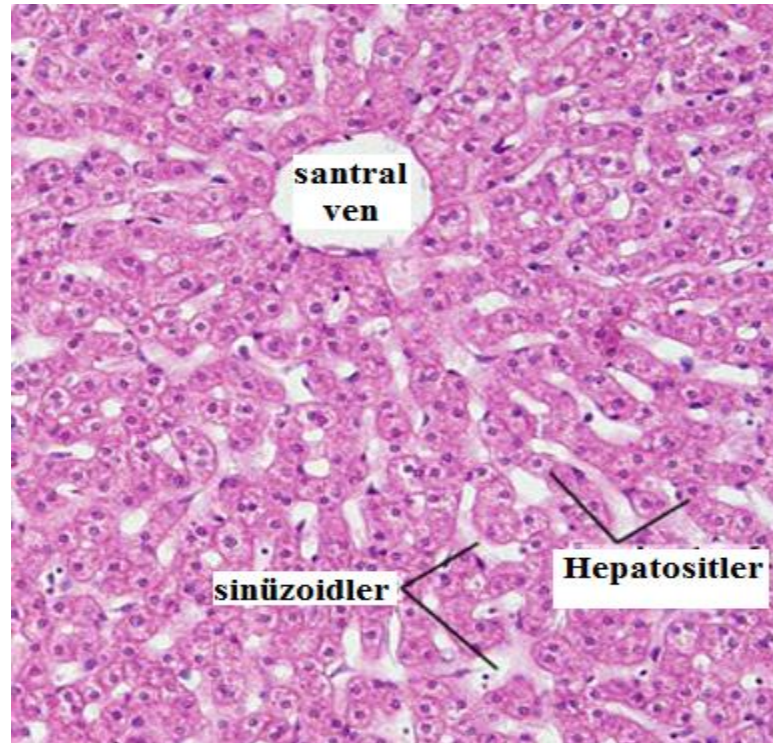
Pankreas hem endokrin hem de ekzokrin salgı yapabilen bir organdır. Pankreatik β hücreleri, yoğun salgılama fonksiyonundan dolayı iyi gelişmiş ER'a sahiptir (Oyadomari ve ark, 2002). Bu nedenle de ER stres tarafından uyarılmış apoptoza karşı daha hassas oldukları düşünülmüştür (Harding ve ark, 2001). Diyabet türlerinde, apoptozun; β hücre kaybı için temel mekanizma olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar ile ER stresin β hücre kaybına ve insülin direncine neden olması sonucu, diyabet oluşumuna katkısı gösterilmiştir (van der Kallen ve ark, 2009).

Er stres, hem Tip I hem de Tip II DM için patojenik bir mekanizma teşkil eder. β hücrelerinin farklılanması ve adacık yapısının gelişimi için PERK ekspresyonu gerekmektedir (Zhang ve ark, 2006). Ayrıca, embriyogenezde PERK yoksunluğu, kalıcı neonatal diabetes mellitus oluşumuna, ekzokrin pankreatik atrofisine ve insülin salgılamada düşüşe neden olur. Yetişkin farelere baktığımız zaman ise, PERK fonksiyonu, pankreasta salgılama homeostasisi ve hücrelerin hayatta kalması için önem teşkil eder (Gao ve ark 2012). Ayrıca Gupta ve ark (2009) PERK'in β hücresi insülinomasının gelişimine sebep olduğu da gösterilmiştir. β hücrelerinin salgılama fonksiyonu ve kapasitesi göz önüne alındığında, farelerdeki PERK yoksunluğunun, yaş ilerledikçe; diyabet yatkınlığına, β hücrelerinin apoptozisine ve hiperglisemiye neden oluşunu anlamak zor değildir (Harding ve ark, 2001). Ayrıca bebeklik çağındaki DM ile ilişkili PERK genindeki mutasyon, Wolcott-Rallison sendromu adı verilen ve β hücre kaybı ile karakterize otozomal resesif hastalıkta tanımlanmıştır (Araki ve ark, 2003). PERK noksan farelerin, pankreas langerhans adacıklarına elektron mikroskop ile bakıldığında, β hücrelerinin ER'lerinin genişlediği, sekretör granüllerin büyüklüğünde ve sayısında azalma olduğu görülmüştür (Wang ve ark, 1999). Aynı zamanda, eIF2- α fosforilasyon bölgesindeki mutasyonların da β hücrelerinin ER strese daha duyarlı olmalarına neden olduğu gösterilmiştir (Scheuner ve ark, 2005).

2.3. Karaciğer Histolojisi ve Gelişimi

Makroskopik olarak dört lob'dan oluşan karaciğer, yetişkinlerde yaklaşık 1500 gr ağırlığındadır. Hem ekzokrin hemde endokrin salgı yapabilen bir bez olan karaciğer, vücudun en büyük bezidir. Diğer bezlerde olduğu gibi, karaciğer de stroma ve parankima olmak üzere iki bölümden oluşur. Abdominal boşluğun büyük oranda üst sağ ve kısmen üst sol kısmında yerleşmiştir, kostalar ile korunmuştur. Pek çok önemli göreve sahiptir. Bunlara arasında safra üretimini, detoksifikasyonu, lipid, karbonhidrat ve protein metabolizmasındaki düzenleyici rollerini, demir metabolizmasındaki rollerini, kan pıhtılaşması için gerekli faktörlerin (protrombin, fibrinojen) sentezinde görev almasını sayabiliriz (Ross ve Pavlina, 2013).

Karaciğer hücresi olan hepatositlerin, lobcuğun merkezinden periferine doğru yaptığı ışınsal düzenlemeler Remark kordonları olarak adlandırılır. Hepatositler, 20-30 mikron çapında, çok yüzlü hücrelerdir ve büyük, yuvarlak, merkezi nukleuslara sahiptirler. Hepatositler bazen çift çekirdekli olabilirler ve yaşla birlikte çift çekirdek sayısı artar (Şekil 2.4). Hepatositlerin yaşam süreleri yaklaşık olarak beş aydır ve önemli ölçüde rejenerasyon yetenekleri mevcuttur (Ross ve Pavlina, 2013). Hepatosit sitoplazması ER açısından oldukça zengindir. Bu nedenle de ER stres durumuna karşı oldukça hassastırlar.



Şekil 4. Karaciğerin ışık mikroskobu altındaki görünümü

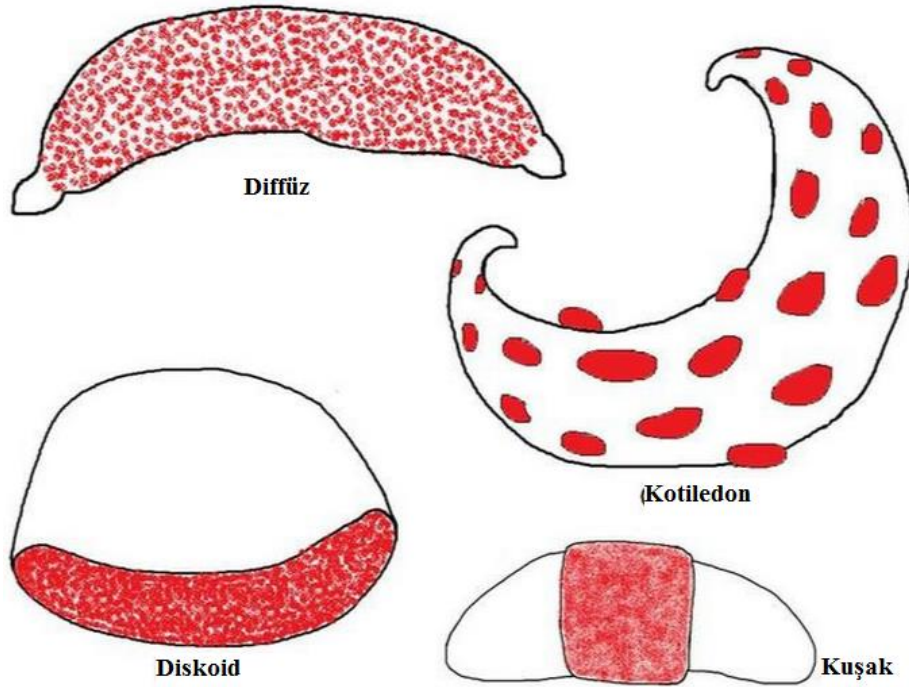
Karaciğer taslağı, 3. haftanın ortasında önbarsağın distal ucunda, endodermal epitelyum çıkıntısı şeklinde belirir. Hepatik divertikül olarak bilinen bu çıkıntı, perikard boşluğu ve yolk sapı arasındaki septum transversum denen mezodermal plağı pentre eden ve hızla çoğalan hücrelerden oluşur. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde hepatic sinüzoidler meydana gelir. Karaciğer kordonları parenkime farklılanırlar. Karaciğerin fibröz dokusu, hematopoetik dokusu ve Kupffer hücreleri septum transversumdaki mezenşimden gelişir. Karaciğer hızla gelişerek 5. haftadan 10. haftaya kadar karın boşluğunun büyük bir kısmını kaplar. Başlangıçta karaciğerin sağ ve sol loplarnın büyüklüğü eşitken kısa bir süre sonra sağ lop daha fazla büyür. 6. haftada başlayan hematopoez karaciğere parlak kırmızı bir renk verir. Karaciğer 9. haftaya kadar fetusun total ağırlığının %10 nu oluşturur. 12. haftada karaciğer hücreleri safra yapımına başlar.

2.4. Plasenta

Plasenta, maternal-fetal ara yüzde lokalize olur ve optimum fetal gelişim için *in utero* çevreyi regüle eden, kısa ömürlü bir yapıdır. Plasenta içerisindeki kan damarı ağı, gebelik süresince, solunum gazlarının, besinlerin ve atıkların anne ile fetus arasındaki değişiminden sorumludur (Carter, 2012). Hem fetal hem de maternal bileşenler plasentanın yapısına katkıda bulunur. Koryon fronduzumun villusları fetal kökene sahiptir. Plasentanın maternal kısmı ise desidua plasentalisten oluşur (Benirschke,2004). Plasentanın fonksiyonları plasentalı memeliler arasında korunmuşluk gösterirken plasenta morfolojisi açısından farklılıklar bulunmaktadır (Wildman, 2006). Gestasyon sürecinde, plasentanın vasküler gelişimi çeşitli faktörler tarafından etkilenebilir. Bunlar arasında; maternal diyet, sigara ve ilaç kullanımı sayılabilir. Uygun plasental fonksiyonun sağlanması için ilk gerekli olan şey, fertilize olan yumurtanın başarılı implantasyonu ve blastosistin trofektoderm tabakasındaki trofoblastların, maternal desiduaya invazyonudur. İnvazyonun ardından, trofoblastlar; maternal spiral arterleri yeniden düzenleyerek plasentanın vasküler dolaşımının genişlemesini tetiklerler. Böylece besin değişiminin daha etkili olması sağlanır (Pereira ve ark, 2015).

Plasenta yapısı türler arasında farklılıklar gösterebilir. Plasenta çeşitlerini sınıflandırmada kullanılan temel kriterlerden bir tanesi villus organizasyonudur (Wooding,

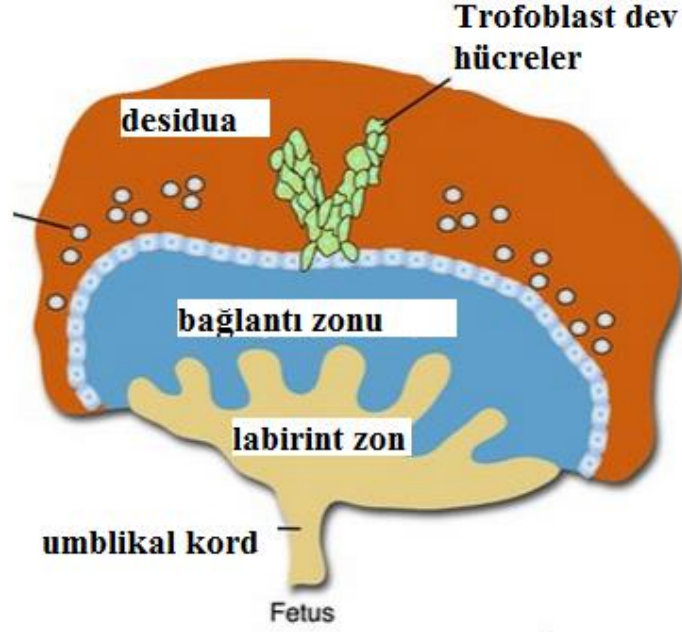
1994). Villus yapılarına göre, plasentayı dört alt başlık altında toplayabiliriz: kotiledon, diffüz, diskoidal ya da kuşak. Kemirgenlerde, maymunlarda ve insanlarda diskoidal tipte plasenta görülür. Bu tip plasentada tek bir plasenta oluşmuştur. Oluşan bu plasenta diskoid şeklindedir ve villuslar, disk benzeri şekilde organize olmuşlardır (Şekil 2.5). Kotiledon tip plasentada villuslar topluluk şeklinde bulunur ve plasental kotiledonlar, endometriyuma farklı bölgelerden bağlanmışlardır. Diffüz plasentada, neredeyse tüm allantokoryon yüzeyi plasenta oluşumuna katılmıştır. Kuşak plasentada ise; plasenta, fetusu saran bir doku gibi şekil alır (Page, 1993) (Şekil 2.5).



Şekil 5. Villüs organizasyonunda göre plasenta tipleri

İnsan ve fare/sıçan plasentaları arasında bir takım farklılıklar olmasına rağmen, içerdikleri yapısal ve gelişimsel benzerlikler nedeniyle fare/sıçan plasentasını, plasental gelişim çalışmalarında sıkça kullanılan bir modeldir. İnsanlarda ve kemirgenlerde, gelişmiş olan plasenta, temel olarak üç tabakadan oluşur. Bunlar; dış tarafta bulunan ve uterusun desudua hücrelerini içeren maternal tabaka; orta bölgede bulunan ve fetal plasentayı uterusu bağlayan, trofoblast hücrelerini içeren bağlantı zonu; son olarak ise besin alış-verişi için dallanmış olan villusları içeren iç tabaka olan labirint zon. (Rossant ve Cross, 2001). Fare/sıçanlarda, insanlardan farklı olarak, bu tabakalara ek olarak, dev hücreleri de görmek mümkündür (Davies ve Glasser 1968). Labirint zon, maternal ve fetal kan dolaşimleri arasında fizyolojik

değişimin gerçekleştiği alandır. Bağlantı zonu ise fare/sıçan plasentasının maternal yüzeyini sınırlandırır ve çeşitli proteinlerin salgılanmasında görevlidir. Gelişmiş ER'ye sahiptir. Dev hücreler poliploid yapıda olup, maternal desudua ile bağlantı zonu arasına sınır oluşturur (Şekil 2.6).



Şekil 6. Fare plasentası genel görünüm

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden yaklaşık 12-14 haftalık, ortalama ağırlığı 20-40 gram olan, daha önce hiç deneye girmemiş olan 28 adet dişi ve 10 adet erkek Balb/c cinsi fare kullanılmıştır. Çalışmamız Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu 64583101/2015/026 sayılı onayını almıştır. Erkek fareler, deney sonunda Deney Hayvanları Ünitesine iade edilmiştir. Fareler deney süresince, bağıl nem oranı %40-60, ısı 22°C ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsü olan ortamda bakıldı. Deney sürecinde su ve yem ihtiyaçları *ad libitum* olarak karşılandı. Kafeslerin temizliği haftada iki/üç kez olacak şekilde yapıldı.

3.2. Deney Gruplarının Planlanması

Farelerin uyum sürecinin tamamlanmasının ardından, fareler rastgele 4 gruba (n=7) ayrıldı.

Grup I (Kontrol grubu, n=7): Deney süresince, hiç bir şey uygulanmayacak kontrol grubu,

Grup II (Gebe kontrol grubu, n=7): Gebe bırakılacak fakat diyabet oluşturulmayacak olan kontrol grubu,

Grup III (Gebe+Diabetes mellitus, n=7): Gebe bırakılıp intraperitoneal streptozotosin (STZ) uygulaması ile tip I diyabet oluşturulacak deney grubu,

Grup IV (Vehicle grubu; Gebe+sitrat buffer, n=7): Gebe bırakılacak, diyabet oluşturulmayacak fakat STZ'nin çözündüğü materyal olan 0,1 M sitrat bufferın pH:4,5 intraperitoneal olarak verileceği grup.

Fareler gebe kalmaları için, akşam, kafeslere üç dişiye bir erkek olacak şekilde yerleştirildikten sonra ertesi sabah vajinal plak kontrolü ile gebelik tayini gerçekleştirilmiştir. Plak gözlemlenen farelerin, gebeliğin 0.5'inci gününde (dpc:0.5) olduğu kabul edildi.

3.3. Tip I Diyabet Oluşturma

Grup III'te yer alan farelere, gebeliğinin 9. gününde sitrat buffer içinde çözündürülmüş olan 300 mg/kg streptozotosin (sigma-aldrich, cat.no: S0130), 6 saat açlığından ardından tek doz intraperitoneal olarak enjekte edilerek tip I diyabet oluşturulmuştur. Enjeksiyon ardından fareler, %10'luk skrozlu su ile gece boyu bırakıldılar. Açlık kan şekeri 250 mg/dl'nin üzerinde değerlere sahip fareler diyabetik olarak kabul edilerek ve çalışmaya dahil edilmiştir.

3.3.1. Kan şekeri lm

Deneye başlamadan önce, sitrat buffer içinde zrlmş STZ veya sitrat buffer verildikten 72 saat ve 120 saat sonra ve sakrifiye edilmeden önce olmak üzere toplam dört kez farelerin kan şeker düzeyleri llmştir. Glukoz lm 2 saatlik açlıktan sonra farelerin kuyruk venlerinden kan örneklere alınarak glukometre (IME- DC) yardımı ile yapılmıştır.

3.4. Deneyin Sonlandırılması

Deneyin sonunda, gebe dişiler gebeliklerinin 17. gününde eter anestezisi altında sakrifiye edildiler . Bu sırada, Western blot uygulaması için plasenta alınarak sıvı nitrojen ile donduruldu ve deney gerçekleştirilene dek -80 °C de saklanmıştır. Maternal ve fetal karaciğerler ise immnohisto kimyasal işlemler için %10'luk formalinle ile tespit edilmiştir.

3.5. Fetus ve Plasenta Ağırlıklarının lm

Gruplara ait tüm fetusların ve plasentaların ağırlıkları hassas terazi ile ölçülerek kaydedildi.

3.6. Immunohistokimyasal İnceleme

Maternal ve fetal karaciğer dokuları % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildikten sonra, rutin histolojik takip serilerinden (alkol ile dehidratasyon ve ksilol ile şeffaflaştırma) geçirilerek parafin bloklara gömüldüler. Bu bloklardan 3-5 µm kalınlığında kesitler polilizinli lamlara alındı. İmmünohistokimyasal yöntem olarak Biyotin-Streptavidin-Peroksidaz yöntemi kullanılmıştır. Bir gece etüvde 55°C' de bekletilen kesitler, ertesi gün deparafinizasyon işlemini tamamlamak üzere 3 kez 10'ar dakika olmak üzere ksilole bırakıldı ve sonrasında sırasıyla % 100, % 96, % 80, %70'lik alkol serilerinden 2'şer dakika geçirilerek dehidrate edildiler. Kesitler, mikrodalgada kaynatılmış olan 10mM'lık sitrat tamponu pH:6.0 içerisinde 10 dakika oda ısısında bekletildiler. Endojen peroksidaz aktivitesi % 3'lük hidrojen peroksit ile 10 dakikalık inkübasyon ile bloke edilerek, yıkama yapıldı ve ardından serum blok solüsyonu uygulanarak, kesitler 1 saat inkübe edildi. Ardından, kesitler, CHOP (GADD153, Santa cruz, sc-575, 1:100 dilution in PBS) , Grp78 (BIP, cell signalling, 3177, 1:100 dilution in PBS) , Herp (Santa cruz, sc-69497) ve Nrf2 (Santa cruz, sc-722) antikoları ile +4 °C' de gece boyu inkübe edildiler. Sonrasında biyotinli sekonder antikor ile inkübe edildiler (1 saat) ve streptavidinli peroksidaz enzim kompleksi uygulanarak 30 dakika inkübasyona bırakıldılar. Ardından DAB (3.3 di amino benzidin) (DAB-Plus Substrate Kit, DAKO K4065) uygulanarak immün reaksiyonun ortaya çıkması bekledi. Zıt boyama olarak Mayer'in hematoksileni kullanılarak, entellan ile kapama gerçekleştirildi ve ışık mikroskopunda (Olympus BX50) incelenme gerçekleştirilmiştir. Dokular semikantitatif bir skorlama ile değerlendirildiler; 0: boyanma yok, 1: az boyanma, 2: orta düzeyde boyanma, 3: yoğun boyanma.

3.7. Western Blot

3.7.1. Lizat Hazırlama

Doku temini esnasında alimünyum folyo içine alınarak ilk etapta sıvı nitrojene atılan ve ardından -80°C'de muhafaza edilen plasenta dokuları, buz üzerinde camda, bistüri bıçağı yardımıyla mekanik olarak parçalandı ve 0,1 gram doku ependorflara aktarıldı. Her 0,1 gram doku üzerine, hazırlanmış olan lizis buffer ve proteaz inhibitör kokteyl karışımından 1 mL

eklenerek buz üzerinde inkübe edildiler. Örnekler arada vortekslenerek karıştırıldı ve ardından sonikatör yardımı ile homojenize edildiler. Toplamda 1 saatlik inkübasyonun ardından, örnekler +4°C, 15.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantları alınarak pelletleri atıldı. Hazırlanan lizatlar -20°C de muhafaza edildi.

3.7.2. Protein Miktarının Belirlenmesi ve Standardizasyonu

Lizatların içerdiği protein miktarının belirlenmesi için protein assay yapıldı. Bu işlem için BioRad protein assay 5000111katolog numaralı kiti kullanıldı ve spektrofotometrede 595 nanometrede ölçüm yapıldı. Protein miktarı tayin edilen örneklerin herbirinden, standart olarak 40 mikrogram örneğin jele yüklenmesi için, ilgili miktarlarda hesaplaması yapılan lizat, laemmlili buffer, beta-merkaptoetanol ve su içeren karışımı hazırlandı.

3.7.3. SDS-PAGE Western Blot Protokol

Hazırlanmış olan karışım, 5 dakika 95 derecede kaynatıldı ve %10'luk jele yüklendi. Örnekler, ilk önce 100V 30mA'de 15 dakika, sonrasında ise 80V 30mA'de jelin sonuna kadar yürütüldü. Elektrofezden sonra ise jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için semi-dry blotlama işlemi yapıldı. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra, membran 1 saat süre ile oda ısısında 1X TBS-T ile hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu ile bloklandı. Ardından membranlar ER stres belirteçlerine (XBP-1, Herpud ve BIP) ait primer antikoları ile +4°C'de gece boyu karıştırıcı üzerinde inkübe edildiler. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 5'er dakika yıkama gerçekleştirildi. Membran, sekonder antikorla oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında membran, TBS-T ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. İmmünoaktivitenin gösterilmesi amacıyla kemilüminesans deteksiyon reagenti olan ECL kiti kullanılacak ve bantlar Licor jel görüntüleme cihazı ile görünür hale getirildiler.

3.8. İstatistiksel Analiz

3.8.1. Şeker Değerleri

Gruplar arasında, şeker değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek için One Way ANOVA testi uygulandı ve $p<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

3.8.2. Plasenta-Embriyo Ağırlıkları

Kontrol ve deney gruplarına ait fetus ve plasenta ağırlıkları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek için One Way ANOVA testi uygulandı ve $p<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

3.8.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları

Gruplar arasında, immünohistokimyasal boyama ile gösterilmiş olan belirteçler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek için Kruskal-Wallis testi uygulandı ve $p<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Gruplar Arası Kan Şekeri Değerleri

Dört grup için de düzenli olarak ölçülmüş olan şeker değerleri arasındaki istatistiksel analize göre, Grup 3 ile diğer gruplar arasında şeker değerleri açısından istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.05$). Grup 3 haricindeki grupların şeker değerleri açısından birbirine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.1).

Tablo 1. Grupların sakrifikasyon öncesi şeker ölçüm sonuçları

GRUP	Kan Şekeri Değeri Ortalaması
Grup 1	100,42±19,5 *
Grup 2	100,83±17,5 *
Grup 3	412,57±105,2 *
Grup 4	93,85±18,04 *

4.2. Gruplar Arası Fetus ve Plasenta Ağırlıkları

Fetus ve Plasentaya sahip olan Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 arasında yapılan istatistiksel analize göre; Grup 3'ün fetus ve plasenta ağırlığının, Grup 2 ve Grup 4'e göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.05$). Grup 2 ve Grup 4 fetus ve plasenta ağırlık değerleri açısından birbirine göre anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.2).

Tablo 2. Grupların Fetus ve Plasenta Ağırlık Ortalamaları

GRUP	Fetus Ağırlığı Ortalaması	Plasenta Ağırlığı Ortalaması
Grup 2	1,047±0,144 *	0,125±,015 *
Grup 3	0,428±0,180 *	0,073±,016 *
Grup 4	1,068±0,159 *	0,120±,018 *

4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

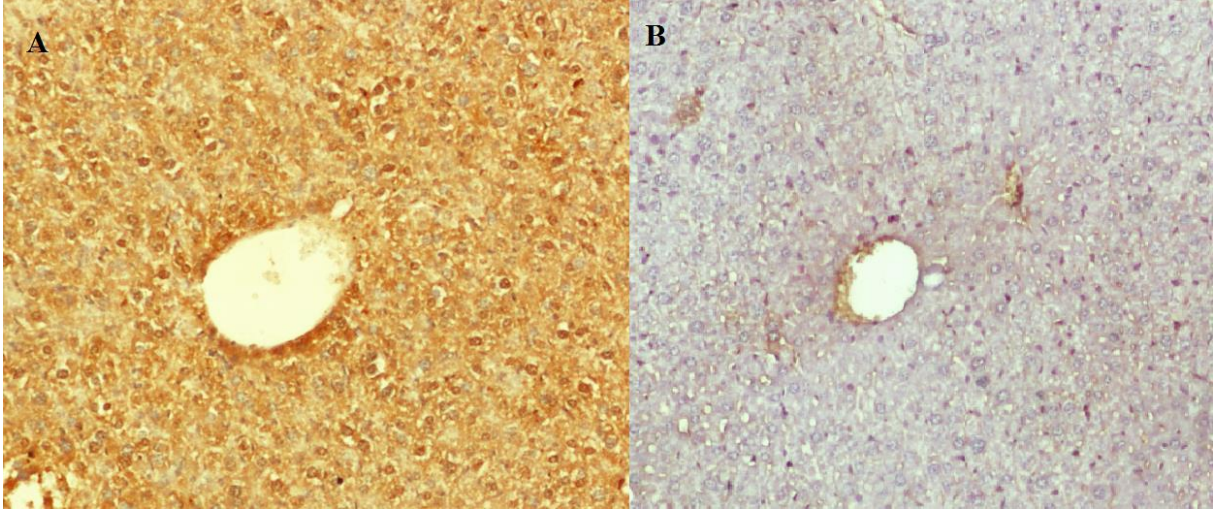
Anne karaciğer ve fetal karaciğere ait dokular ilgili belirteçler açısından incelenerek semi-kantitatif olarak değerlendirildiler.

Tablo 3. Grupların immunohistokimyasal skorumları

GRUP	Nrf2	XBP1	BIP	HERP	GADD 153
Grup 1 Kc	1,71*	0,71	0,29	0,43	0,29
Grup 2 Anne Kc	0,50	0	0	0,17	0,17
Grup 3 Anne Kc	0*	0	0	0,14	0
Grup 4 Anne Kc	0,57	0	0	0,43	0,57
Grup 2 Fetal Kc	1,00	0,50	0,67	1,00	1,50
Grup 3 Fetal Kc	0,43	0	0,14	0,43	0,43
Grup 4 Fetal Kc	1,43	0	0	1,29	0,57

0: boyanma yok, 1: az boyanma, 2: orta düzeyde boyanma, 3: yoğun boyanma.

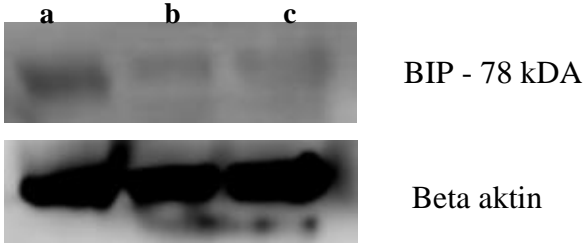
Karaciğer dokularının immünohistokimyasal skorları, gruplar arasında kıyaslandığı zaman; kullanılan antikorların hepsi için, diyabet grubunda diğer gruplara kıyasla azalma gözlemlenmiştir. Bu azalma eğilimi Kruskal-Wallis testi ile istatistiksel olarak değerlendirildiği zaman, grup1 ve grup 3 anne karaciğer dokularında Nrf2 antikoruna açısından anlamlı bir değişim bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4.3) (Resim 4.1).



Resim 1. Grup1 kc ve Grup 3 anne kc'nin Nrf2 antikoru ile boyanması. A. Grup 1 Kc, B. Grup 3 Anne Kc.

4.4. Western Blot Bulguları

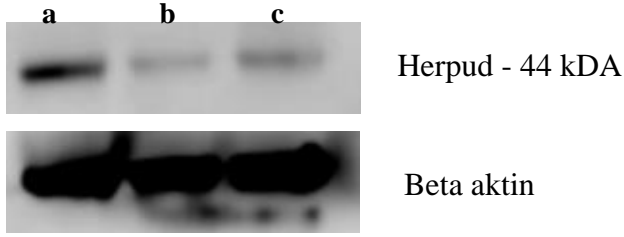
4.4.1. BIP Ekspresyonu



Resim 2. Plasenta dokularında BIP ekspresyonu. a: Grup 2, b: Grup 3, c: Grup 4

BIP protein miktarları değerlendirildiğinde, grup 2 ve 3'te kontrol grubuna (grup 1) kıyasla düşüş olmuştur. Bu düşüş diyabetik grup olan grup 3'te daha fazladır.

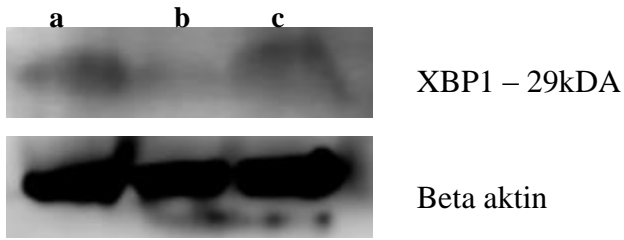
4.4.2. Herpud Ekspresyonu



Resim 3. Plasenta dokularında Herpud ekspresyonu. a: Grup 2, b: Grup 3, c: Grup 4

Herpud protein miktarı açısından bakıldığında, grup 2 ve 3'te kontrol grubuna (grup 1) kıyasla düşüş olmuştur. Bu düşüş diyabetik grup olan grup 3'te daha fazladır.

4.4.3. XBP1 Ekspresyonu



Resim 4. Plasenta dokularında XBP1 ekspresyonu. a: Grup 2, b: Grup 3, c: Grup 4

XBP1 protein miktarı değerlendirildiğinde, grup 2 ve 3'te kontrol grubuna (grup 1) kıyasla düşüş olmuştur. Bu düşüş diyabetik grup olan grup 3'te daha fazladır.

5. TARTIŞMA

DM; insülin salgılanmasının veya fonksiyonunun kısmı veya tamamen olacak şekilde yetersiz gelmesi sonucu karbonhidrat, protein ve lipit metabolizmasındaki hatalı düzenlenmeler ile karakterize olan bir hastalıktır. Diyabetik gebelikler hem anne hem de fetüs için olası riskler taşımaktadır. Kontrol edilmeyen diyabetik gebelikler spontan düşüklere neden olmaktadır. Gebe kadınlardaki diabet, maternal ve yenidoğan ölüm riskinin artması ile ilişkilendirilir (Kiss ve ark, 2009). Ayrıca, diyabetik gebelikler, konjenital malformasyon, fetal makrozomi, respiratuar distress sendromu gibi nedenlerle prematüre doğum; yenidoğanda sarılık ve hipoglisemi görülmesi ile karakterizedir (Scobie, 2007). Diyabetik annelerin, plasentaları normalden daha büyük ve daha ağırdırlar (Desoye, 1996). Diyabetik gebeliklerin plasentalarına bakıldığı zaman, en sık gözlenen anomali, plasental villusların tam olarak olgunlaşmamasıdır . Diğer bir özelliği ise transport yüzey alanlarının genişlemesidir (Desoye, 1996). Diyabetik kadınların çocuklarında makrozomi görülürken deneysel olarak diyabetik model oluşturulan fare/sıçan fetus ve plasentalarında büyüme geriliği gözlenmektedir. Bu büyüme geriliğinin ne zaman başladığı ve plasental patolojinin fetal gelişimi nasıl etkilediği tam olarak aydınlatılamamıştır (Padmanabhan, 2001). Bu verilerle uyumlu olarak, bizim yaptığımız çalışmada da, diyabet grupları ile kontrol ve vehicle grubu arasında, fetus ve plasenta ağırlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı olan bir düşüş saptanmıştır.

Büyük endokrin/ekzokrin aktiviteye sahip olan organlar, yüksek protein translasyonu kapasitelerinden dolayı ER strese diğer organlara kıyasla daha yatkındırlar (Yung ve ark, 2012). Hastalıkların mekanizmalarına bakıldığı zaman, birçok hastalığın moleküler temelinde ER stresin bulunduğu gözlemlenebilir. Bu hastalıklardan bir tanesi de diyabettir. Pankreasın yoğun salgılama kapasitesi göz önüne alındığında, ER stres ile ilişkilendirilmesi oldukça olağandır. ER stres hem Tip I hem de Tip II diyabetin patogenezinde rol alır (Kim ve ark, 2008). Plasenta ise, hem peptid hemde steroid hormon salgılayan büyük bir endokrin organdır (Burton ve Yung, 2011). Bu nedenle de bakıldığı zaman ER stresin plasenta üzerinde de bir takım etkileri bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar; ER stres sensörlerinden biri olan, IRE1'in, fare embriyogenezi sırasında plasentada yoğun olarak aktive olduğunu göstermiştir (Iwawaki,2009). ER stres sensörlerinin aktivasyonu ile ortaya çıkan apoptozun şiddetli preeklampsi durumlarında etkiliği olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. GRP78,

PERK, eIF2 α , CHOP ve ATF4 ekspresyonlarının preeklampsi durumundaki artış ile ER stres ve preeklampsi arasındaki bağlantı kurulmuştur (Fu ve ark, 2015). Yine aynı makalede ATF6 ve IRE1 belirteçleri açısından preeklampsi durumunda bir fark bulunmamıştır. Yung ve ark (2012) çalışmasına göre intrauterin gelişim geriliği ile ER stres arasında da bir bağlantı bulunmuştur. Bu çalışmada eIF2 α geni açısından mutant olan bir fare kullanılmış ve bunun sonucunda, plasentanın bağlantı zonunda ER stresin arttığı saptanmıştır. Bu çalışmada özellikle PERK transmembran proteinin fosforilasyonu mutant fare plasentasında bağlantı zonunda artış gösterirken labirent zonda bir değişim olmadığını saptamışlardır. Ayrıca, diğer ER stres belirteçleri olan şaperon Grp78 ve 94, *Xbp-1* mRNA'ları açısından ve apoptoz açısından iki zonda da fark bulunmamıştır. Fetal ve plasental ağırlıklar karşılaştırıldığında, mutant farenin ağırlıklarında düşüş olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, ER stres placentanın gelişimini, translasyon sonrası modifikasyonların ve böylece salgılanan büyüme faktörlerinin biyoaktivitenin değişimine neden olarak olumsuz etkiler.

Plasenta hakkında günümüzde bilinenlerin çoğu plasentanın morfolojisi ve genel fonksiyonları ile ilgili olup diyabet, preeklampsi ve büyüme geriliği gibi klinik tablolar gösteren hastaların plasental gelişimi hakkında bilgiler sınırlıdır. Plasenta ve ER stres ilişkisi üzerinde yapılan çalışmalar, oldukça sınırlı olup, daha çok preeklampsi ve intrauterin gelişim geriliğinin ER stres ile ilişkilendirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Literatüre bakıldığı zaman, diyabetik farelerin plasentaların ER stres ile ilişkilendirildiği çalışmalar konusunda büyük bir boşluk bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda, diyabetik gebe farelerin fetal karaciğer ve plasentalarında, ER stres marker durumları immünohistokimyasal ve western blot tekniklikleri ile incelenmiştir. Değerlendirmeye alınan antikorlar, ER stresin tolere edilmesi için farklı dallardan aktivite gösteren antikorlardır. Örneğin; BIP, bir şaperon olup, protein katlanmasından sorumludur ve katlanmamış proteinlerden kaynaklı ortaya çıkan ER stresin düzeltilmesi sağlar. GADD 153 ise, artan ve baş edilemeyen ER stres durumunda hücre ölümünün tetiklenmesinden sorumludur. Bulmuş olduğumuz sonuçlara göre, kullanmış olduğumuz ER stres belirteçleri açısından, hem anne karaciğer ve hem de fetal karaciğer açısından değerlendirildiğinde; diyabet gruplarındaki farelerin ER stres belirteçlerinde göreceli olarak düşüş olduğu saptandı. Bu düşüş; anne karaciğer dokularında, sıfır kontrol grubu ile diyabet grubu arasında, Nrf2 antikoruna açısından istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Western blot sonuçlarına bakıldığında ise, plasenta dokularında, BIP, XBP1 ve Herpud antikorları açısından, gebe kontrol ve gebe-sitrat gruplarının değerleri birbirine yakın çıkmış iken; diyabet grubunda, gebe kontrol ve gebe-sitrat gruplarına kıyasla düşüş bulunmuştur.

Bu durum, ER stres'in başka bir yolak ile tetiklendiğini gösterebileceği gibi, hücrelerin artmış olan stres ile baş edemediğinden dolayı, apoptoza gitmiş olabileceğini de gösterir. Bu nedenle; bir sonraki aşama olarak, plasenta dokularının özellikle ER stres ilişkili apoptoz belirteçleri ile western blot denemelerinin gerçekleştirilmesi daha doğru bir yorum yapmamızı kolaylaştıracaktır. Aynı zamanda, anne dokularından karaciğer ve pankreas dokularının da western blot denemesi gerçekleştirilerek, ER stresin anne dokularındaki durumunun kantitatif olarak değerlendirilmesi saplanabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Deneilerin sonucunda, diyabetik farelerin plasenta ve fetus karaciğerlerinde, bakmış olduğumuz ER stres belirteçleri açısından, bu farelerde diğer gruplara kıyasla düşme eğilimi olduğunu saptadık. Bu durum bakmış olduğumuz belirteçlerin yanı sıra, apoptoz gibi hücre ölümü ile ilişkilendirilen ER stres bağlantılı yolaklardaki belirteçlerin bakılması ile daha net bir yorum yapabilmemize sebep olmuştur. İlerleyen çalışmalarda, daha farklı ER stres belirteçleri açısından değerlendirme yapılması planlanmaktadır. Ayrıca, plasenta dokusunda olduğu gibi, fetal karaciğer ve anne karaciğer dokularının da ER stres belirteçleri açısından gruplar arasındaki değişimlerini göstermek için kantitatif bir yöntem veya western blot tekniğinin kullanılması düşünülmektedir.

Plasentaların ve fetusların ağırlıkları karşılaştırıldığında, diyabet grubunda diğer gruplara kıyasla daha düşük bir ağırlık saptanmış, morfolojik olarak gelişme geriliğinin varlığı gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- American Diabetes Association.** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2009, 32(1), 62-67.
- Araki E, Oyadomari S, Mori M.** Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus. *Journal of Internal Medicine* 2003, 42, 7–14.
- Bence NF, Sampat RM and Kopito RR.** Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 2001, 292, 1552–1555.
- Benirschke K.** The placenta: structure and function. *Neoreviews* 2004, 5(6), 252-261.
- Burton GJ, Yung HW.** Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens* 2011, 1(1-2), 10.1016.
- Carter A.M.** Evolution of placental function in mammals: the molecular basis of gas and nutrient transfer, hormone secretion, and immune responses. *Physiological Reviews* 2012, 92(4), 1543–1576.
- Choe CU, Ehrlich BE.** The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork. *Science's STKE* 2006, 363, 15.
- Dahlquist G.** The aetiology of type 1 diabetes: an epidemiological perspective, *Acta Paediatrica* 1998, 425, 5–10.
- Davies J, SR Glasser,** Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. *Acta Anat (Basel)*, 1968. 69(4): p. 542-608.
- Desoye GS, Hauguel-de mouzon S.** The Human Placenta in Diabetic Pregnancy. *Diabetes Reviews* 1996, 4(1), 70-89.
- Engin F. and Hotamisligil G.S.** Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: an emerging therapeutic approach for metabolic diseases. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2010, 12, 108–115.
- Forsbach-Sanchez G, Tamez-Perez HE, Vazquez-Lara J.** Diabetes and pregnancy. *Archives of Medical Research* 2005, 36, 291-299.

- Fu J, Zhao L, Wang L, Zhu X.** Expression of markers of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placenta of women with early and late onset severe pre-eclampsia. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 2015, 54(1):19-23.
- Gao Y, Sartori DJ, Li C, Yu QC, Kushner JA, Simon MC, Diehl JA.** PERK is required in the adult pancreas and is essential for maintenance of glucose homeostasis, *Molecular and Cellular Biology* 2012, 32(24), 5129-5139.
- Gupta S, McGrath B, Cavener DC.** PERK Regulates the Proliferation and Development of Insulin-Secreting Beta-Cell Tumors in the Endocrine Pancreas of Mice. *PLoS ONE* 2009, 4(11), 8008.
- Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D.** Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2002, 18, 575-599.
- Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini DD, Ron D.** Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Molecular Cell* 2001, 7, 1153–1163.
- Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K.** Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular Biology of the Cell* 1999, 10(11), 3787-3799.
- Iwawaki T, Akai R, Yamanaka S, Kohno K.** Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, 106(39):16657-62.
- Kim I, Xu W, Reed JC.** Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature Review Drug Discovery* 2008, 7, 1013–1030.
- Kim I, Xu W, Reed JC.** Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 2008, 7(12):1013-1030.
- Kincaid MM, Cooper AA.** ERADicate ER stress or die trying. *Antioxidants and Redox Signaling* 2007, 9, 2373-2387.
- Kiss AC, Lima PH, Sinzato YK, Takaku M, Takeno MA, Rudge MV, Damasceno DC.** Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetology and Metabolic Syndrome* 2009, 1(1):21.

Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, Ogawa S, Kaufman RJ, Kominami E, Momoi T. ER stress (PERK/eIF α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death and Differentiation* 2007, 14(2), 230–239.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and Cellular Biology* 2001, 21(4), 1249–1259.

Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34- mediated dephosphorylation of eIF2 α . *Journal of Cell Biology* 2001, 153 (5), 1011–1022.

Ogata M, Hino SJ, Saito A. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress, *Molecular and Cellular Biology* 2006, 26 (24), 9220–9231.

Orrenius, S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Review Molecular Cell Biology* 2003, 4, 552–565.

Osowski CM, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods in Enzymology* 2011, 490, 71–92.

Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 2002, 4, 335–345.

Padmanabhan R, M. Shafiullah, Intrauterine growth retardation in experimental diabetes: possible role of the placenta. *Arch Physiol Biochem*, 2001. 109(3): p. 260-71.

Page KR. The physiology of the human placenta. 1993, London: UCL Press.

Pereira RD, De Long NE, Wang RC, Yazdi FT, Holloway AC, Raha S. Angiogenesis in the placenta: the role of reactive oxygen species signaling. *BioMed Research International* 2015, 814543.

Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 2007, 129, 7, 1337–1349.

Pyo JO, Nah J, Jung YK. Molecules and their functions in autophagy. *Experimental and Molecular Medicine* 2012, 44(2), 73-80.

Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 2009, 14, 996-1007.

- Reece EA, Leguizamon G, Wiznitzer A.** Gestational diabetes: the need for a common ground. *Lancet* 2009, 373:1789–1797.
- Ross MH, Pawlina W.** Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Ankara: Palma Yayınevi; 2013, 628-662.
- Rossant J, Cross JC.** Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2: 538–548, 2001.
- Rutkowski DT, Kaufman RJ.** A trip to the ER: coping with stress. *Trends in Cell Biology* 2004, 14(1), 20-28.
- Sakaki K, Kaufmann RJ.** Regulation of ER stress-induced macroautophagy by protein kinase C 2008, *Autophagy*, 4(6), 841-843.
- Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ, Rubinsztein DC.** Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *Journal of Cell Biology* 2005, 170 (7), 1101–1111.
- Scheuner D, Mierde DV, Song B, Flamez D, Creemers JW, Tsukamoto K, Ribick M, Schuit FC, Kaufman RJ.** Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Journal of Natural Medicines* 2005, 11, 757–764.
- Schonthal AH.** Targeting endoplasmic reticulum stress for cancer therapy. *Frontiers in Bioscience* 2012b, 4, 412-431.
- schonthal AH.** Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy. *Scientifica (Cairo)* 2012a, 857516.
- Shröder M, Kaufman RJ.** ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research* 2005, 569, 29–63.
- Sculdiner M, Weissman JS.** The contribution of systematic approaches to characterizing the proteins and functions of the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology* 2013, 5(3), a013284.
- Scobie IN.** Diabetes and Pregnancy, in Atlas of DIABETES MELLITUS. Informa UK Ltd: Abingdon, OXON, 2007,111-114.
- Simeoni U, Barker DJ.** Offspring of diabetic pregnancy: long-term outcomes, *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2009, 14, 119–124.

- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A.** Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports* 2006, 7, 880–885.
- Unger RH.** Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinology Metabolism* 2013, 14(9), 398–403.
- Van der Kallen CJ, Van Greevenbroek MM, Stehouwer CD, Schalkwijk CG.** Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the development of diabetes: is there a role for adipose tissue and liver, *Apoptosis* 2009, 14, 1424–1434.
- Verfaillie T, Salazar M, Velasco G, Agostinis P.** Linking ER Stress to Autophagy: Potential Implications for Cancer Therapy. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 930509.
- Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, Kubo SK, Kayo T, Lu D, Takata K, Koizumi A, Izumi T.** A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *Journal of Clinical Investigation* 1999, 103(1), 27-37.
- Weindling AM.** Offspring of diabetic pregnancy: short-term outcomes, *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2009, 14(2), 111–118.
- Wildman DE, Chen C, Erez O, Grossman LI, Goodman M, Romero R.** Evolution of the mammalian placenta revealed by phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Science* 2006, 103, 3203– 3208.
- Wooding FBP FA.** Placentation. Fourth Edition ed. In Marshall's Physiology Reproductin. 1994, New York: Chapman and Hall. 233-460.
- Yamaguchi H, Wang HG.** CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells, *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279(44), 45495–45502.
- Yoshida H.** ER stress and diseases, *FEBS Journal* 2007, 274(3), 630-658.
- Yung HW, Hemberger M, Watson ED, Senner CE, Jones CP, Kaufman RJ, Charnock-Jones DS, Burton GJ.** Endoplasmic reticulum stress disrupts placental morphogenesis: implications for human intrauterine growth restriction. *Journal of Pathology* 2012, 228(4):554-564.
- Zhang W, Feng D, Li Y, Iida K, McGrath B, Cavener DR.** PERK EIF2AK3 control of pancreatic beta cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis. *Cell metabolism* 2006, 4, 491-497.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : GÖKMEN ESRA
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Burhaniye 16/11/1989
Telefon : 0506 962 67 09
E-mail : egokmen@ymail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi	
Y. Lisans	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi	Haziran 2011

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2013-	Adnan Menderes Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Gökmen E, Ergin K. DNA Methyltransferase Expression and Proliferation Status of Metastatic Breast Cancer Cell Line After Prolonged and Repeated Rapamycin and Melatonin Application. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Journal Of Adnan Menderes University Medical Faculty 2015, Doi: 10.4274/meandros.2117 (Yayın No: 1668215).

Gökmen E, Ergin K. Endoplasmic Reticulum Stress and Pancreatic Cancer. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Journal Of Adnan Menderes University Medical Faculty 2015, 16(1), 20-24., Doi: 10.5152/adutfd.2015.1871 (Yayın No: 1668214).

2. PROJELER

Pankreas kanserinde elongasyon inisiyasyon faktör 2 alfa (eIF2 α)'nın siRNA (small interfering RNA) ile susturulması (in vitro ve in vivo) sonrasında hücre ölümünün araştırılması, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, 2015

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

GÖKMEN ESRA, ERGIN KEMAL Expression of DNA Methyltransferase and Proliferation markers in Estrogen Receptor Negative Breast Cancer Cells with prolonged Rapamycin and Melatonin

Treatment. I. Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Kongresi (Poster)(Yayın No:1668216)