

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

PLASENTAL TROFOBLAST HÜCRE SERİLERİNDE
PKR KİNAZ AKTİVASYONUNUN OKSİDATİF STRES
ÜZERİNE ETKİSİ

RAMAZAN KARAYEL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdullah YALÇIN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF- 20018 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN 2022

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Ramazan KARAYEL tarafından hazırlanan “Plasental Trofoblast Hücre Serilerinde PKR Kinaz Aktivasyonunun Oksidatif Stres Üzerine Etkisi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22.04.2022

Üye (T.D.): Prof. Dr. Abdullah YALÇIN Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Ayşegül YILDIZ Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

ONAY:

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

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Abdullah YALÇIN 'na çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Gizem Dönmez YALÇIN ve Araştırma Görevlisi Umut Kerem KOLAÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince gösterdiği sabır, özveri ve destekleri için aileme ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diyabet Tanımı	3
2.1.1. Karaciğer Glikoz Metabolizması	3
2.1.2. Hepatositler Aracılığı ile Glikozun Taşınması	4
2.1.3. Diyabet sınıflandırılması	5
2.1.4. Diyabet Komplikasyonları	6
2.1.5. Tip 1 Diyabet Tanımı	7
2.1.6.1. Tip 1 Diyabet Epidemiyolojisi	8
2.1.6.2. Tip 1 Diyabet Patofizyolojisi	9
2.1.7. Tip 2 Diyabet	11
2.1.8. İnsülin Direnci	11
2.1.8.1. İnsülin Direnci Moleküler Yollar	12
2.1.9. Gestasyonel Diyabet Tanımı	18
2.1.9.1. Gestasyonel Diyabet Epidemiyolojisi	18
2.1.9.2. Gestasyonel Diyabet Risk Faktörleri	18

2.1.9.3. Gestasyonel Diyabet Patofizyolojisi.....	18
2.1.9.3.1. Maternal İnsülin Direnci.....	19
2.1.9.3.2. İnflamasyon	20
2.1.9.3.3. Plasental ve Endotel Disfonksiyon	21
2.2. Endoplazmik Retikulum	22
2.2.1. Tanımı	22
2.2.2. Yapısı ve İşlevi.....	22
2.2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi	24
2.3. Oksidatif Stres	27
2.4. Nitrozatif Stres.....	28
2.4. PKR	28
2.4.1. Tanımı ve Yapısı	28
2.4.2. PKR Aktivasyonu	29
2.4.3. PKR Metabolizma İlişkisi	30
2.5. Placenta.....	32
2.5.1. Placenta oluşumu ve morfolojisi	32
2.5.2. Placenta ve Oksidatif Stres	33
2.5.3. Placenta ve Nitrozatif Stres	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Gereç.....	37
3.1.1. Cihazlar.....	37
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Antikorlar	38
3.2. Yöntem	40
3.2.1. Hücre Kültürü Hazırlanması.....	40
3.2.2. Çalışmada Kullanılacak Hücre Gruplarının Belirlenmesi	40
3.2.3. Protein İzolasyonu	41

3.2.4. Western Blot	41
3.2.5. ELISA Yöntemi	43
3.2.6. ROS Potansiyelinin Tespiti.....	44
3.2.7. İstatiksel Analiz	44
4. BULGULAR	45
4.1. p-PKR İfadesinin Plasenta Trofoblast Hücrelerinde Protein Düzeyinde Belirlenmesi ..	45
4.2. ELISA Yöntemi ile Trofoblast Hücrelerindeki Enzimlerin Kantitatif Ölçümlerinin Belirlenmesi	46
4.3. Grupların ROS Potansiyellerinin Karşılaştırılması	48
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR	53
BİLİMSEL ETİK BEYANI	62
ÖZ GEÇMİŞ.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AGC	: Korunmuş katalitik kinaz
AGE	: İleri glikasyon son ürünü
AKT	: Protein kinaz B
AMPK	: Adenozin monofosfat protein kinaz
AP1	: Aktivatör protein 1
APC	: Adenomatöz polipozis koli
APP	: Adacık amiloid peptidi
ATF-4	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
ATP	: Adenozin tri fosfat
BCL-2	: B- hücreli lenfoma 2
BIM	: Protein kinaz C inhibitörü
CA	: Kalsiyum
CD4	: Yardımcı T hücreleri
CHOP	: DNA hasarı ile indüklenebilir transkript 3
EIF2A	: Ökaryotik başlatma faktörü a
ER	: Endoplazmik retikulum
ERAD	: Endoplazmik retikulumla ilgili protein yıkımı
FFA	: Yüksek serbest yağ asitleri
GDM	: Gestasyonel diyabet
GLUT2	: Glikoz taşıyıcı 2
GPX1	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
HLA	: İnsan lökosit antijeni

HNF	: Hepatosit nükleer faktör
IKK	: Kappa kinaz enzim kompleksi
IL6	: İnterlökin 6
IP6K1	: İnositol heksakifosfat kinazlar
IRE1	: İnositol enzim gerektiren 1
IRF	: İnterferon düzenleyici faktörler
IRS	: İnsülin reseptör substratı
JNK	: C-Jun N-Terminal Kinaz
K	: Potasyum
KC	: Karaciğer
LPS	: Lipopolisakkarit
MNSOD	: Manganez bağımlı süperoksit dismutaz
MTORC	: Rapamisin'in memeli hedefi
MYD88	: Miyeloid farklılaşma birincil yanıtı 88
NF-KB	: Nükleer faktör kappa B
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentetaz
PDK1	: 3-fosfoinositide bağımlı protein kinaz-1
PERK	: RNA benzeri endoplazmik retikulum kinaz
PI3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
PIP2	: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat
PKR	: Protein kinaz RNA
POLY(I:C)	: Poliinosinik:polisitidilik asit
PUMA	: p53 yukarı regüle edilmiş apoptoz modülatörü
RAGE	: Gelişmiş glikasyon ürünleri için reseptör
RIP	: Reseptörle etkileşime giren protein kinazlar

ROS	: Reaktif oksijen türleri
S6K1	: Ribozomal protein S6 kinaz beta-1
SOD	: Süperoksit dismutaz
TIRAP	: Toll benzeri reseptörlerle ilgili adaptör molekülü
TLR4	: Toll benzeri reseptör 4
TNF-A	: Tümör nekroz faktör a
TRAF	: TNF reseptörü ilişkili faktör
UPR	: Katlanmamış protein yanıtı
VCAM	: Vasküler hücre adezyon molekülü
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VP1	: Majör kapsid proteini
XBP1	: X-box bağlayıcı protein 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İnsülin salgılanması GLUT2 aracılığı ile	5
Şekil 2. Diyabet türlerinin sınıflandırılması	6
Şekil 3. Diyabet sebepleri ve komplikasyonları	7
Şekil 4. 0-14 yaş arası çocuklarda coğrafi bölgelere ve zamana göre tip 1 diyabet insidansı	8
Şekil 5. Tip 1 diyabetin immünopatogenezi.....	10
Şekil 6. İnsülin direnci gelişme sebepleri.....	12
Şekil 7. İnsülin sinyalinin düzenlenmesindeki moleküler yollar	17
Şekil 8. Gestasyonel diyabet insülin direnci oluşumu.....	20
Şekil 9. Gestasyonel diyabet anne ve fetüs etkileri	21
Şekil 10. UPR yolu.....	26
Şekil 11. ER stresi durumunda apoptoz redoks modeli).	27
Şekil 12. PKR aktivasyonu.....	30
Şekil 13. PKR TLR4 ilişkisi.....	31
Şekil 14. Plasenta histolojisi.....	32
Şekil 15. p-PKR/ β -tubulin bant görüntüleri.	45
Şekil 16. Plasenta trofoblast hücrelerindeki p-PKR ekspresyonları.....	46
Şekil 17. Plasenta trofoblast hücrelerindeki GPx1 enzim ifadesi.	47
Şekil 18. Plasenta trofoblast hücrelerindeki MnSOD enzim ifadesi.	47
Şekil 19. Plasenta trofoblast hücrelerindeki NO enzim düzeyleri.....	48
Şekil 20. Plasenta trofoblast hücrelerindeki ROS profilindeki değişimler.....	49

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Deney grupları	40
Tablo 2. Gruplardaki ROS profillerinin çoklu karşılaştırması	49

ÖZET

PLASENTA TROFOBLAST HÜCRE SERİLERİNDE PKR KİNAZ AKTİVASYONUNUN OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİ

Karayel R. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2022

Amaç: Çalışmada plasenta trofoblast hücrelerine poly(I:C) ve LPS verilerek PKR aktivasyonunu uyarabilme kapasitelerinin olup olmadığı amaçlanmıştır. Plasenta trofoblast hücrelerinde gerçekleşen PKR aktivasyonunun oksidatif stres üzerindeki etkilerinin olup olmadığı ve PKR aktivasyonu ile oksidatif stres arasındaki bağlantının tespitinin yapılması amaçlanmıştır. PKR aktivasyonundan dolayı meydana gelen ROS değişimlerine uygulanan antioksidan maddelerin ROS değişimlerini olan etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Metot: İlk aşamada hücre kültürü yöntemi ile plasental bewo hücre hatları çoğaltıldı. Çalışmada 6 farklı grupluk petri kabında hücreler oluşturuldu. İlk grup kontrol grubu olarak ayrıldı. Dördüncü grup, beşinci grup ve altıncı gruba 50 ul/ml poly(I:C) ve 500 ng/ml LPS verilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Plasenta trofoblast hücrelerindeki PKR aktivasyonunun tespiti için western blot tekniği uygulandı. Hücrelerde PKR aktivasyonu sonucun da gerçekleşen oksidatif stres belirteçleri ELISA yöntemi ile tespit edildi. İkinci aşamada gruplara antioksidan madde olarak askorbik asit ve glutatyon uygulandı. İkinci gruba 100 uM askorbik asit verildi. Üçüncü gruba 24 uM glutatyon verildi. Beşinci ve altıncı gruplara 100 uM askorbik asit ve 24 uM glutatyon verilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Antioksidan maddeler verilerek oksidatif stres parametrelerindeki değişimler ELISA yöntemi ile tespit edildi. Hücrelerdeki ROS' ta meydana değişimler akış sitometresi ile ölçüldü.

Bulgular: İlk aşamada hücrelere uygulanan poly(I:C) ve LPS'nin PKR aktivasyonunu gerçekleştirdiği western blot analizinde tespit edildi. PKR aktivasyonuna bağlı olarak oksidatif stres belirteçlerinde anlamlı değişimler meydana geldi. Gruplara uyguladığımız antioksidan

maddeler oksidatif stres belirteç değişimlerini etkiledi. PKR aktivasyonu ROS u arttırırken antioksidan maddeler ROS u azalttı.

Sonuç: PKR aktivasyonu oksidatif stresi arttırdı. Uygulanan antioksidan maddeler oksidatif stresi azaltırken PKR aktivasyonun etkilerini de azalttı. Çalışmada PKR aktivasyonu ile oksidatif stresin bağlantılı olduğu ve hücrelerdeki oksidatif stresin PKR aktivasyonu ile gerçekleştiğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: PKR Aktivasyonu, Oksidatif Stres, ROS, Askorbik Asit, Glutasyon

ABSTRACT

THE EFFECT OF PKR KINASE ACTIVATION ON OXIDATIVE STRESS RESPONSE IN PLACENTAL TROPHOBLAST CELL

Karayel R. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Medical Biology Program, Master Thesis, Aydın, 2022

Objective: In this study, it was aimed whether they have the capacity to stimulate PKR activation by giving poly(I:C) and LPS to placental trophoblast cells. It is aimed to determine whether PKR activation in placental trophoblast cells has effects on oxidative stress and to determine the connection between PKR activation and oxidative stress. It is aimed to determine the effect of antioxidant substances applied on ROS changes due to PKR activation on ROS changes.

Method: In the first stage, placental bewo cell lines were propagated by cell culture method. In the study, cells were created in petri dishes of 6 different groups. The first group was assigned as the control group. The fourth group, the fifth group and the sixth group were given 50 µl/ml poly(I:C) and 500 ng/ml LPS and incubated for 24 hours. Western blot technique was applied to detect PKR activation in placental trophoblast cells. Oxidative stress markers that occur as a result of PKR activation in cells were determined by ELISA method. In the second stage, ascorbic acid and glutathione were applied to the groups as antioxidant substances. The second group was given 100 µM ascorbic acid. The third group was given 24 µM glutathione. Fifth and sixth groups were given 100 µM ascorbic acid and 24 µM glutathione and incubated for 24 hours. Changes in oxidative stress parameters were determined by ELISA method by giving antioxidant substances. Changes in ROS in cells were measured by flow cytometry.

Results: It was determined in western blot analysis that PKR activation of poly(I:C) and LPS applied to the cells in the first stage occurred. Significant changes occurred in oxidative stress markers depending on PKR activation. The antioxidant substances we applied to the

groups affected the oxidative stress marker changes. While PKR activation increased ROS, antioxidant substances decreased ROS.

Conclusion: PKR activation increased oxidative stress. While the applied antioxidant substances reduced oxidative stress, they also reduced the effects of PKR activation. The study showed that oxidative stress is associated with PKR activation and that oxidative stress in cells occurs with PKR activation.

Keywords: PKR Activation, Oxidative Stress, ROS, Ascorbic Acid, Glutathione

1. GİRİŞ

Gestasyonel diyabet, gebelik sırasında kendiliğinden oluşan ve hiperglisemi zemininde gelişmekte olan bir komplikasyondur (Cho, ve diğerleri, 2018). GDM'de artan anne yaşı, obezite, yanlış beslenme tercihleri, insülin direnci birer risk faktörünü oluşturmaktadır. GDM'nin fetal ve maternal etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler toplum sağlığı ve gelecek nesiller için birer tehdit oluşturmaktadır. GDM'de yaşam tarzı değişiklikleri, diyet ve insülin tedavisi dışında farklı tedavi seçenekleri bulunmamaktadır. Bunun için GDM patofizyolojisi için gerekli moleküler belirteçlerin iyi bir şekilde araştırılması gerekmektedir (Cho, ve diğerleri, 2018).

Plasentayı oluşturan sinsityotrofoblast hücreleri gebeliğin başarılı bir şekilde devam etmesi için önemli hücre kümeleridir. Bu hücreler den peptitlerin sentezi ve bazı önemli sitokinlerin salınımı gibi çeşitli önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Bu fonksiyonlarından dolayı bu hücrelerde çok fazla miktarda endoplazmik retikulum gibi önemli hücre elemanı bulunmaktadır. Endoplazmik retikulum yanlış katlanmış proteinlerin kontrolünü için önemli bir organeldir. Yanlış katlanmış proteinleri PKR benzeri PERK yolunu kullanarak mRNA transkripsiyonunu durdurarak yanlış katlanmış protein üretimini azaltmaktadır. İnterferon indüklü çift sarmal RNA ya bağlı protein kinaz (PKR) viral enfeksiyonlar sonucunda aktif olarak inflamatuvar yolları başlatır. PKR aktivasyonu sonucunda diyabet, obezite ve metabolik sendrom gibi hastalıkların oluşmaya başlamasında etkili olduğu düşünülmüştür (Burton, 2017).

Serbest radikaller birçok elementten üretilir, ancak biyolojik sistemlerde en önemli olan oksijen ve azot içerenlerdir. Fizyolojik koşullar altında, en yaygın oksijensiz radikal süperoksit anyonudur (O_2^-) ve mitokondri ana kaynak olarak kabul edilir. Solunum zincirinin enzimleri boyunca elektron transferi tamamen verimli değildir ve elektronların, özellikle I ve III komplekslerinden moleküler oksijene sızması, O_2^- oluşumuna neden olur. Benzer şekilde, süperoksit, endoplazmik retikulum (ER) içindeki daha kısa elektron taşıma zincirinden elektronların sızmasıyla da üretilir. Protein katlama sırasında disülfid bağlarının oluşumu oksidatif bir işlemdir ve yaklaşık 25% O_2^- hücreler içinde ER içinde oluşturulur. Bu, yüksek salgı çıkışlı hücrelerde artabilir ve ayrıca yanlış katlanmış

proteinleri tekrar katlama girişimleri gerçekleştiğinde ER stresi koşulları altında da olabilir (Hubel, 1999).

ROS pek çok hücre işlemini aktive edebildiği için oksidatif stresin tek başına ortaya çıkması şaşırtıcı değildir, ancak genellikle diğer hücre stres formları da eşlik eder. Ca^{+2} salıvermesinin aracılık ettiği ROS, mitokondriyal ve ER fonksiyonu arasında yakın etkileşimler meydana gelir. İki stres arasında, oksidatif ve ER stresinde, UPR bir homeostatik mekanizma olduğu için ikincisinin düşük seviyelerde tespit edilmesi muhtemeldir, oysa yaygın olarak kullanılan oksidatif stres markörleri hücre hasarını yansıtır (Myatt, 2010).

Oksidatif stres antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki dengenin bozulması sonucunda ortaya çıkan bir durumdur. Antioksidanlar oluşan hidrojen peroksit gibi önemli radikalleri hücrede yakalayarak etkisiz hala getirebilmektedir. Glutatyon ve askorbik asit endojen kaynaklı antioksidanlar olarak görev yapmaktadırlar.

Glutatyon (GSH); glutamik asit sistein ve glisinden oluşan, intraselüler konsantrasyonu daha fazla olan bir tripeptittir. Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan olan glutatyon, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürüp hücreleri endojen ve ekzojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır (Davies, 2007).

Askorbik asit (vitamin C) ve α -tokoferol (vitamin E) membranı oksidatif hasara karşı koruyabilen önemli antioksidanlardır. Askorbik asit tokoferoksil radikalini indirgeyerek tokoferolün radikal temizleme aktivitesini düzenlerken, askorbik asitin redoks durumu hücre içi GSH tarafından kontrol edilmektedir (Bisby, 1995)

Tüm bu bilimsel verilerden yola çıkarak biz çalışmamızda plasenta trofoblast hücrelerinde meydana gelen oksidatif hasarın uyardığımız PKR aktivasyonu ile ilişkisini ortaya koyacağız. Oksidatif hasarın yüksek olduğu hücre serilerine C vitamini ve glutatyon ekleyip mevcut hasarın azalıp azalmadığını ölçeceğiz. PKR aktivasyonu sonucunda antioksidan maddeleri ekleyip oksidatif hasarı baskılamayı gerçekleştireceğiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabet Tanımı

Diyabet pankreastan yeterli insülin salgılanmaması veya salgılanan insülinin vücut tarafından kullanılmaması sonucunda oluşan ve halk arasında şeker hastalığı olarak bilinen ve etkileri ömür boyu süren bir hastalıktır. Son yıllarda diyabetten etkilenen nüfus hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde artmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) yakın zamanda dünya çapında 425 milyon kişinin diyabetten etkilendiğini tahmin etmektedir. Bunların %80'i düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşamakta ve büyük bir kısmı Asya-Pasifik bölgesinde yaşamaktadır. 2013'te Çin'de ülke çapında yürütülen bir ankette, 18 yaşından büyük yetişkinlerin %11,6'sında diyabet tespit edilmiştir bu da dokuz Çinli yetişkinden biri etkilemiştir (Chan, 2004).

2.1.1. Karaciğer Glikoz Metabolizması

Bağırsaklardaki emilimden elde edilen karbonhidratlar başlangıçta hepatositler tarafından işlenirken, diyet yağ asitleri enterositler içinde triaçilgliseroller oluşturur ve kan dolaşımına dahil olan şilomikronlar olarak birleştirilerek lenf dolaşımına ulaşır ve sonunda karaciğere artık şilomikronlar olarak ulaşmaktadır. Sağlıklı bireylerde karaciğer, tokluk sonrası dönemde başlıca glikoz kullanımının yeridir. Periferik dokulara göre glikoz tüketimine hepatik katkı, farklı çalışmalarda, alınan glikozun üçte birinden %50-60'ına kadar değişken bulunmuştur (Ferrannine, ve diğerleri, 1985). İskelet kası ve insüline duyarlı olmayan dokular (ağırlıklı olarak beyin) dahil olmak üzere periferik glikoz alımı, yemeklerden sonra toplam glikoz atılımının geri kalanını oluşturmaktadır. Kullanılmak üzere glikoz hepatosit içine girer ve glikoz 6-fosfata fosforile edilir. Glikoz 6-fosfat, glikojen sentezi, heksozamin yolu, pentoz fosfat yolu ve oksidatif yollar dahil olmak üzere bir dizi metabolik yolu izleyebilir. Fazla glikoz karaciğerde yağ asitlerini sentezlemek için kullanılır. Glikoz kullanımına ek olarak, insan karaciğeri, daha önce depolanmış glikojenden

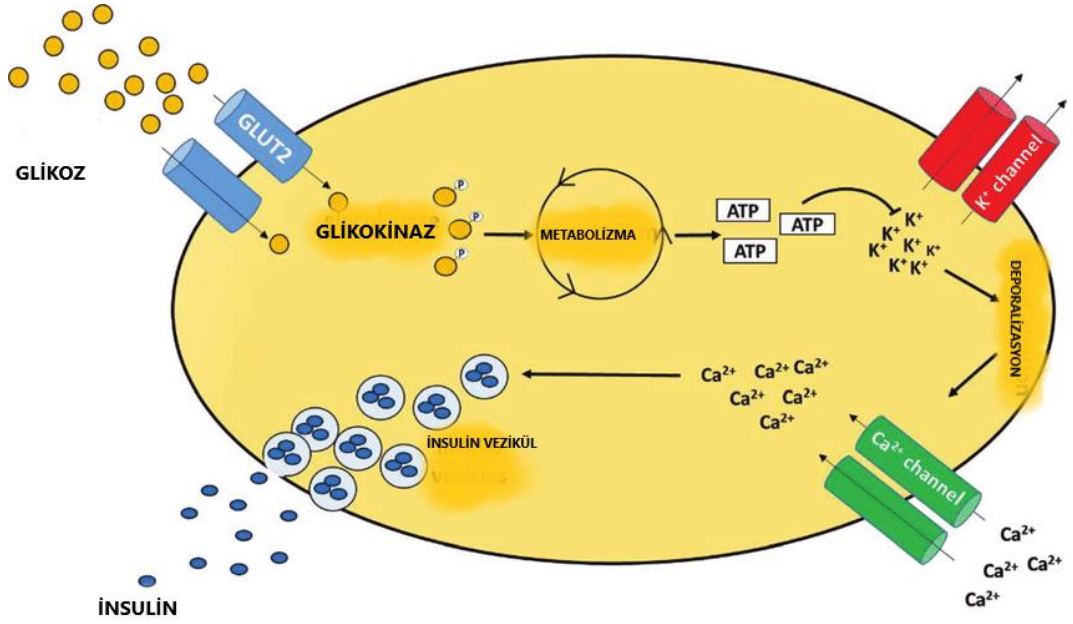
(glikojenoliz) veya alanin, laktat ve gliserol gibi öncülerden glikoz üretmek (glukoneogenez) sistemik dolaşıma glikoz salmaktadır.

2.1.2. Hepatositler Aracılığı ile Glikozun Taşınması

İnsan hepatositlerine glikoz girişinin, glikozun pasif (enerjiden bağımsız) bir taşınmasını çalıştıran glikoz taşıyıcıları aracılığıyla gerçekleştirildiği düşünülmektedir ve genellikle glikoz taşıyıcısı-2'nin (çözünür taşıyıcı aile 2, üye A2, SLC2A2 veya GLUT2) olduğu kabul edilmektedir. GLUT2, hücrelerin içine ve dışına iki yönlü glikoz akışlarına izin veren kolaylaştırıcı bir glikoz taşıyıcıdır. GLUT2 mRNA'sı insan karaciğeri, böbrek, pankreas β -hücreleri ve ince bağırsakta (jejunum) eksprese edilmektedir (Fukumoto, H.; Seino, S.; Imura, H., 1998). Taşıyıcı muhtemelen bağırsak ve böbrek epitel hücrelerinin bazolateral membranında eksprese edilir, burada apikal membrana yerleştirilmiş sodyum-glikoz yardımcı taşıyıcısıyla birlikte çalışarak bağırsak lümeninden veya böbrek tübül sıvısından glikozun emilimini kolaylaştırmaktadır (Takeda J ve diğerleri, 1993). Karaciğer tarafından glikoz alımı, hepatositler içinde hepatik glikoz taşınmasının birincil belirleyicisi olan hiperinsülinemiden ziyade hiperglisemi olduğundan insülin tarafından etkilenmemektedir (Adkins, ve diğerleri, 2003).

GLUT2'yi kodlayan insan geni (SLC2A2) 3q26.1-q26.3 kromozomu bölgesinde yer almaktadır. (Fukumoto ve diğerleri, 1988). Varsayılan GLUT2 sekansı, GLUT2 düzenlemesinde önemli olabilecek, asparjine bağlı glikosilasyon için üç olası bölgeye sahiptir . SLC2A2 geninin transkripsiyonu ve dolayısıyla GLUT2'nin ekspresyonu, HNF4 α , HNF1 α ve HNF1 β dahil olmak üzere bazı hepatosit nükleer faktörleri (HNF'ler) tarafından düzenlenmektedir (Ban, ve diğerleri, 2002).

Glikoz konsantrasyonu insülin bağımsız olarak GLUT2 aracılığı ile pankreas beta hücrelerine alınmaktadır. Hücre içine alınan glikoz glikokinaz tarafından glikoz-6-fosfata fosforile olmaktadır. Bu fosforilasyon sonucunda metabolik süreçler başlar ve ATP üretimi artmaktadır. Artan ATP den dolayı membran depolarizasyonu ile K⁺ iyonlarının birikimi arttırmaktadır. İkinci olarak ise Ca⁺² kanallarını aktive ederek hücre içinde Ca⁺² iyonlarının artmasına ve bunun sonucu olarak veziküllerden insülin salgılanmasına yol açmaktadır. (Şekil.1)



Şekil 1. İnsülin salgılanması GLUT2 aracılığı ile (Świderska, ve diğerleri, 2018).

Karaciğerde, GLUT2 kan dolaşımına glikoz salınımını kolaylaştırırken, pankreasta GLUT2, glikoz aracılı insülin salgılanmasına katkı sağlamaktadır. SLC2A2 genindeki mutasyonlar, yetersiz insülin sekresyonu nedeniyle Fanconi-Bickel hastalığına ve neonatal diyabetes mellitusa neden olabilmektedir. Benzer şekilde, GLUT2 ekspresyonunu azaltan HNF'leri kodlayan genlerdeki mutasyonlar da benzer klinik fenotiplere neden olmaktadır (Ban, ve diğerleri, 2002).

2.1.3. Diyabet sınıflandırılması

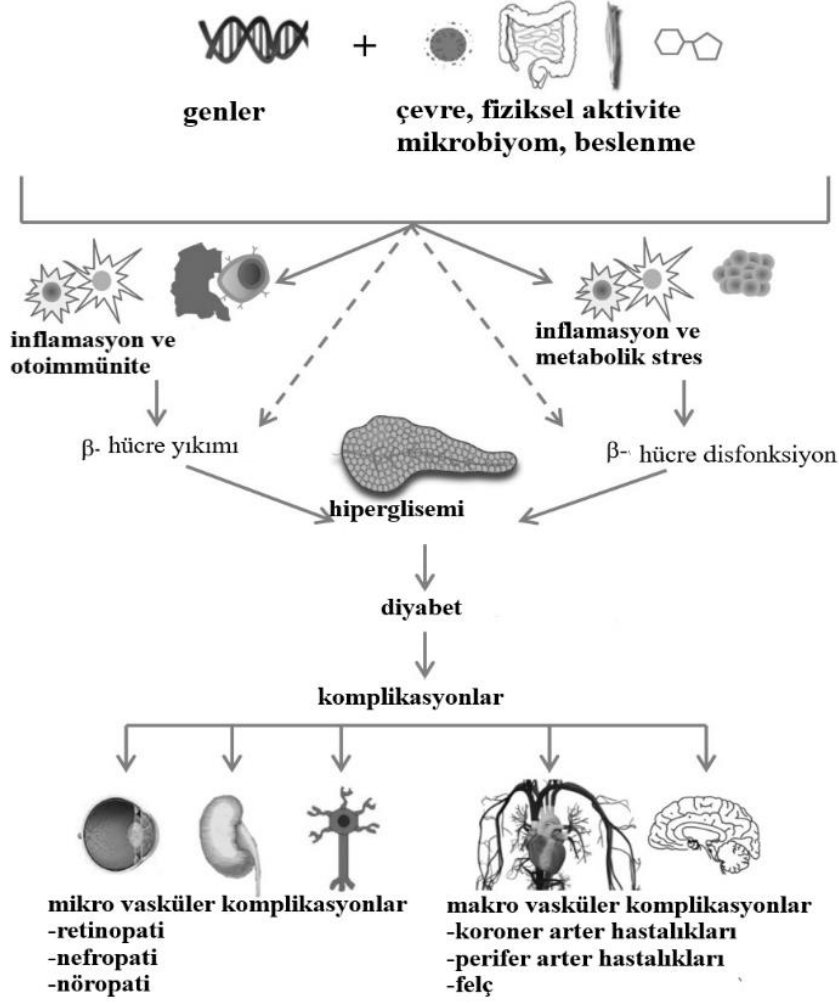
Dört tip sınıflandırma bulunmaktadır. Bunlar tip 1 diyabet , tip 2 diyabet , gestasyonel diyabet ve özel diyabet türleridir. (Şekil.2)

Sınıflandırma	Patogenez
Tip 1 Diyabet	İmmün sistem kaynaklı Nedeni bilinmeyen
Tip 2 Diyabet	İnsülin direnci İnsülin sekresyon yetersizliği
Diğer Türler	<ol style="list-style-type: none"> 1. Beta hücre fonksiyonunun genetik kusurları <ul style="list-style-type: none"> -MODY 3 kromozom 12, HNF 1-a -MODY 2 kromozom 20, HNF 4-a -MODY 1 kromozom 7, glukokinaz -Diğer MODY Formaları MODY 4, MODY 7 gibi - Geçici yeni doğan diyabeti - Kalıcı yeni doğan diyabeti 2. İnsülin etkisindeki genetik kusurlar <ul style="list-style-type: none"> - A tipi insülin direnci - Lipoatrofik diyabet - Cücelik ve diğerleri 3. Ekzokrin pankreas hastalıkları <ul style="list-style-type: none"> - Pankreatit - Neoplazi - Travma ve diğerleri 4. Endokrinopatiler <ul style="list-style-type: none"> - Cushing sendromu - Agromegali ve diğerleri
Gestasyonel Diyabet	

Şekil 2. Diyabet türlerinin sınıflandırılması (Diyabetes Care, Amerikan Diyabet Derneği,2013).

2.1.4. Diyabet Komplikasyonları

Diyabet hastalığı böbrekleri, gözleri, sinir sistemi ve dolaşım sistemini etkileyen kompleks hastalıkları da beraberinde getirmektedir.(Şekil3)



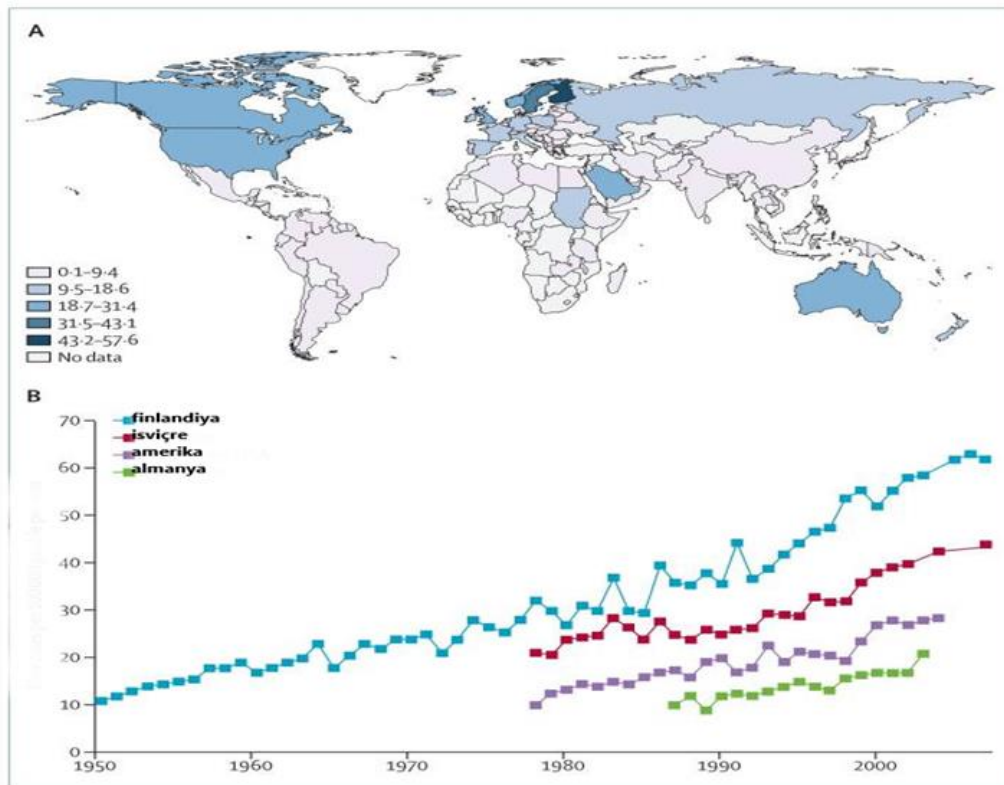
Şekil 3. Diyabet sebepleri ve komplikasyonları (Skyler, ve diğerleri, 2017).

2.1.5. Tip 1 Diyabet Tanımı

Tip 1 diyabetin genellikle, doğrudan bağışıklık aracılı değilse bile , bağışıklıkla ilişkilendirilen, insülin üreten pankreas β hücrelerinin bağışıklık hücreleri tarafından yok edilmesiyle tetiklendiği düşünülmektedir (Todd, 2010). Tarihsel olarak, tip 1 diyabet büyük ölçüde çocuklarda ve ergenlerde bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Ancak bu görüş son on yılda değişmiş ve bu nedenle semptomatik başlangıç yaşı artık kısıtlayıcı bir özellik kabul edilmemektedir. Yüksek hiperglisemi ile birlikte polidipsi, polifaji ve poliüri (hastalığın başlangıcıyla ilişkili klasik semptom üçlüsü), çocuklarda ve ergenlerde ve daha az ölçüde yetişkinlerde tanısal ayırıcı özellikler olmaya devam etmektedir (Leslie, 2010).

2.1.6.1. Tip 1 Diyabet Epidemiyolojisi

Tip 1 diyabet her yaşta teşhis edilebilmesine rağmen çocukluk çağının en sık görülen kronik hastalıklarından birisi olarak yer almaktadır. Prezantasyondaki pikler 5-7 yaşları arasında ve puberte veya buna yakın bir zamanda meydana gelmektedir (Harjutsalo, Sjöberg, & Tuomilehto, 2008). Otoimmün bozuklukların çoğu kadınları orantısız bir şekilde etkilerken, tip 1 diyabet erkeklerde biraz daha yaygındır (Ostman, ve diğerleri, 2008). Tip 1 diyabet insidansı mevsimsel değişikliklere ve doğum ayına göre değişiklik göstermektedir. Sonbahar ve kış aylarında daha fazla vaka teşhis edilmekte ve ilkbaharda doğmak, daha yüksek tip 1 diyabet olma şansı ile ilişkilendirilmiştir (Kahn, ve diğerleri, 2009). Tip 1 diyabetle ilişkili otoimmüitenin gelişimi (yani adacık otoantikorlarının oluşumu), semptomatik tip 1 diyabetin başlangıcından aylar veya yıllar önce de bir miktar mevsimsel uyum göstermektedir. Bu kavramlar, tip 1 diyabette patojenik süreçleri başlatan veya sürdüren bir çevresel ajan için teorik bir rolü desteklemektedir (Kukko, ve diğerleri, 2005).

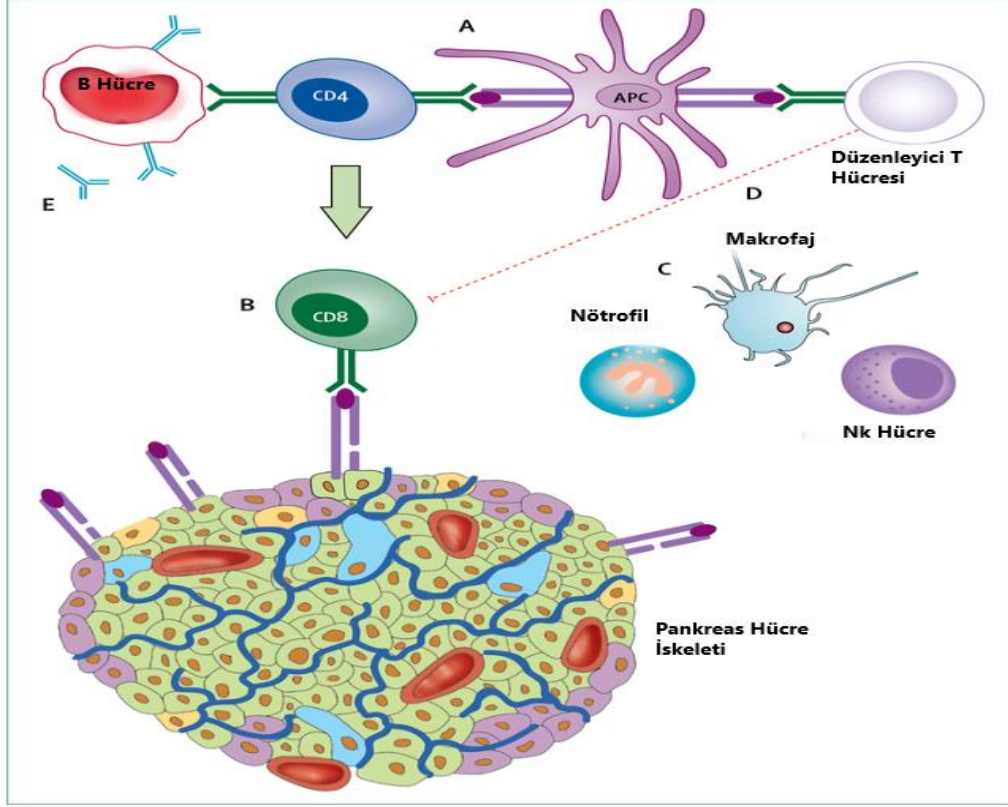


Şekil 4. 0-14 yaş arası çocuklarda coğrafi bölgelere ve zamana göre tip 1 diyabet insidansı (Atkinson, Eisenbarth, & Michels, 2014)

2.1.6.2. Tip 1 Diyabet Patofizyolojisi

Tip 1 diyabetin patogenezi, pankreas β -hücreleri ile doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sistemleri arasındaki karmaşık bir etkileşimden kaynaklanmaktadır (Hull, CM.; Peakman , M.; Tree, T., 2017). Birkaç viral enfeksiyon, tip 1 diyabet ile ilişkilidir ve enterovirüs en sık ilişkili enfeksiyonlardan birisi olarak kabul edilmektedir. Enteroviral majör kapsid proteini (VP1) yeni başlangıçlı tip 1 diyabetli kişilerden alınan pankreas adacık hücrelerinde, sınıf I majör histolojik uyumluluk kompleksinin hiper ekspresyonu ile birlikte tespit edilmiştir (Krogvold, ve diğerleri, 2015).

Tip 1 diyabetin gelişiminin, β -hücre peptitlerinin antijen sunan hücre (APC'ler) tarafından uyarılmasıyla başlatıldığı düşünülmektedir. Bu otoantijenleri taşıyan APC'ler, otoreaktif CD4+ T lenfositleri ile etkileşime girdikleri pankreas lenf düğümlerine göç eder ve bu da otoreaktif CD8+T hücrelerinin aktivasyonuna aracılık etmektedir. Bu aktive edilmiş CD8+ T hücreleri, adacığa geri döner ve majör histo-uyumluluk kompleksi sınıf I yüzey molekülleri üzerinde immünojenik öz antijenleri eksprese eden β hücrelerini lizis etmektedir. β -hücre yıkımı, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinden proinflamatuvar sitokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin salınmasıyla daha da şiddetlenmektedir. Tüm bu süreç, otoimmüniteyi etkin bir şekilde baskılamayan düzenleyici T lenfositlerindeki kusurlarla desteklenmektedir. Pankreatik lenf düğümü içindeki aktive edilmiş T hücreleri ayrıca B lenfositlerini β -hücre proteinlerine karşı otoantikörler üretmesi için uyarmaktadır. Bu otoantikörler dolaşımda ölçülebilir ve tip 1 diyabetin tanımlayıcı bir biyolojik belirteci olarak kabul edilmektedir (DiMeglio, 2018).(şekil.5)



Şekil 5. Tip 1 diyabetin immünopatogenezi (DiMeglio, 2018).

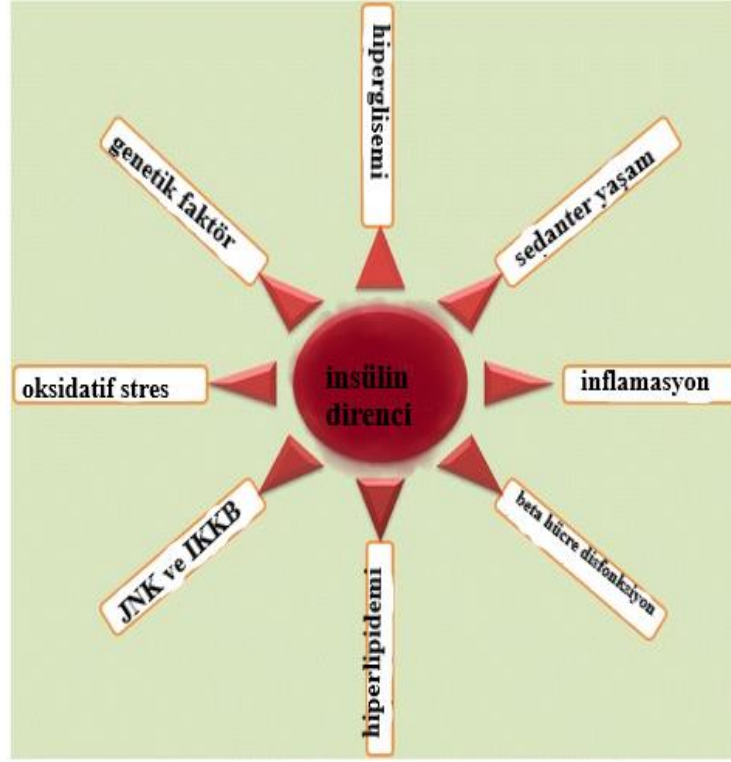
β -hücre anormallikleri tip 1 diyabet patogeneziye katkısı olduğu düşünülmekte ve bu da β -hücre yıkılmasına yol açmaktadır. β -hücre HLA sınıf I aşırı ekspresyonu, tip 1 diyabetli kadavra donörlerinden alınan pankreas bölümlerinde yaygın olduğu gözlemlenmiştir. Bu aşırı ekspresyon, sitotoksik T lenfositleri için bir hedef sinyali olarak etki etmektedir (Kharroubi, AT.; Darwish, HM., 2015). Bununla birlikte, bu sinyalin birincil bir β -hücre defekti mi yoksa bir uyarana (örn. viral enfeksiyon) bir yanıt mı olduğu henüz bilinmemektedir. Ek olarak, hızlandırılmış β -hücre ölümü ile bağlantılı artan β -hücre endoplazmik retikulum stresine ilişkin kanıtlar da mevcuttur (Marhfour, ve diğerleri, 2012). β hücrelerindeki endoplazmik retikulum stresi, mRNA eklemesindeki değişiklikler ve protein translasyonu ve katlanmasındaki hatalarla da ilişkilendirilmiştir.

2.1.7. Tip 2 Diyabet

İnsüline bağımlı olmayan pankreasın beta hücrelerinde insülin duyarsızlığı sonucunda meydana gelen diyabetin bir çeşididir. Tüm diyabet formlarının %90'lık kısmını tip 2 diyabet oluşturmaktadır (Kharroubi, AT.; Darwish, HM., 2015). Obezite , sedanter yaşam formu , beslenme yanlışlıkları gibi özellikler insülin direncini oluşturmaktadır. İnsülin direnci tip 2 diyabetin en önemli metabolik süreçlerinin başında gelmektedir. Çevresel koşullar genetik yatkınlık ise diğer koşulların az bir kısmında yer almaktadır.

2.1.8. İnsülin Direnci

İnsülin direnci, organizmanın bir hücresinin , dokusunun veya vücudunun normal insülin seviyelerine yeterince yanıt verememesi durumudur. Bu da insülinin glikoz ve lipid homeostazını koruma işlevini engellemektedir (Mlinar, 2007). İnsülinin normoglisemi sağlayamaması, β hücrelerinden insülin sekresyonunu daha da artıran kompensatuar hiperinsülinemiye yol açmaktadır. Uzun süre insülin salgılanması pankreas β -hücrelerini tüketir ve apoptoza yol açmaktadır. İnsülin direnci ayrıca karaciğerde glukoneogenezi teşvik etmekte, kaslarda glikoz alımını bozmakta ve yağ dokularında lipolizi indüklemektedir. Yaygın genetik kusurlar, insülin reseptörlerinin, glikoz taşıyıcılarının ve insülin sinyal iletiminde yer alan sinyal proteinlerinin mutasyonlarını ve polimorfizmini içermektedir. İnsülin direncinin edinilmiş nedenleri arasında obezite, fiziksel hareketsizlik, ileri glikasyon son ürünleri (AGE), aşırı serbest yağ asitleri (FFA), psikolojik stres, sigara, alkol alımı veya bazı ilaçlar yer almaktadır (Hotamisligil, 2006).(şekil.6) Tüm bu faktörler, sabit düşük dereceli inflamatuvar koşullarla bağlantılı olmaktadır. İnterlökin-1 beta (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6), tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) veya FFA'ların sürekli yükselmesi, inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler arasındaki salgı dengesini bozmaktadır. Bu, katlanmamış proteinin birikmesine neden olarak katlanmamış protein yanıtının (UPR) aktivasyonuna, endoplazmik retikulum stresinin (ER stresi) indüklenmesine ve insülin duyarlılığını daha da bozan oksidatif strese yol açmaktadır (Khalid, 2021).



Şekil 6. İnsülin direnci gelişme sebepleri (Akash, 2013).

2.1.8.1. İnsülin Direnci Moleküler Yollar

İnsülin salgılanması ve insülin duyarlılığı, sağlıklı bireylerde plazma glikozunun homeostatik konsantrasyonlarını korumak için pankreas β -hücreleri tarafından düzenlenmektedir. Normal fizyolojik koşullar sırasında, β -hücreleri ve insüline duyarlı dokular arasında, karaciğer, iskelet kası ve yağ dokusunun talebine yanıt olarak β -hücreleri tarafından artan insülin gereksinimi ile pozitif bir geriye yanıt döngüsü bulunmaktadır (Cerf, 2013). β -hücrelerinden gelen insülin yanıtının büyüklüğü, insüline yanıt veren dokuların duyarlılığına bağlı olarak değişmektedir (Butler, 2003). İnsülin direnci ile β -hücre disfonksiyonu arasındaki yakın, oldukça karmaşık bağlantı, tip 2 diyabetin patogenezi tetiklemede önemli rollere sahiptir. İnsüline dirençli durumda öglisemiyi sürdürmek ve insülin talebini telafi etmek için β hücrelerinin tükenmesi, durumun patogenezi için kritik öneme sahip olduğu düşünülmüştür (Cerf, 2013).

Hem kemirgenlerde hem de insanlarda, FFA'lar, pankreas β -hücrelerinden G-protein bağlı reseptörlerin aktivasyonuna kadar, özellikle GPR40'a kadar glikoz ile uyarılan insülin sekresyonu için çok önemli bir durumda yer almaktadır (Oh , 2018). Lipotoksisite ve yüksek

FFA'lar ile karakterize edilen insüline dirençli faz sırasında, β -hücrelerinde glikoz aracılı insülin sekresyonunun aşırı uyarılması, artmış β -hücre sinyali ve oksidatif stres ile sonuçlanmakta, bu da beta hücrelerinin metabolik tükenmesine yol açmaktadır (Bergman, 2002). Glikoz, yüksek FFA'lar ile birlikte β -hücrelerinin IRS2 ekspresyonunu artırarak β -hücre kütlesinde bir artışa yol açmakta; bu, insülin direnci için bir düzeltici mekanizma olarak pankreas β -hücrelerinin neogenezi, proliferasyonu ve hayatta kalması ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, ortaya çıkan hiperinsülinemi, β -hücre disfonksiyonuna yol açmaktadır (Itoh, ve diğerleri, 2003). Proinsülin ve insülin split ürünlerinin total immünreaktif insüline göre oranı, sağlıklı bireylere kıyasla β -hücre disfonksiyonlarını yansıtan tip 2 diyabet şeker hastalarında artmaktadır. Pankreas adacıklarında adacık amiloid polipeptidi (IAPP) veya amilin birikimi, β -hücre disfonksiyonunda yer alan diğer patolojik mekanizmalardandır. IAPP birikimi, ağırlıklı olarak β -hücreleri olmak üzere pankreas adacık hücre kütlesinde ilerleyici bir düşüşe neden olmaktadır. Son zamanlarda, gelişmiş glikasyon son ürünleri (RAGE) için reseptör ekspresyonundaki artışın, IAPP'nin baskıladığı β -hücre proteotoksitesine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir, çünkü RAGE, IAPP toksik ara maddelerine bağlanarak bilinen oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozu tetiklemektedir. IAPP ile indüklenen β -hücresi patogenezinde yukarı regüle etmektedir (Abedini, 2018). Ligandların yani AGE ve IAPP toksik ara maddelerinin birikmesi ve bağlanması, RAGE ekspresyonunu yukarı regüle etmekte ve RAGE aracılı hücre içi sinyali iletmekte, bu da adacık iltihabına ve β -hücre apoptozuna yol açmaktadır.

IRS, insülin etkisinin kritik bir aracısı ve insülin sinyal yolunun hem pozitif hem de negatif düzenlenmesi için ana bölgesi olarak bilinmektedir. IRS ailesinde, insülin reseptörü ve hücre içi sinyal kaskadı arasında bağlanma proteinleri olarak işlev gören iki ana protein IRS1 ve IRS2 bulunmaktadır (Rabiee, 2018). Morbid obez ve insüline dirençli kişilerde IRS1'in belirgin şekilde daha düşük ekspresyonu gözlemlenmektedir (Sharma, ve diğerleri, 2021). IRS1'e bağlı insülin sinyal iletimi, tüm vücut metabolizmasını sürdürmek için önemli bir rolü olan iskelet kasında IRS2'ye göre baskın durumda yer almaktadır. İnsülin aracılı IRS tirozin fosforilasyonu, insülin sinyal iletiminde anahtar ara madde durumunda ve insülin direnci baskılayıcıları için ana hedef olarak hizmet etmektedir (François Tanti, 2009). IRS tarafından insülin/IGF-1 sinyallemesinin düzenlenmesi, serin/treonin kalıntılarında fosforilasyonu, fosfataz tarafından defosforilasyonu ve ubiquitin-proteazom yoluyla bozulmayı içermektedir

IRS'nin tirozin fosforilasyonunu takiben, Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) önemli bir efektör moleküldür. PI3K, diğer sinyal proteinleri ile etkileşime girmesini sağlayan serin kinaz aktivitesine sahip bir heterodimer olarak rol oynamaktadır (Wang J. , ve diğerleri, 2017). PI3K, insülin ve büyüme faktörleri tarafından aktive edilen hücre dışı sinyallerin hücre içi faaliyetlere dönüştürülmesinde anahtar bir düzenleyici bölümde yer almaktadır (Wisessaowapak C, 2021). PIP2'nin PIP3'e dönüşümü, insülin sinyal transdüksiyonunu uyararak Akt'nin fosforilasyonundan sorumlu olan PDK1'in alınması için çok önemli bir durumdur. p85 monomeri ve p85-p110 heterodimerinin dengeli ekspresyon seviyesi, PI3K aktivasyonunun kritik bir özelliği olarak yer almaktadır. İnsülin direnci, p85a monomerinin ekspresyonu, p85-p110 heterodimer ile rekabet ettiği ve IRS1'i sekrese ettiği ve PIP3 bozulmasından sorumlu inhibitör proteinlerini aldığı için arttığında insülin direncine aracılık etmektedir. p85 α , PIK3R1 tarafından kodlanmaktadır. PI3KR1'deki mutasyonlar, azalmış PI3K sinyali ve artan tip 2 şeker hastalığı riski ile ilişkilendirilmiştir. Gelişmiş p85 alt birim ekspresyonu ve IRS serin fosforilasyonunun birleşik sonucu, klinik insülin direnci geliştirmek için yeterli olmaktadır. (Goncalves, 2018)

Serin/treonin protein kinaz Akt (protein kinaz B veya PKB)olarak da bilinmekte olup, AGC protein kinaz ailesinin bir üyesi olarak yer almaktadır. Akt, üç homolog izoformdan oluşmakta bunlar Akt1, Akt2 ve Akt3 formlarıdır . Üç izoform, yapısal benzerlikleri paylaşmaktadır ancak çeşitli hedefe özel roller sergilemektedirler (Gao, 2014). Akt'nin tüm izoformları arasında, Akt2, insülin aracılı glikoz alımı ve lipit metabolizmasında en önemli rol alan formudur. Akt yoluyla mTORC1 aktivasyonu, lipolizi baskılamakta ve sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (SREBP) substratını düzenleyerek lipit biyosentezini desteklemektedir. Akt, lipojenik ve glukoneojenik gen ekspresyonunun, özellikle FoxO1 ve FoxO3'ün düzenlenmesinde yer alan çatal uçlu kutu transkripsiyon faktörü (FoxO) proteinlerini etkileşime sokmakta ve fosforile etmektedir. Akt, FoxO1'in nükleustan translokasyonu yoluyla transkripsiyonel aktivitesini azaltmakta, böylece glikoz seviyelerini düşürmektedir (Manning, 2017). Akt, insülin ile uyarılan glikoz alımı, glikojen ve protein sentezi üzerindeki etkisiyle hücre hayatta kalmasında ve büyümesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Çalışmalar, IP6K1'i silinmiş fare fenotipinin, vahşi tipine kıyasla gelişmiş Akt aktivitesi, sürekli insülin duyarlılığı ve obeziteye karşı direnç gösterdiğini göstermiştir (Zhu, ve diğerleri, 2016). Düzensiz inositol metabolizması Akt inhibisyonuna yol açmakta ve hiperglisemi ve insülin direnci ile ilişkilendirilmektedir. Akt1 veya Akt2 izoformunun yıkılmasının veya tükenmesinin glikoz intoleransına, insülin direncine ve diyabet benzeri

semptomlara neden olduğu hem insan hem de hayvan araştırmalarından açıkça gösterilmiştir. PI3K/Akt/AS160 sinyalleşmesindeki herhangi bir kusur sonunda insüline duyarlı dokularda glikoz alımını azaltarak ve insülin direncine yol açtığı düşünölmektedir.

Akt'nin insülin-IRS aracılı aktivasyonu, sırasıyla iki temel bileşeni fosforile eden mTORC1'in dolaylı aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Fosforilasyon üzerine, 4EBP1'in eIF4E'den ayrılması, eIF4E'nin protein sentezine yol açan 5 ' başlığa bağlı mRNA translasyonunu teşvik etmesine izin vermektedir. S6K1'in mTORC1 tarafından aktivasyonu sadece mRNA biyogenezinde ve translasyon başlangıcında bir artışa yol açmaz, aynı zamanda IRS'nin serin/treonin fosforilasyonu yoluyla insülin sinyalleşmesinin negatif geri besleme düzenlemesinde rol oynamaktadır, bu da sonuçta IRS tükenmesine yol açmaktadır (Liang, 2019). Aşırı beslenme veya obezite durumunda olduğu gibi mTORC1'in aktivasyonu, IRS bozulması yoluyla negatif bir geri besleme döngüsü yoluyla insülin direncine yol açmaktadır. S6K1 eksikliği olan farelerde yürütölen bir çalışma, farelerin yüksek yağlı diyet (HFD) koşulları altında insülin direncine karşı korunduğunu göstermiştir; bu, IRS1'in serin fosforilasyonu yoluyla S6K1'den negatif düzenlemenin kaybında belirginleşmiştir. mTOR yolu, hücrel büyüme ve proliferasyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Diyete bağlı obezite ve insülin direncinin başlıca nedeni, serin kalıntılarında IRS1'in fosforilasyonu yoluyla negatif geri besleme düzenlemesi yoluyla insülin sinyalini aşağı regöle eden mTOR'un aşırı aktivasyonun bir sonucu olarak yer almaktadır (Robert A Saxton, 2017).

AMPK, azaltılmış FAO yoluyla akut proinflatuar yanıtların inhibitörü olduğu için genellikle vücuttaki insülin duyarlılığının artması ve insülin direncinin azalması ile ilişkilendirilmiştir. Hem kemirgenlerde hem de insanlarda AMPK düzensizliği ile insülin direnci arasında yakın bir bağlantı kurulmuştur. AMPK, insülinde bağımsız bir mekanizma yoluyla kasılmaya neden olan GLUT4 translokasyonuna ve glikoz alımına aracılık etmektedir. Hücrel enerji sensörü Sirtuin1 ve AMPK birbirini etkilemektedir. AMPK, Sirtuin 1'den önce gelir ve her ikisi de insülin direncine, oksidatif strese, ER streslerine ve inflamasyona karşı adaptif yanıtların sorumluları durumunda yer almaktadır (Ruderman , ve diğerleri, 2010). AMPK, egzersiz ve kalori kısıtlaması ile aktive edilebilmekte ve aksine, yüksek glikoz maruziyetine yanıt olarak aşağı regöle edilebilmektedir. AGE, RAGE aracılı bir AMPK aşağı regölasyonu yoluyla iskelet kasında glikoz alım bozukluğunu indölemektedir . AGE reseptörü 1 (AGER1), Sirtuin 1 ve AMPK arasında pozitif bir etkileşim vardır. Kombine etkileri, AGE'yi bloke etmekten, birbirlerinin ifadesini

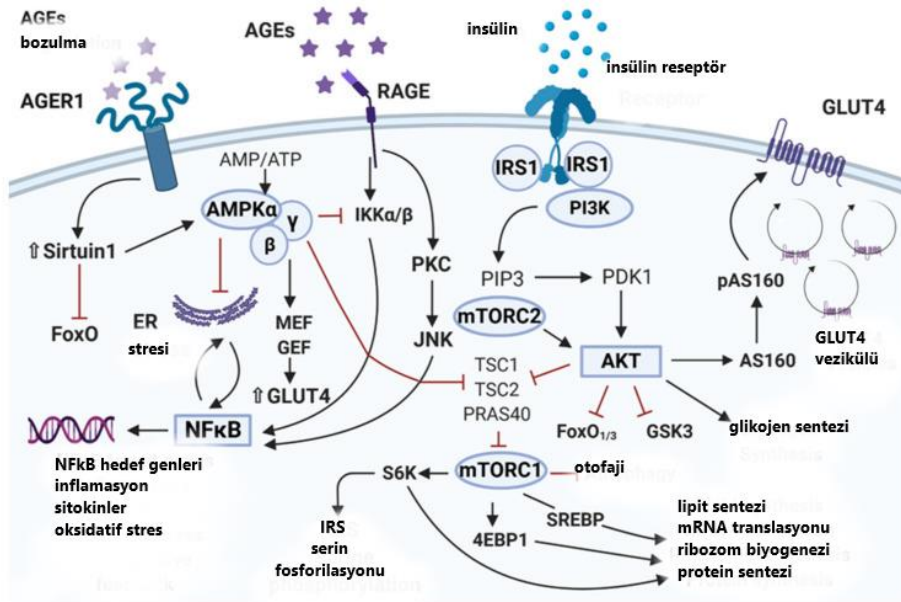
sürdüremekten ve redoks dengesizliğinin zararlı etkilerine karşı bir kalkan sağlamaktan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, AMPK ve Sirtuin 1 aktivasyonu, insüline dirençli bir durumda glikoz homeostazını sürdürmek için etkili olduğu düşünülmüştür (Mackenzie, 2014).

İnsülin hedef dokularında eksprese edilen TLR4, insülin direnci ve inflamasyonun gelişmesinde aktif bir rol oynamaktadır. TLR4, proinflamatuvar genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek ve proinflamatuvar kinaz JNK, IKK ve p38'i aktive ederek obezite sırasında metabolik inflamasyonu ve insülin direncini tetiklemektedir. Bu kinazlar, insülin reseptör substratının (IRS) serin rezidüleri üzerindeki inhibitör fosforilasyonu yoluyla, insülin sinyal iletimini bozmaktadırlar (Benomar, 2019). Yapılan çalışmalar, TLR4'ün lipit kaynaklı inflamatuvar yolları insülin etkisinin antagonizmine bağlayan seramid biyosentezinin yukarısında yer aldığını ortaya koymaktadır.

KC yoluyla insülin direncini indükleyen JNK ve IKK'nın aktivasyonu, aktive edilmiş inflamatuvar sinyal yollarının bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. JNK'nın insülin direncini ve tip 2 diyabeti indüklemeye merkezi bir rolü olduğunu destekleyen veriler bulunmaktadır. Yüksek yağlı bir diyetle maruz bırakılan JNK1 nakavt fareler, diyetle bağlı obeziteye karşı uzun vadeli metabolik koruma sağlamakta ve normal bir yaşam süresi ile belirgin şekilde iyileştirilmiş insülin duyarlılığı sergilemektedirler (Becattini, ve diğerleri, 2016). JNK'nın insülin sinyalleşmesine doğrudan katılımı, IRS1'in insülin reseptörü ile etkileşimini engelleyen ve onun tirozin fosforilasyonunu kısıtlayan Ser 307'deki IRS1 üzerindeki JNK fosforilasyon bölgesi aracılığıyla gerçekleşmektedir.

IR, pankreas adacıklarının β -hücrelerinden insülin üretiminin artmasına neden olmakta ve sonuç olarak vücutta hiperinsülinemi oluşmaktadır. Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), IR'nin ve komorbiditelerinin önemli modülatörleridir. Kronik inflamasyon, insülin sinyal yollarının temel bileşenlerinin normal işleyişine doğrudan müdahale eden çeşitli sinyal yollarının aktive edildiği çeşitli insülin direnci durumlarında çok önemli bir rol oynamaktadır. Çeşitli yollar arasında TLR'lerin aktivasyonu, iltihaplanma oluşumu için çok önemli bir rol oynamaktadır. İki ana TLR türü vardır, bunlar TLR2 ve TLR4 tür. TLR4, pankreas adacıkları, beyin, karaciğer iskelet kası ve yağ dokularının β -hücrelerinde eksprese edilen bir hücre dışı hücre yüzeyi reseptörü olarak bilinmektedir (Kim, 2010). Normal koşullarda, TLR4, bu dokulardaki insülin duyarlılığını düzenlemektedir, ancak TLR4'ün aktivasyonu, çeşitli proinflamatuvar mediatörlerin ve ROS'un aktivasyonu yoluyla insülin etkisini doğrudan azaltmaktadır, dolaylı olarak çeşitli sinyalizasyon basamaklarını

indükleyerek çeşitli proinflatuar mediatörlerin aktivasyonunu üretir ve transkripsiyonel faktörler özellikle MyD88, TIRAP, TRIF, IKK'ler ve JNK'ler, sonuçta IR gelişimine yol açan doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin aktivasyonuna neden olmaktadır (Kim, 2010). Lipopolisakarit (LPS) ve onun endotoksik kısmının TLR4'ün potansiyel aktivatörleri olduğu bilinmektedir (Akash MSH ve diğerleri,2013). LPS, oligosakaritler ve açılmış doymuş yağ asitlerinden (SFA) oluşmaktadır. LPS'nin yanı sıra, SFA'ların da TLR4'ün aktivatörü olduğu bilinmektedir. TLR4'ün ekspresyonu ve sinyalizasyonu esas olarak adiponektinler tarafından düzenlenmektedir. Birkaç çalışma, adiponektinin, AMPK, IL-10 ve hemeoksijenaz-1'in katılımı yoluyla LPS'nin indüklediği TLR4 aktivasyonunu engelleyebileceğini göstermektedir (Yamaguchi, 2005).



Şekil 7. İnsülin sinyalinin düzenlenmesindeki moleküler yollar (Khalid, 2021).

Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, doğrudan IKK/NF-κB, JNK yollarını uyarmakta ve mitokondri kaynaklı stres tepkileri yoluyla hücrenin yapısına zarar vermektedir. Mitokondriyal bozulmaların etkisi, mitokondriyal biyogenez peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör-gama koaktivatörü 1α'nın (PGC-1α) temel düzenleyicisinin aşağı regülasyonuna yol açarak ve mitokondriyal apoptoz duyarlılığını arttırmaktadır (Wang D. , ve diğerleri, 2020). FFA'ların kronik yükselmesi, protein kinaz C, IKK/NF-κB, JNK yolları, ER stresi, redoks dengesizliğinin aktivasyonu yoluyla iltihaplanma ile bağlantılı olmaktadır ve hücre içi sinyalleşmede düzensizlik ile

sonuçlanmakta olup bu da insülin direncinin patolojik durumuna yol açmaktadır (Xu, ve diğerleri, 2003).

2.1.9. Gestasyonel Diyabet Tanımı

Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM), karbonhidrat intoleransı, hiperglisemi, periferik insülin direnci, yetersiz insülin sekresyonu veya aktivitesi, endotel disfonksiyonu ve düşük dereceli inflamasyon ile karakterize, sıklıkla 24-28. gebelik haftaları arasında görülen geçici bir durumdur (Practice Guideline, 2018).

2.1.9.1. Gestasyonel Diyabet Epidemiyolojisi

Gestasyonel diyabet prevalansı, dünya çapında değişmekte olup %1 ile %30 arasında değişiklik göstermektedir. 2005 ve 2018 yıllarını kapsayan GDM prevalansını bölgesel olarak gösteren kapsamlı bir çalışma yapılmıştır. Prevalansı en yüksek ülkeler doğu ve bazı kuzey afrika ülkeleridir. En düşük ve en geniş GDM prevalansı ise Avrupa yer almaktadır (Zhu Y. , 2016).

2.1.9.2. Gestasyonel Diyabet Risk Faktörleri

Epidemiyolojik çalışmalar, ileri anne yaşı, etnik köken, önceki gestasyonel diyabet öyküsü ve ailede tip 2 diabetes mellitus (T2DM) öyküsü gibi bir dizi GDM risk faktörünü tanımlamıştır.

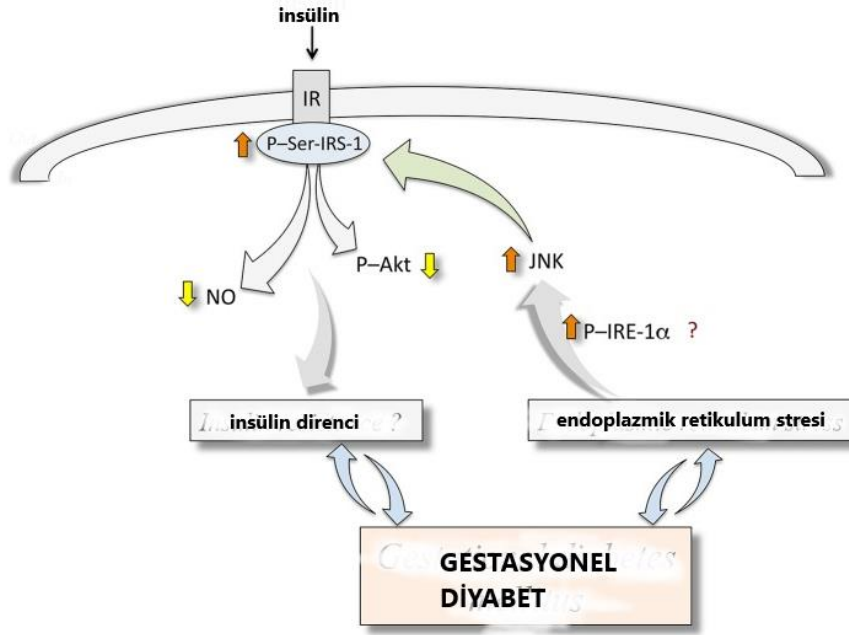
2.1.9.3. Gestasyonel Diyabet Patofizyolojisi

GDM patofizyolojisinde ilk olarak maternal insülin direnci akla gelmektedir. Fakat sonraki yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar inflamasyon, plasental ve entodel disfonksiyonel

bozukluklarında GDM patolojisinde yer alması gerektiğini desteklemektedir. Bunların dışında endoplazmik retikulum stresi de GDM patolojisini oluşturan inflamasyon , insülin direnci gibi bozuklukları oluşturduğu için GDM patolojisinde değerlendirilmesi gerekmektedir.

2.1.9.3.1. Maternal İnsülin Direnci

İnsülin direnci GDM patogenezindeki ilk değişikliklerden birisidir. İnsülin, bilinen iki reseptör izoformu aracılığıyla etki etmektedir: insülin reseptörü A (IR-A) ve insülin reseptörü B (IR-B). Bunlar, insüline bağlanan hücre dışı bir α -alt biriminden ve insülin reseptörü substratı 1'e (IRS-1) bağlanan bir hücre içi β -alt biriminden oluşan heterodimer reseptörleridir. Her iki izoform da aynı INS geninin transkriptleridir. Bununla birlikte, IR-A ürünü, ekson 11'in alternatif eklenmesinin bir sonucu olarak α -alt biriminin C-terminalinde 36 nükleotitlik bir diziden yoksundur. Buna karşılık, IR-B, INS geninin tam transkripsiyonunun sonucudur. İnsülinin IR-A'ya afinitesi IR-B'ye göre daha yüksektir. Ek olarak, IR-A, Ras-Raf-mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) kademesini aktive ederken, IR-B, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) ve protein kinaz B (Akt) sinyalini aktive etmektedir (Westermeier , ve diğerleri, 2016). Transgenik fare çalışmasında IRS-1 serin fosforilasyonunun insülin direncinin gelişmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir(Şekil.8).



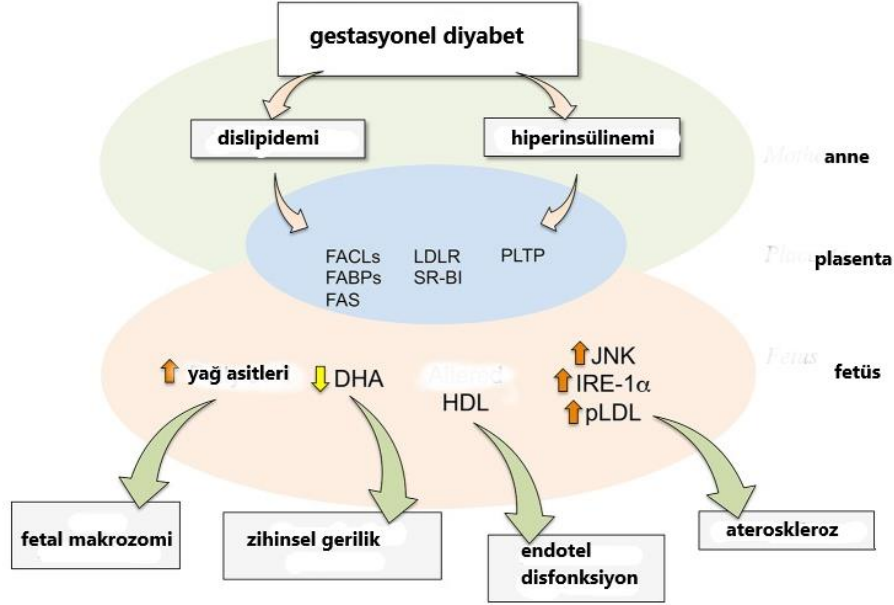
Şekil 8. Gestasyonel diyabet insülin direnci oluşumu (Sobrevia , ve diğerleri, 2016).

2.1.9.3.2. İnflamasyon

Proinflamatuvar sitokinlerin artması erken gebeliklerde meydana geldiği ve bunu üçüncü trimesterde insülin direncinin izlediği belirtilmiştir. Bu nedenle proinflamatuvar sitokinlerin insülin direncinin gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. GDM’de dolaşımdaki yüksek düzeydeki sitokinler TNF-a ve IL-6 ve düşük seviyelerdeki anti-inflamatuvar sitokinler IL-10 ve IL-4 belirlenmiştir. İn vitro çalışmalarda GDM ‘li yağ dokusunun normal gebelerin yağ dokusuna kıyasla farklı inflamatuvar profilde olduğu gösterilmiştir. Adipoz doku GDM patolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Adiponektin ifadesi GDM’li yağ dokusunda artmış iken normal gebeliklerde normal seviyededir (Lappas , 2005).

Plasental sitokin üretiminin gebeliğin sürdürülmesi için kritik olduğu iyi bilinmektedir. Sinsityotrofoblastlar ve Hofbauer hücrelerinin, implantasyondan doğuma kadar gebeliğin çeşitli aşamalarında gerekli olan sitokinleri salgıladıkları bilinmektedir. Plasentanın obezite ve GDM’li kadınlarda inflamasyona aracılık etmede aktif rol oynadığı öne sürülmüştür. Obeziteye karşı adaptif bir yanıtta plasentanın yapısı ve işlevi değişebilir ve plasenta bu gebeliklerde bir hedef ve inflamatuvar sitokin kaynağı olarak hareket etmektedir. Obez kadınların IL-1, TNF-α ve IL-6 mRNA ekspresyonunda bir artış ile

karakterize edilen plasental makrofajların sayısında 2-3 kat artış bildirilmiştir (Lappas , 2005).



Şekil 9. Gestasyonel diyabet anne ve fetüs etkileri (Sobrevia , ve diğerleri, 2016).

2.1.9.3.3. Plasental ve Endotel Disfonksiyon

Plasenta anne ve fetüs arasındaki besin alışverişini gerçekleştiren önemli bir organdır. Fetüs glikozu plasenta aracılığı ile maternal dolaşımdaki glikozu kullanmaktadır. Bunun için maternal insülin dokuları glikoz alımını azaltarak bu glikozun fetüse transferine izin vermektedir. Plasentada GLUT1 izoformu sinsityotrofoblast hücrelerinde lokalize durumda yer almaktadır ve maternal dolaşımdaki glikozu kullanmada etkili olduğu düşünülmektedir. Diğer yandan GLUT3 izoformu plasenta endotel hücrelerinde lokalizedir ve fetüse glikoz transferinde görevli olduğu düşünülmektedir. GDM’li plasenta trofoblast hücrelerinde GLUT1 ekspresyonu artmakta ve bu da glikoz alımının artmasına yol açmaktadır. Diğer yandan GLUT3 ekspresyonu da artmaktadır. Trofoblastlarda görülen bu glikoz artışları proinflamatuvar yolları da aktive edebilmektedir. Plasenta disfonksiyonunda artan glikoz ihtiyacına bağlı olarak GLUT3 ekspresyonundaki artışın inflamatuvar süreci başlattığı bununda plasenta disfonksiyonu etkilediği düşünülmektedir.

Endotel disfonksiyonu vazokonstriksiyon ve vazodilatasyon arasındaki bir dengesizlik durumudur. Normal gebelikte periferik vasküler direnç azalırken uteroplasental kan akışını artıran vazodilatasyon ile karakterizedir. Fakat GDM’de plasentaya kan akışını kontrol eden arterlerde endotel disfonksiyon etkilenmiştir. GDM plasentasında bozulan disfonksiyonda oksidatif stres belirteçleri ile nitrik oksit düzeylerinde artış gözlemlenmiştir (Casanello, 2007). GDM’li gebelerin yağ dokusundaki vasküler adezyon molekülü olan VCAM-1 ve hücre arası adezyon molekülü 1-CAM gibi endotel disfonksiyon belirteçleri arttığı gözlemlenmiştir (Mordwinkin, ve diğerleri, 2013).

2.2. Endoplazmik Retikulum

2.2.1. Tanımı

Endoplazmik retikulum (ER), ilk olarak tavuk fibroblast benzeri hücrelerde elektron mikroskopu kullanılarak görüntülenen ve 'sitoplazma boyunca uzanan hassas bir dantel işi' olarak tanımlanan hücresel bir organeldir (Porter, 1945). ER, sitoplazmanın büyük bir alanını kaplayan uzun tübüller ve düzleştirilmiş disklerden oluşan membranöz bir ağ olarak görünmektedir. Bu zar, ER lümenini çevreler ve moleküllerin sitoplazmaya ve sitoplazmadan transferine izin vermektedir (Porter, 1945).

2.2.2. Yapısı ve İşlevi

ER sitozole bakan zarın üzerinde ribozom bulundurup bulunmamasına göre granüllü endoplazmik retikulum ve granülsüz endoplazmik retikulum olarak ikiye ayrılmaktadır. ER diğer organellerle temas halindedir. Üzerindeki zarı kıvrım şeklinde ve birbirine uzanarak nükleus zarının üzerinde yer alır.

ER, birçok farklı hücresel işlevde yer almaktadır. Bir protein sentez fabrikası görevi görür, kalsiyumun depolanmasına ve düzenlenmesine, lipidlerin sentezine ve depolanmasına ve glikoz metabolizmasına katkıda bulunmaktadır (Alberts, 2002). Yanlış katlanmış proteinler potansiyel olarak hücre fonksiyonuna zararlıdır ve bu nedenle sıkı bir şekilde

kontrol edilmektedir. Protein yanlış katlanması sürekli olarak gerçekleşse de olumsuz içsel ve çevresel koşullar sırasında şiddetlenebilmektedir. ER, yanlış katlanmış proteinleri düzeltmek veya son olarak yanlış katlanmışsa hücre tarafından atılmak için ek fırsatlar olduğundan emin olmak için kalite kontrol sistemleri geliştirmiştir. Terminal olarak yanlış katlanmış salgı proteinleri, ER ile ilişkili bozunma (ERAD) olarak adlandırılan bir süreçle elimine edilmektedir (Meusser, 2005). Proteinler önce ER'de yerleşik luminal ve transmembran proteinleri tarafından tanınır, ardından dislocon ve sitozolik AAA+ ATPase p97 adlı bir kanal tarafından sitozole retrotranslokasyon yapılır (Hebert , 2010). N- glikanaz tarafından deglikozile edilmiş ve ubikuitin-proteazom yolu yoluyla parçalanmayı hedeflemiştir. ER ayrıca membran üretimi, lipid damlacıkları/vezikül oluşumu ve enerji depolaması için yağ birikiminde önemli roller oynar. Lipit sentezi, membran arayüzlerinde ve organel temas bölgelerinde lokalizedir ve lipid damlacıkları/veziküller, düzenlenmiş bir şekilde taşınmaktadır. ER, değişen hücrelipit konsantrasyonlarına uyum sağlamak için membran yapısını dinamik olarak değiştirmektedir. ER, kolesterol homeostazını sağlayan kolesterol sensörlerinin sterol düzenleyici element bağlayıcı protein ailesini içermektedir. Bu bölme ayrıca hücre zarı lipid bileşenlerinin, yani steroller, sfingolipidler ve fosfolipidlerin sentezini katalize eden enzimlere de içerisinde bulundurmaktadır. Yağlı açıl-CoA ve diasilgliserollerden bu lipidlerin sentezi , mevalonat/izoprenoit yolunun hız sınırlayıcı enzimi olan 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A redüktazı da barındıran ER zarında gerçekleşmektedir (Yen, 2008). Sterol ve izoprenoid öncülleri üretebilmektedir (Jo, 2010). ER membran lokalize enzimler tarafından yapılan öncüller daha sonra yapısal lipitlere, sterollere, steroid hormonlarına, safra asitlerine, dolikollere, prenil donörlerine ve hücre metabolizması için temel işlevlere sahip sayısız izoprenoid türe dönüştürülmektedir. ER'de sentezlenen proteinlerin ve lipidlerin çoğu, çoğunlukla salgı yolu yoluyla meydana gelen diğer hücrelipit yapılarına taşınmaktadırlar. Sabit anabolik akışı sürdürmek için, taşınmanın sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekir ve salgılamadaki kusurlar ER için ciddi yapısal ve işlevsel sonuçlara yol açabilmektedir. Bu taşıma sürecinin merkezinde, onları şekillendiren ve kaplayan protein ailesinden adını alan ER COPII taşıma veziküllerinin üretilmesi yer almaktadır (Barlowe , ve diğerleri, 1994). COPII vezikül taşınmasına ek olarak, lipid dışı aktarımının birkaç başka mekanizması da tanımlanmıştır. Çeşitli lipidler, veziküller olmayan mekanizmalarla taşınabilir; örneğin, büyük lipoprotein yükünün ER'den prekilomikron taşıma vezikülleri olarak adlandırılan başka bir vezikül tipinde taşındığı veya lipid damlacıklarında biriktiği gösterilmiştir. Ca^{+2} , gen ekspresyonu, protein sentezi, hücre proliferasyonu, farklılaşması, metabolizma veya apoptozda temel bir rol oynayan birçok

hücre içi ve hücre dışı sinyal ağlarında ikincil bir haberci olarak yer alır (Clapham, 2007). ER, Ca^{+2} depolaması için ana hücrel bölme olarak, Ca^{+2} seviyelerinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar ve karşılıklı olarak birçok ER işlevi Ca^{+2} 'ya bağımlı bir şekilde kontrol edilmektedir, böylece tüm hücrenin kalsiyum homeostazını düzenlenmektedir (Meldolesi, 1998). Sonuç olarak hem ER hem de sitozolik Ca^{+2} ER'in sitoplazmadan çok daha yüksek fizyolojik intraluminal Ca^{+2} konsantrasyonunu ve oksitleyici redoks potansiyelini muhafaza etmesi için konsantrasyonların düzenlenmesi gerekmektedir. Bu seviyeleri modüle etmek için ER, zarın her iki tarafında Ca^{+2} konsantrasyonunu kontrol eden bir dizi mekanizma kullanır : (a) ER zarı sitozolden lümene taşıma için ATP'ye bağımlı Ca^{+2} pompaları; (b) Serbest Ca^{+2} yı ayırmak için ER luminal Ca^{+2} bağlayıcı şaperonlar ; ve (c) Ca^{+2} 'nın düzenlenmiş salınımı için ER membran kanalları sitozole girer. Bu mekanizmalar, ER ile PM ve mitokondri gibi diğer organeller arasındaki sıkı bir iletişim ile kolaylaştırılır ve böylece hücre ihtiyaçlarını desteklemektedir.

2.2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi

ER stresine yanıt olarak hücreler, protein sentezini azaltarak, katlanmamış/yanlış katlanmış proteinleri temizleyerek ve ER'in kapasitesini artırarak hücrelerin stresle başa çıkmasına yardımcı olan katlanmamış protein yanıtı (UPR) adı verilen uyarlanabilir bir sinyal yolunu tetikler.

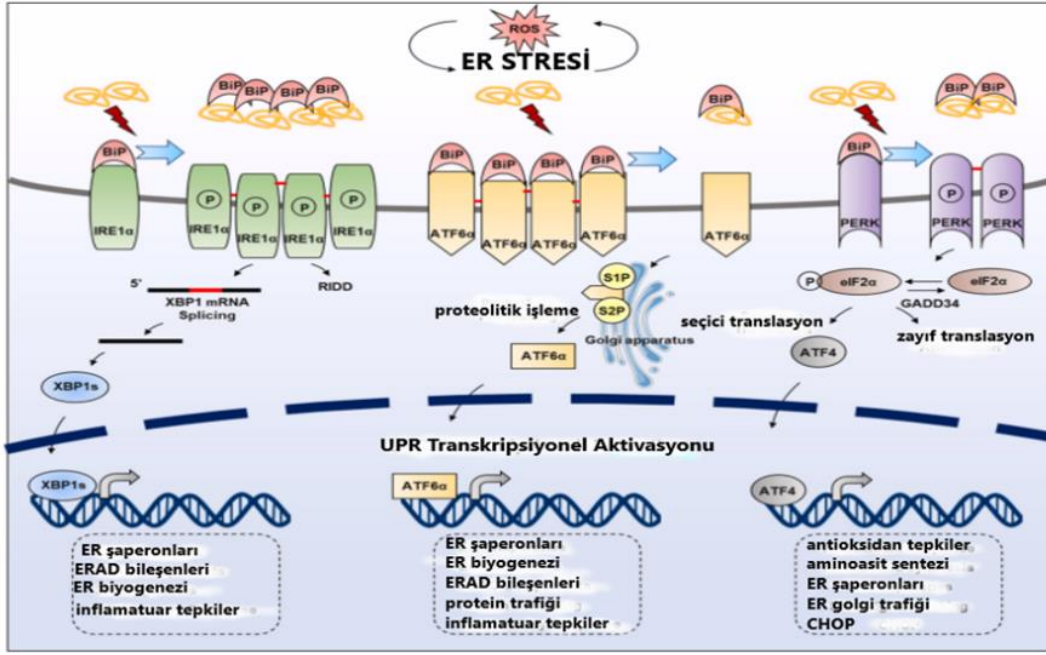
UPR, ER'de bulunan üç sinyal dönüştürücünün uyarılmasıyla başlatılan birbirine bağlı sinyal yollarından oluşan karmaşık bir ağdan oluşmaktadır. ER'i kapsayan başlıca transmembran proteinleri olan bu sensörler, her biri fizyolojik koşullar altında ER şaperon BiP tarafından bağlanan, monomerik, aktif olmayan durumlarda kilitlenen IRE1 α , PERK ve ATF6 α ' proteinleridir (Ruiz, 2017). ER stresinin artmasıyla bu bağlanmalar bozulur ve üç protein aktif duruma geçmektedir. Aktive edilmiş IRE1a, oligomerizasyondadır ve RNAaz aktivitesinin gerçekleştirilmesini kolaylaştırmak için kinaz aktivitesi nedeniyle kendi başına otoposforile edilmektedir. IRE1a, X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1) mRNA'nın 26 nükleotidlik bir intronunu özel olarak birleştirmektedir. Eklenen mRNA, güçlü bir transkripsiyon faktörü olan ve daha sonra ER protein kontrolü ve ERAD yolunun düzenlenmesinden sorumlu ilgili genlerin transkripsiyonunu başlatmak için çekirdeğe transloke edilen spesifik bir protein olan XBP1s'e çevrilmiştir (Maurel , 2014). IRE1 α 'ya

benzer şekilde, PERK, ER stresi sırasında oligomerizasyon ve otofosforilasyona uğramaktadır. Aktive edilmiş PERK, anormal ER geri kazanımı için protein sentezinin geçici olarak aşağı regülasyonunu sağlamaktadır. ATF4 ayrıca hücre ölümü indüksiyonunda yer alan CAAT/arttırıcı bağlayıcı protein (C/EBP) homolog proteininin (CHOP) ekspresyonunu da indüklemektedir. DNA hasar geni 34'ün (GADD34), eIF2a'nın fosforilasyonunu indükleyerek PERK sinyalinin oluşmasını etkileyebilmektedir (Novoa, 2001).

Aktive edilmiş ATF6 α , Golgi'de yerleşik iki proteaz, site-1 ve site-2 proteazları (S1P ve S2P) tarafından ayrılarak Golgi aygıtına taşınmaktadır. ATF6 α , IRE α ve PERK sinyalleşmesinde yer alan UPR gen ekspresyonunu (XBP1 ve ATF4 dahil) teşvik etmek için çekirdeğe yer değiştiren bir transkripsiyon faktörü görevi görmektedir (Yamamoto, ve diğerleri, 2007).

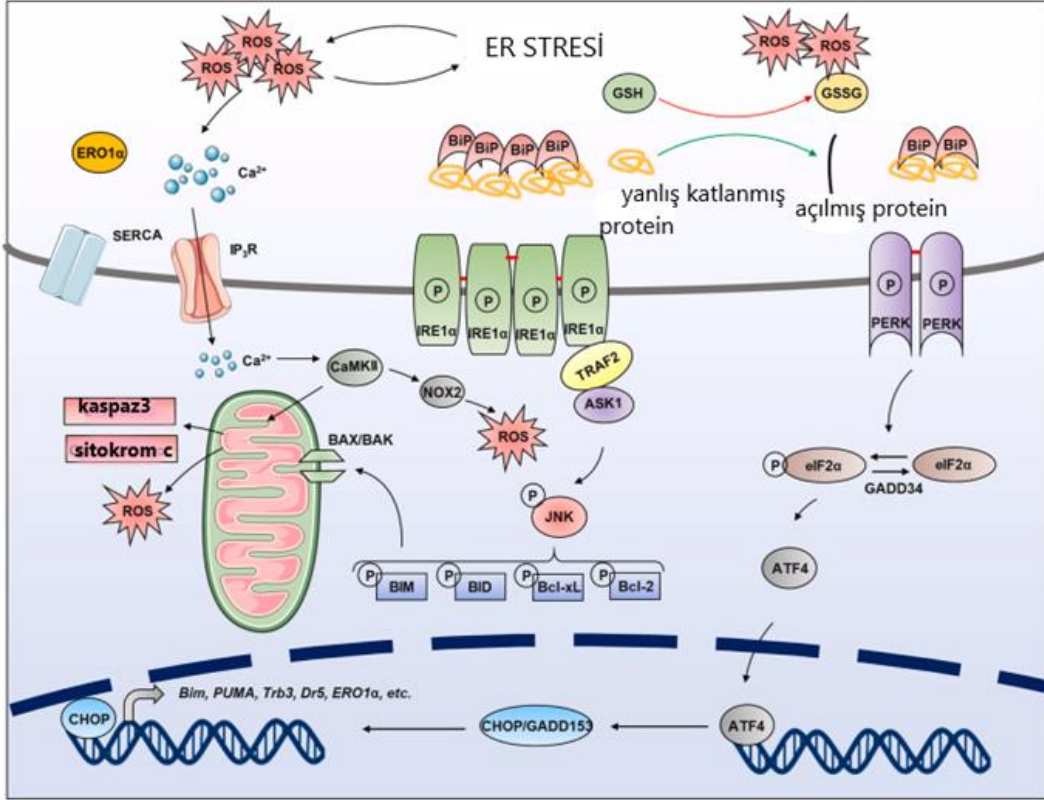
Serbest bırakılan ER sensörleri, ER homeostazını eski haline getirmek için UPR'yi aktive etmektedir. Böylece hücre büyümesini ve hayatta kalmasını sağlayabilmektedir. Adaptif yanıtlar, protein katlama homeostazını yeniden sağlamada başarısız olursa, UPR sinyali devam eder ve nihayetinde apoptozu destekleyen “terminal UPR” adı verilen alternatif sinyalleme programlarına dönüşmektedir. Artan kanıtlar, UPR'nin, antioksidan yanıt, otofaji, apoptoz veya ferroptoz, vb. dahil olmak üzere birçok önemli hücresel süreci içeren hücre ölümü veya hayatta kalma belirlemede çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Esas olarak disülfidin bir yan ürünü olarak üretilen ROS bağ oluşumu, ER lümenindeki stres sensörleri tarafından algılanabilir ve UPR sinyal yolunu modüle edebilir. Bu nedenle, ER/redoks sinyal yolunun entegre durumu, hücrenin durumunu ve kaderini belirlemek için hücrelerin çevreleriyle başa çıkma yeteneğinin önemli ve karmaşık bir özelliğini göstermiştir

PERK, eIF2a'yı fosforile etmektedir, böylece protein translasyonunu baskılamaktadır. Bu durum ATF4 translasyonunu uyarmaktadır . ATF4 ise daha sonra bir bZIP transkripsiyon faktörü olan CHOP'un transkripsiyonunu desteklemektedir . CHOP, hem anti-apoptotik protein Bcl-2'yi aşağı regüle ederek hem de proapoptotik proteinler BIM ve PUMA'yı transkripsiyonel olarak yukarı regüle ederek apoptozu indükleyebilmektedir. Bu nedenle, bu pro-apoptotik proteinler, sitokrom c salınımını indükleyerek ve kaspaz kaskadını aktif hale getirmektedir (Galehdar , ve diğerleri, 2010).



Şekil 10. UPR yolu (Zhang , ve diğerleri, 2019).

ER stresi ile apoptozun redoks regülasyonu arasındaki en doğrudan ilişki, birçok ROS formunun ER protein katlanmasını bozabilmesi ve ER stresini indükleyebilmesidir. ROS'un en yaygın formu olan (H_2O_2) gibi, UPR'yi apoptoza neden olacak şekilde uyarabilmektedir. Farelerde GPx7 kaybı, oksidatif stresin neden olduğu doku hasarına ve apoptoza, artan tümör oluşumuna neden olmaktadır. Önemli bir ROS kaynağı olarak ER'de disülfid bağı oluşumunun rolü göz önüne alındığında, ER'de protein yanlış katlanması oksidatif strese katkıda bulunabilmektedir. ER protein katlanmasının mikro çevresi ciddi şekilde bozulduğunda, boş bir disülfid bağı oluşumu ve azalması döngüsü, büyük miktarda ROS üreterek ve sonunda apoptoza yol açan ER GSH seviyelerini aşağı yönde azaltarak oksidatif strese yol açabilmektedir. $ERO1\alpha$, Ca^{+2} aktive eden ER'den inositol-1,4,5-trifosfat reseptörü (IP_3R) aracılı Ca^{+2} geçişine neden olur ve sitozolde kinaz CaMKII'yi algılayarak, Fas ve mitokondriyal membran geçirgenlik geçişi dahil proapoptotik yolların aktivasyonuna yol açmaktadır (Chang, ve diğerleri, 2013). CaMKII ayrıca NADPH oksidaz alt birimi NOX2'yi oksidatif strese neden olmak üzere indüklemektedir, bu da ER stresi sırasında pozitif bir ileri besleme döngüsü olarak PKR'ye bağlı CHOP indüksiyonu ile sonuçlanır.(şekil.10)



Şekil 11. ER stresi durumunda apoptoz redoks modeli (Zhang , ve diğerleri, 2019).

2.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması sonucunda meydana gelen bir durumdur. Reaktif oksijen türleri (ROS), bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip molekülleri içeren serbest radikaller veya eşleşmemiş elektronlarını paylaşan iki serbest radikal molekülünden üretilen radikal olmayan türler olarak isimlendirilmiştir.

Süperoksit anyonları (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) fizyolojik olarak önemli ROS' lar olarak bilinmektedirler. Süperoksit anyonları, çoklu hücrel süreçler tarafından üretilir ve bunların üretimi, diğer oksidan moleküllerin oluşumuna yol açmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD) O_2^- 'yi azaltır ve H_2O_2 'ye, bu da demir katalizli Fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikallerine (OH) ve suya dönüştürülmektedir. Hidroksil radikalleri, hipokloröz asit, peroksinitrit ve peroksil radikalleri dahil olmak üzere ek toksik pro-oksidanların oluşumunu doğrudan veya dolaylı olarak indüklemektedir (Bae, 2011).

2.4. Nitrozatif Stres

Nitrik oksit(NO), l-arginin oksidasyonunu ve l-sitrüline katalize eden Nitrik Oksit Sentetazların (NOS) etkisi altında l -arginin'den sentezlenmektedir (Knowles, 1994). Farklı genler tarafından kodlanan en az 3 NOS proteini bulunmaktadır. Beynin belirli nöronlarında yapısal olarak ifade edilen nöron kökenli nitrik oksit (nNOS); ekspresyonu tipik olarak inflamatuvar hastalık durumları sırasında indüklenen indüklenebilir nitrik oksit (iNOS); ve yapısal NOS olarak da bilinen endotel NOS (eNOS) tan oluşmaktadır. NOS, redüktaz aktivitesine sahip bir alan içeren ve oksidaz aktivitesine sahip bir alan içeren homodimerik kompleks tarafından oluşturulan bir enzimdir. NO üretimi iki reaksiyonun birbirini takip etmesinden kaynaklanmaktadır. Hücre içi O^2 üretimi arttığında, NO da onunla reaksiyona girerek ONOO'yu oluşturmaktadır. Bu, proteinleri ve lipitleri nitrasyon yoluyla değiştirebilen güçlü bir oksidan enzimdir. Ek olarak, peroksinitrit, BH4'ü oksitler ve bu da inaktif molekül BH2 ile sonuçlanmaktadır (Laursen, 2001). BH4'ün yokluğunda, eNOS bir homodimerik formdan monomerik bir forma geçer ve böylece bağlanmaz duruma gelmektedir. Bu serbest konformasyonda, NO sentezlemez, bunun yerine O^2 üretilmektedir. NO seviyesinin azalmasına bağlı olarak vazodilatasyon kaybı ve O^2 oluşumuyla oksidatif strese artış meydana gelmektedir. Sonuç olarak, eNOS aktivitesinin düzenlenmesindeki herhangi bir işlev bozukluğunun derin metabolik sonuçları oluşabilmektedir. eNOS aktivitesinin kontrolü, Caveolin (CAV1) ile inhibitör etkileşimi, translasyon sonrası modifikasyonları (miristoilasyon, palmitoilasyon ve fosforilasyon), hücre içi kalsiyum seviyelerindeki artışlara uyarıcı tepkileri içeren karmaşık bir düzenleyici mekanizmaları içermektedir.

2.4. PKR

2.4.1. Tanımı ve Yapısı

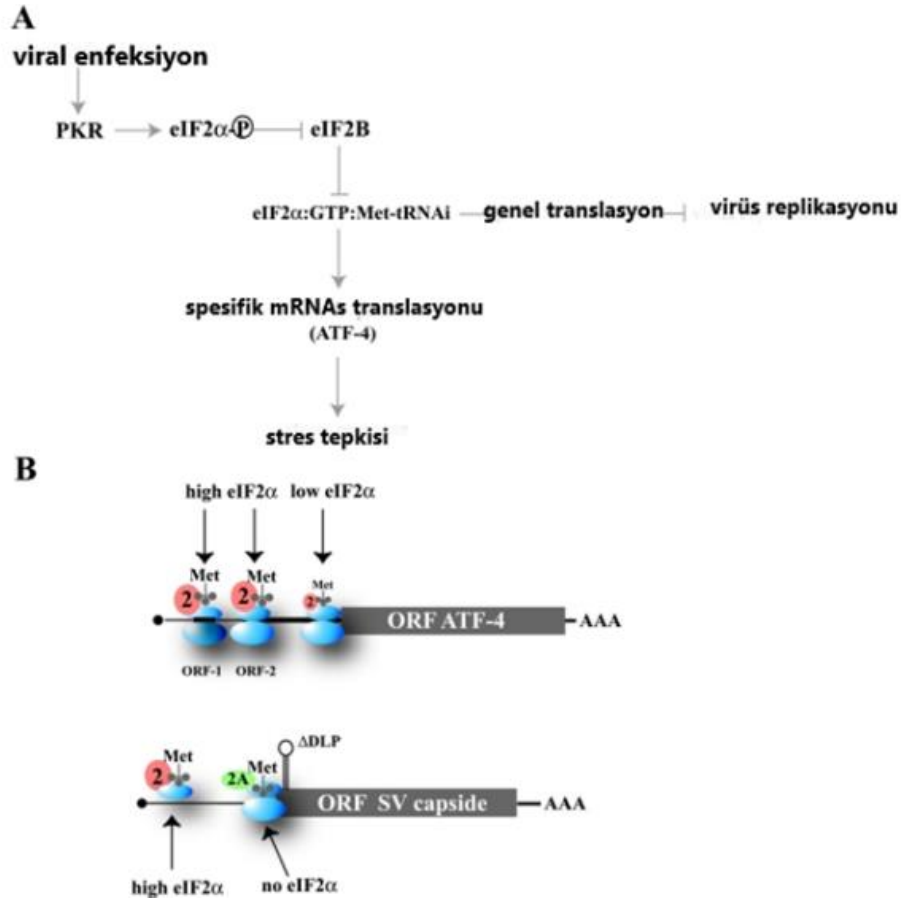
Protein kinaz R (PKR), insanlarda EIF2AK2 geni tarafından kodlanan bir serin-treonin kinazdır. 551 amino asit uzunluğunda 2.kromozom üzerinde yer almaktadır (Feng,

1992). mRNA translasyonu, transkripsiyonel kontrol, apoptozun düzenlenmesi ve proliferasyon gibi önemli hücre içi düzenlemelerde görev almaktadır (García , 2007).

2.4.2. PKR Aktivasyonu

PKR promotöründe en iyi tarif edilen transkripsiyonel motif, tip I IFN'ye yanıt olarak kopyalanmasına izin veren bir IFN ile uyarılan yanıt elemanı (ISRE) iken çok sayıda transkripsiyon faktörü, bağlayıcılar olarak tanımlanmıştır (Kuhlen , 1997). EIF2AK2 geninin promotör bölgesi ENCODE projesi bağlamında CHIP-Seq analizleri ile tanımlanan 92 farklı faktör olarak belirlenmiştir (Rouillard, 2016). Bu durum, bir interferon uyarılmış gen (ISG) olarak PKR kavramını desteklerken, aynı zamanda farklı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu içeren hücrel programlarda PKR ekspresyonunun modülasyonuna da izin vermektedir. PKR'nin aktivasyonu, biyokimyasal ve genetik analizlere dayalı olarak en önemlisi homodimerizasyonu olan bir dizi konformasyonel değişiklikle sonuçlanmaktadır. Homodimerizasyonunun bir sonucu olarak, PKR, Ser242, Thr255, Thr258, Ser83, Thr88, Thr89, Thr90, Thr446 ve Thr451 dahil olmak üzere birçok serin ve treonin bölgesinde otofosforile edilmektedir. Son ikisi, yani Thr 446 ve Thr 451 bölgeleri, PKR aktivasyonu sırasında tutarlı bir şekilde fosforile edilir, bu da homodimerizasyonunun daha fazla stabilizasyonu ve artan katalitik aktivite ile sonuçlanır (Hugon, 2009).

Protein sentezinin bu şekilde bloke edilmesi, viral replikasyonun azalması veya önlenmesi ile sonuçlanır ve apoptoza neden olabilmektedir. PKR ayrıca FADD/kaspaz-8/kaspaz-3 ve kaspaz-9 APAF yollarının aktivasyonu ile eIF2a fosforilasyonundan bağımsız olarak apoptozu indükleyebilmektedir (García , 2007).



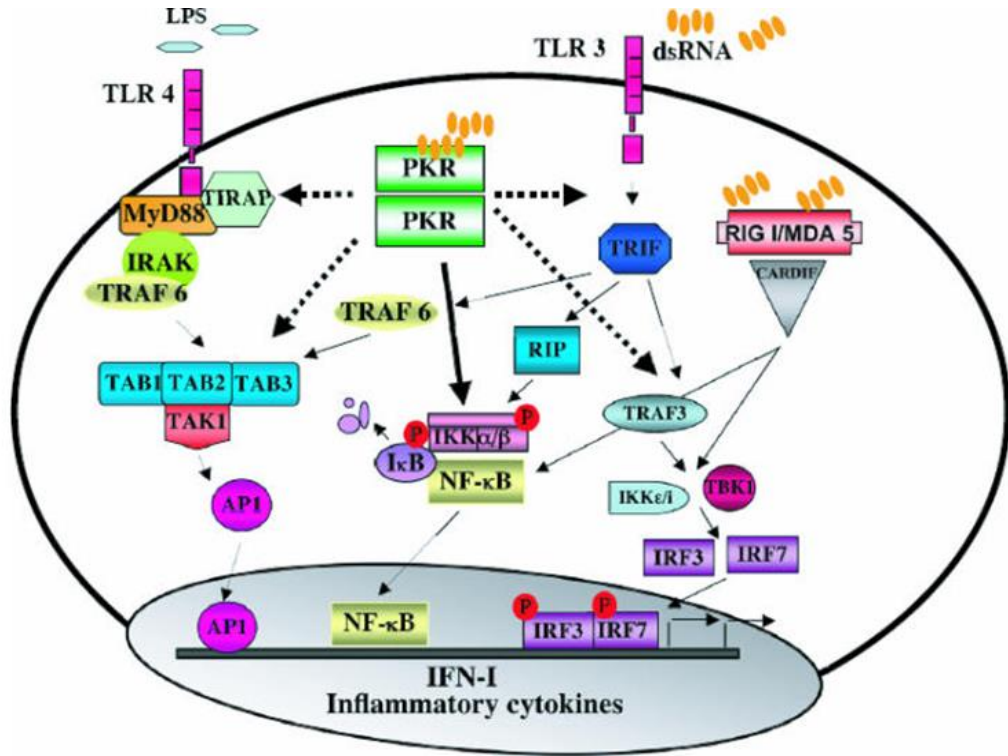
Şekil 12. PKR aktivasyonu (García , 2007).

PKR, ısı şoku proteinleri, büyüme faktörleri (örneğin, PDGF) ve heparin gibi diğer faktörler tarafından da aktive edilebilmektedir (Li S. , 2006). PKR ayrıca viral olmayan patojenler bakteriyel lipopolisakarit (LPS), sitokinler (örneğin, TNF-a, IL-1, IFN-y) kalsiyum, tunikamisin, arsenit, tapsigargin, ya da H ile reaktif oksijen türleri, yanlış katlanmış protein cevap stresi sonucundaki endoplazmik retikulum stresi PKR aktivasyonunu uyarmaktadır (García , 2007).

2.4.3. PKR Metabolizma İlişkisi

PKR, görünüşe göre vücuttaki metabolizmaya dahil olur ve eIF2a'nın artan fosforilasyonu, obezite ve diyabetle ilişkili insülin direncinin bir özelliği olduğu düşünülmüştür (Nakamura, ve diğerleri, 2010). Ayrıca hücre kültüründe PKR, pankreatik β-hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir. Buna karşın insülin tedavisi, treonin kalıntıları

üzerinde poly (I:C) ile indüklenen PKR fosforilasyonunu inhibe ederken, tirozin kalıntıları üzerindeki PKR fosforilasyonunu yükseltmiştir. Yüksek glikoz, PKR kinaz aktivasyonu ile insülin sinyalini bozmaktadır. PKR aktivasyonu ise periferik dokularda insülin direncini indüklemektedir (Nakamura, ve diğerleri, 2010). Yakın tarihli bir çalışmada, PKR'nin metabolik stres koşulları altında TAR RNA bağlayıcı protein (TRBP) ile etkileşime girdiği ve TRBP'nin fosforilasyonunun PKR'nin aktivasyonu ile sonuçlandığı ve bunun da JNK aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Obez farelerde TRBP'nin aşırı ekspresyonu, glikoz metabolizmasının alevlenmesine neden olurken, karaciğerde TRBP fosforilasyonunun inhibisyonu, iyileştirilmiş insülin direnci ve glikoz metabolizmasının yanı sıra azaltılmış inflamasyon dahil olmak üzere faydalı etkilere sahip olduğu düşünülmüştür (Nakamura, ve diğerleri, 2010).



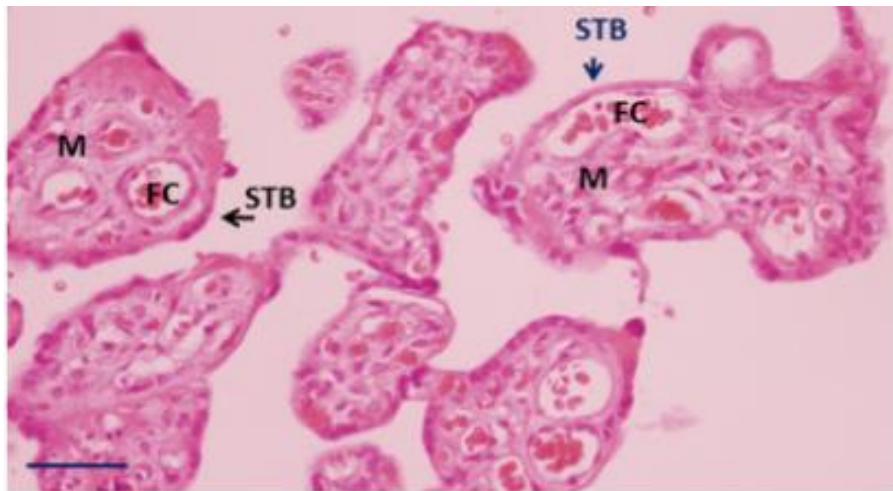
Şekil 13. PKR TLR4 ilişkisi (García , 2007).

2.5. Plasenta

2.5.1. Plasenta oluşumu ve morfolojisi

Döllenme ve zigot oluşumundan sonra embriyo blastomer oluşumu için seri olarak hücre bölünmeleri yaşamaktadır. Hücre bölünmelerini takiben iki hücre tipinden blastosist oluşmaktadır. Blastosist embriyo iç tabakasında yer alırken trofoblast hücreler dış tabakasını oluşturmaktadır. Embriyonun implantasyonu sırasında trofoblast hücreleri desiduyu istila ederek çoğalmaktadır. İnsanlarda implantasyon döllenmeden sonra 6. ve 7. günlerde meydana gelmektedir (Silva, 2015).

Doğumdan sonra plasenta doğum tipine ve göbek kordonu kesilme şekline göre çeşitli çaplarda ve ağırlıklarda olmaktadır. Normal hamilelikten sonra alınan plasenta ağırlığı 530 g'dır. Çapı 16 cm , hacmi 450 cm³ olduğu tespit edilmiştir. Koryon bölgesi trofoblast hücreleri içeren koryon villusundan düzenlenmektedir. Trofoblast iki hücre katmanından oluşmaktadır. İç katmanı oluşturan sitotrofoblast(CTB) ve annenin kanıyla doğrudan temas halinde olan çok çekirdekli hücrelerin bir katmanı olan sinsityotrofoblastlardır (STB). (şekil14) Trofoblastın altında ekstra embriyonik mezoderm , herbauer hücreleri ve bunların oluşturduğu kılcacal damarlar yer almaktadır. Bu tabakalar maternal dolaşımdan fetal dolaşıma besin transferini düzenleyen birkaç villözde organize olan maternal-fetal bariyeri oluşturmaktadır (Silva, 2015).



Şekil 14. Plasenta histolojisi (Silva, 2015).

2.5.2. Plasenta ve Oksidatif Stres

EVT hücreleri spiral arterleri istila edemediğinde, EVT kabuğunun eksik tıkanması ve parçalanması meydana gelmektedir. Bu, maternal plasental dolaşımın erken başlamasına ve yüksek oksijenli bir ortam ile sonuçlanan oksijen basıncında erken bir artışa yol açmaktadır. Oksijen basıncındaki artışın yanı sıra, plasentanın periferik kısımlarında başlayan kademeli süreç yerine plasentanın tam intervillöz boşluğu anne kanı ile perfüze edilmektedir (Jauniaux, 1994). Oksijen gerilimindeki artış düşük örneklerinde anti-nitrotirozin artışının yansıttığı artan süperoksit radikallerinin oluşumu yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açmaktadır. Normal olarak, birinci trimester plasentanın intervillöz boşluğu içindeki düşük oksijen ortamında, sinsityotrofoblast ROS'a maruz kalmamaktadır. Sinsityotrofoblast, özellikle ROS'a duyarlıdır çünkü bu tabaka, manganez süperoksit dismutaz (MnSOD) gibi yeterli konsantrasyonlarda antioksidan enzimlerden yoksun durumdadır. Ayrıca, bu katman, oksijen açısından zengin anne kanıyla karşılaşan, böylece en yüksek oksijen seviyelerine maruz kalan ve ROS'a karşı kırılganlıklarını artıran ilk fetal hücre dizileridir. ROS'taki artış, oksidatif stres olarak bilinen oksidan/antioksidan aktivitede bir dengesizliğe neden olmaktadır. Ciddi oksidatif stres vakalarında, klinik preeklamsi(PE) semptomları veya düşük gebelikler ortaya çıkabilmektedir.

İntervillöz boşlukta oksijen basıncının yükselmesi fizyolojik bir durum olmasına rağmen plasental oksidatif stres gerçekleşmektedir. Oksidatif stresteki bu artışı telafi etmek için, plasenta bu yüksek oksijenden zengin yeni ortama adapte olurken antioksidan aktivitede artış gözlemlenmektedir. Plasentada anne kan dolaşımının başlamasıyla ilişkili olarak trofoblastta oksidatif streste ciddi bir artış meydana gelmektedir. Bu durum antioksidanlardan glutatyon peroksidaz ve katalazın plasental aktivitesinde bir artış ile çakışmaktadır (Jauniaux, E., 2000).

Plasentada MnSOD ve katalazın yanı sıra glutatyon peroksidaz ve bakır/çinko süperoksit dismutaz gibi diğer enzimler de antioksidan olarak işlev görmektedir. Plasentada sitotrofoblastlar ve villöz stromal hücreler , ROS'a maruz kaldıklarında yeni antioksidanları sentezleyebilmektedirler.

Sinsityotrofoblast, normal gebelikte görülen oksidan/antioksidan aktivite dengesini geri kazanarak ROS'taki minimal artışlara uyum sağlayabilmektedir. Oksidatif strese yanıt olarak adaptasyon yetersizse, antioksidan kapasitedeki yetersiz artış sinsityotrofoblastta ara

hasara yol açmaktadır. Bu, kronik oksidatif stres durumuna neden olabilmektedir. Sonunda sinsityotrofoblast hasarı, erken gebelik başarısızlığına yol açacak kadar şiddetli olabilmektedir (Jauniaux, E., 2000).

İskemi-reperfüzyon hasarına (IRI) ayrıca, mitokondriyal elektron transfer süreçleri ve NADPH oksidaz gibi çeşitli enzimlerin aktivitesi gibi çeşitli yollarla ROS üretimi aracılık etmektedir. ROS üretimi, villöz endotelde ve daha az ölçüde villöz stromal hücrelerde ve in vitro re-oksjenasyondan sonra sinsityotrofoblastta görülmektedir. Tekrarlayan IRI'de geniş bir ROS üretimi, geri dönüşü olmayan hücresel işlev bozukluğuna ve doku hasarına yol açmaktadır (Hung , 2001).

2.5.3. Plasenta ve Nitrozotif Stres

Gebelik sırasında NOS izoformu ekspresyonu plasentada dinamik olarak düzenlenmektedir. eNOS ve iNOS, plasental gelişimin erken evrelerinden beri çeşitli türlerde bulunmuştur. iNOS izoformu, esas olarak gebeliğin ilk evrelerinde fetomaternal ara yüzde eksprese edilmektedir (Marinoni, ve diğerleri, 2004). Gebelik boyunca iNOS aktivitesinde bir artış vardır ve bu artış gebeliğin ortasında doruğa ulaşmaktadır. Öte yandan, insan ilk trimester plasentasında, eNOS sinsityotrofoblastta, ilkel villöz kılcıl damarlardaki erken endotelde, orta ve ekstravillöz trofoblastta eksprese edilir ve bu aşamada toplam NO üretimine katkıda bulunmaktadır. Hamilelik devam ettikçe, eNOS ekspresyonunun, esas olarak sinsityotrofoblast ve endotelial hücrelerde bir artış ve yeniden dağılımı oluşmaktadır (Al-Hijji, 2003).

Plasental vasküler damarların büyümesi ve konsolidasyonu anjiyogenez ile gerçekleşmektedir. Bu olayda, endotelial hücrelere farklılaşan ve endotelial hücrelerden çoğalan endotelial öncü hücreler (EPC) tarafından tek damarlar oluşturulmaktadır. Bu damarlar iki şekilde büyüyebilir; (1) villöz damarların uzunluğunda bir artış anlamına gelen dallanmayan anjiyogenez , (2) çok sayıda kısa kılcıl halkanın oluşturulduğu dallanan anjiyogenez olarak iki şekilde yer almaktadır. Bu işlemler gerçekleştikten sonra damarlar olgunlaşır ve yapıları stabilize olmaktadır. Vasküler sistemdeki ek olgunlaşma ve uzmanlaşma, epigenetik mekanizmalar tarafından işaretlenebilen kan akışı, oksijen gerilimi, oksidatif stres gibi çevresel belirteçlerden etkilenmektedir (Ribatti , 2009). Bütün bu faktörler, insan plasentasının gelişimi ve işlevi ile ilişkilendirilmiştir. NO'nun anjiyogeneze

katılımı, vaskülogenezde olduğundan daha açık bir şekilde belirlenmiştir. Anjiyogenez, insan göbük damarından (HUVEC) alınan endotel hücreleri kullanılarak in vitro olarak incelenmiştir . Deneysel olarak indüklenen eNOS eksikliği olan hayvanlar, esas olarak azalmış damar olgunlaşması ve düzensizliği ile ilişkili olan vasküler ağaç boyunca kusurlu vasküler gelişim göstermektedir. NO'nun anjiyogenezde inhibitör bir rol oynadığını gösteren ilk kanıtlara rağmen , daha sonraki çalışmalar, ekzojen NO veya aşırı eNOS ekspresyonunun endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve anjiyogenezi indüklediğini göstermiştir. Buna karşılık, NOS'un inhibisyonu veya eNOS geninin silinmesine embriyo ve plasentada yetersiz anjiyogenez eşlik eder. Ek olarak NO, farklı vasküler yatlardan gelen fetal endotelial hücrelerde proliferasyonu indükler ve merkezi damarların kalibresini düzenler (Bustamante, ve diğerleri, 1996).

Anjiyogenezin ana moleküler aracıları olan VEGF ve anjiyopietin yeni damar oluşumunu indüklemek için esas olarak NO sentezine bağlı kalmaktadır. Endotel hücrelerinde VEGF, VEGFR-1 ve VEGFR-2 aktivasyonu yoluyla eNOS'a bağımlı NO sentezini indüklemektedir. VEGF ile indüklenen anjiyogenezin, eNOS aktivitesinden türetilen NO sentezini gerektirdiği gösterilmiştir (Cudmore , 2006). Ayrıca, endotel hücrelerinin ve EPC'nin göçü NO tarafından düzenlenmektedir. VEGF'nin neden olduğu göç, Akt ve HSP90 aracılığıyla eNOS'un aktivasyonunu gerektirmektedir. Nitrik oksit, adezyon moleküllerinin (integrin $\alpha\beta3$) ve hücre dışı matris metaloproteazlarının (yani MT1-MMP, MMP-9 ve MMP-13) ekspresyonunu artırarak, anjiyogenezde hücre göçünü kolaylaştırır ve endotel hücrelerinin ve yeni hücrelerin istilasına izin vermektedir (Rivera, ve diğerleri, 2005). Anjiyopietin, eNOS'u PI3K/Akt ve ERK1/2 yolları aracılığıyla aktive ederek proliferasyon ve anjiyogeneze yol açar. Ek olarak, Ang-1, eNOS ekspresyonunu artırırken, eNOS'un aşırı ekspresyonu, Ang-1'e verilen anjiyojenik yanıtı arttırmaktadır. Ayrıca, Ang-1/eNOS yolu damar olgunlaşmasına ve stabilizasyonuna katkıda bulunmaktadır . Bu bağlamda kapiller oluşumu ve bakımı VEGF ve Ang-1 tarafından düzenlenen E-kaderin ekspresyonundan etkilenmektedir (Dejana , 2009).

1980'lerin sonlarında ve 1990'ların başlarında yapılan çalışmalar, koryonik ve göbük damarlarından gelen endotelin NO saldığını göstermektedir (Voorde, 1987). Daha ileri çalışmalar göbük damarlarında NO üretiminin ve vazodilatör etkisinin prostasiklin I-2'ninkinden daha yüksek olduğunu göstermiştir (Chaudhuri , 1993). Diğer vasküler damarlar gibi, plasental damarlar da çözünür guanilat siklaz (sGC), cGMP'ye bağımlı protein kinaz ve cGMP'ye özgü fosfodiesterazları içeren klasik NO'ya bağımlı yolun moleküler aracılarını

ifade etmektedir. Nitrik oksit, etkilerini sGC'nin aktivasyonu ve potasyum kanal aktivitesinin (BKCa) modülasyonu yoluyla göstermektedir. Bu seviyedeki NO sentezi, histamin, adenosin, ATP, kalsitonin geni ile ilişkili peptit (CGRP) ve kesme stresi tarafından indüklenebilmektedir. Sonucusu, ERK1/2 yoluyla serin 1177'de fosforilasyonu yoluyla eNOS'u aktive eden ve plasental endotelyumdaki Akt uzun vadeli ekspresyonunu artırarak önemli bir uyarıcıdır (Li Y. , 2004).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

- Hassas terazi (Shimadzu)
- Sıcak su banyosu (Memmert)
- İnkübatör (Nuaire)
- Hücre sayım cihazı (İnvitrogen countess)
- Isı bloğu (Lab companion)
- Ultra saf su cihazı (Millipore)
- Vorteks (İsolab)
- -80o C buz dolabı (Nuaire)
- -20o C buz dolabı (Samsung)
- pH metre (Mettler toledo)
- Sıvı azot tankı (-196 oC)
- Hücre kültür kabini (Labronco)
- Distile su cihazı (Nüve)
- Buz cihazı (Uğur buzaL60)
- Santrifüj (Hettich zentrifugen)
- Soğutmalı santrifüj (Eppendorf centrifuge 5415 R)
- Otoklav (Hirayama)
- Nanodrop (Nabi)

- Orbital çalkalayıcı (IKA KS 130)
- Plate okuyucu (Epoch)
- UV görüntileme cihazı (G:Box Syngene)
- İvert mikroskop (Olympus CK40)
- Western blot seti (yürütme, transfer tankı, güç kaynağı, Biorad, Criterion)
- Boncuklu homojenizatör
- Pipet seti (10 µl, 100 µl, 1000 µl, Ep)

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Antikorlar

- BeWo hücre hattı (ECACC, Acc No: 86082803)
- DMEM high glucose, DMEM no glucose besi yeri (Capricorn)
- Ham's F-12 besi yeri (Sigma)
- Fetal sığır serumu (FBS, 500 ml, Sigma)
- L-Glutamin solüsyonu (200 mM, 100 ml, Capricorn)
- Penisilin/Streptomisin (100 ml, Capricorn)
- 10 cm' lik petri kabı (Biologix)
- Tek kullanımlık steril pipet (5ml, 10 ml, Biologix)
- Pastör pipeti (VWR)
- Sodyum pirüvat (Gibco)
- Tripsin-EDTA (% 0,05, Capricorn)
- Dulbecco's PBS (1x, Sigma)
- 10 ml şırınga (BD-Luer-Lok™ Tip)
- 15 ml' lik falkon (İsolab)
- 50 ml' lik steril falkon (İsolab)

- Cryotube (İsolab)
- 1,5 ml'lik vial (Tarsons)
- Enjektör filtresi (İsolab)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO, Merck)
- Etanol (Merck)
- RIPA lizis tamponu (ABT)
- Protein kuantifikasyon kiti (Bradford testi, Abcam)
- Yağsız süt tozu (Pınar)
- β -Merkaptoetanol (Merck Millipore)
- Metanol (Merck Millipore)
- SDS-PAGE yükleme boyası (5x, Nzytech)
- SDS-PAGE jeli (Biorad, Criterion midi)
- Whatman Kağıdı (Filtre kağıdı, Whatman)
- Hücre sayım slaytı (CountessTM)
- SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (BioShop)
- Nitro seluloz membran (Santa Cruz)
- Tween 20 (Sigma)
- Anti-Rabbit IgG-HRP sekonder antikor (Elabscience)
- Tubulin antikor (Elabscience)
- Phospho PKR antikor (Elabscience)
- L- Ascorbik acid (Sigma)
- Glutathione (BLD Pharmatech)
- Human GPX1 ELISA kit (Andy gene)
- Human NO ELISA kit (Andy gene)
- Human mnSOD2 ELISA kit (Bioassay)

- Muse Oxidative Stress Kit (Kat. no:MCH100111) (Luminex Guava)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Hazırlanması

Çalışmada Bewo hücre hattı (ECACC, Acc:86082803) kullanılmıştır. Hücreler 10 cm' lik petrilere ekimleri Hams f12 medium kullanılarak yapılmıştır. Besiyeri hazırlamak için %10 FBS kullanılmıştır. Besiyerine %1 pirüvat, %1 penisilin ve L- glutamine ilave edilerek optimal büyüme için gerekli ortam hazırlanmıştır. Donmuş haldeki hücreler 10 ml olarak hazırlanan besiyeri kullanılarak 10 cm lik petrilere ekimleri yapılmıştır. Petrillerdeki hücreler 37 C⁰ ve %5 CO₂ oranındaki inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin büyüme ve çoğalmaları günlük olarak mikroskop altında kontrol edilmiştir. Yüzeye tutunmamış hücreler hücre kabini içerisinde besiyerleri aspirasyon işlemi ile çekilmiştir. Taze besiyeri çekilen besiyerlerinin yerine 10 ml ilave edilmiştir. Hücre yoğunluğu %60 oranına yaklaşınca petrillerdeki hücreler pasaj işlemine alınmıştır. Pasajlamada petrideki besiyeri çekilip atılmıştır. Petriyer PDS ile yıkanmıştır. Petriye tripsin ilave edilmiş ve 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler yüzeyden kalktıktan sonra besiyeri içerisinde 1200 rpmde santrifüj edilerek 10 ml besiyeri içeren yeni petrilere pasajlanma işlemi yapılmıştır.

3.2.2. Çalışmada Kullanılacak Hücre Gruplarının Belirlenmesi

Tablo 1. Deney grupları

Gruplar	Uygulamalar
1. Grup	Kontrol
2. Grup	C vitamini (C)
3. Grup	Glutasyon (G)
4. Grup	Lps+poly:I:C(L+P)
5. Grup	Lps+poly:I:C+C vitamini(L+P+C)
6. Grup	Lps+poly:I:C+Glutasyon(L+P+G)

Gerekli pasaj işlemi sonucunda 10 cm çapında 6 petrilik hücreler oluşturuldu. 1. grup kontrol grubunu oluşturulmuştur. 4,5 ve 6.gruplara 500 ng/ml LPS ve 50 ul/ml poly(I:C)

petrilerindeki besiyerlerine eklenmiştir. Petriler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda 3. Gruba 24 uM/ml glutatyon petri besiyerine eklenmiştir. 4.gruba 100 uM C vitamini petrideki besiyerine eklenmiştir. 6. Gruba 24 uM glutatyon ve 5. Gruba 100 uM C vitamini petrilerdeki besiyerlerine eklenmiştir. 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2. Ve 3. Gruplar çalışmada antioksidan aktivenin PKR aktivasyonu olmadan artmadığı göstermek ve kullanılan antioksidan moleküllerin PKR fosforilasyonuna etkisini göstermek için uygulanmıştır. Glutatyon endojen kaynaklı ve Gpx1 i arttırması için seçilmiştir. C vitamini hücrede glutatyonla birlikte hareket ettiği için seçilmiştir.

3.2.3. Protein İzolasyonu

Petrilerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırıldı. 5 ml PBS ile petri yıkandı ve PBS geriye çekilip atıldı. Petriye 1 ml tripsin eklendi ve 3 dk inkübasyon yapıldı. Petri yüzeyine çıkan hücreler 5 ml PBS eklenerek toplanıp 15 ml falkon tüplerine konuldu. Önceden soğutulan santrifüj cihazına 15 ml lik falkon koyuldu ve 5 dk 4 C⁰ 2000 rpmde santrifüj işlemi yapıldı. Bu işlem sonucunda falkonda oluşan süpernatant kısım atıldı. Falkonda geriye kalan pelet kısmı 1 ml PBS eklenerek kaldırılıp ependorf tüpüne aktarıldı. Ependorf tüpü 5 dk 4 C⁰ 2000 rpmde santrifüj yapıldı ve süpernatant kısım atıldı. Ependorf tüpünde kalan pelet üzerine 150 ul RİPA ilave edildi. 15 kez tüp içerisinde pipetaj işlemi yapılarak homojen olması sağlandı. Daha sonra 15 kez enjektör iğne ucundan geçirildi. Bu işlemlerden sonra ependorf tüp -80 C⁰ 20 dk bekletilmek üzere buzdolabına yerleştirildi. Buzdolabından çıkarılan ependorf tüp buz kalıbı üzerinde 10 kez pipetaj işlemi ile çözdürüldü. Dondurup çözme işlemi 4 kez tekrar edildi. 14000 rpmde 4 C⁰ 25 dk santrifüj uygulandı. Santrifüj işlemi sonunda kalan süpernatant kısım farklı bir ependorfa alınıp üzerine ilgili grup ismi belirtilip -20 C⁰ proteinler saklandı.

3.2.4. Western Blot

Kullanılan tampon çözeltiler listelenmiştir

- TBS (Tris-Buffered Salline-1 lt); 6,05 gr Tris-HCl ve 8,76 gr NaCl 1 lt dH₂O içerisinde çözdürülmüştür (pH 7,6).

- Yıkama Tamponu (TBS + %0,1 Tween20); 100 ml TBS çözeltisine 100 µl Tween20 eklenerek karıştırılmıştır.
- Transfer Tamponu; 3,03 gr Tris-Base, 14,4 gr glisin, 200 ml metanol ve 2 ml %10 SDS 1 L dH₂O içerisinde çözdürülmüştür.
- 10X Yürütme Tamponu; 30,3 gr Tris-Base, 144 gr glisin ve 10 gr SDS 1 lt dH₂O' da çözdürülmüştür.
- Bloklama Solüsyonu (%5 Süt tozu + TBS) için; gerekli miktarda bloklama solüsyonu her seferinde %5 süt tozu içerecek şekilde TBS ile hazırlanmıştır.
- Strip Tamponu; 200 ml %10 SDS, 62,5 ml 1 M Tris (pH: 6,7) ile dH₂O ile 1 lt 'ye tamamlanmıştır. Strip aşamasından önce 50 ml strip tamponu içerisine 350 µl βmerkaptoethanol eklenmiştir.

Protein içeren ependorf tüpleri 5 dk 95 C⁰' de inkübe edilmiştir. Ardından jel kuyucuklarına marker (5 µl) ve örnekler (30 µl) yüklenmiştir ve 1,5 saat kadar 90 V' ta yürütülmüştür. Örnekler yürütüldükten sonra transfer tamponu içerisinde transfer sandviçi hazırlanmıştır (aşağıdan yukarıya; sünger, whatman kağıdı, jel, membran, whatman kağıdı, sünger) ve transfer tankında 2 saat 70 V' ta transfer gerçekleştirilmiştir. Transferden sonra membran, bloklama solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bloklamadan sonra membran, bloklama solüsyonu içerisinde 1:1000 konsantrasyonda primer antikor(pPKR rabbit primer)ile gece boyunca 4 C⁰' de inkübe edilmiştir. Ardından membran yıkama tamponu ile 3 kere 5 dk yıkanmıştır. Yıkama işlemini takiben membran 2 saat oda sıcaklığında bloklama solüsyonu içerisinde 1:5000 konsantrasyonda sekonder antikor(Anti-Rabbit IgG-HRP) ile muamele edilmiştir. Daha sonra tekrar yıkama tamponu ile 3 kere 10 dk yıkanmıştır. Yıkamanın ardından membran 1 ml ECL ile 2 dk muamele edilmiş ve görüntüleme cihazında görüntü alınmıştır. Görüntüledikten sonra membran strip solüsyonu ile 1,5 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Strip işlemini takiben membran üç kere 5 dk yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Tekrar bloklama solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve bloklama solüsyonu içerisinde β-Tubulin (1:5000) ya da diğer bir primer antikorla (1:1000) gece boyu muamele edilerek basamaklar tekrar edilmiştir.

3.2.5. ELISA Yöntemi

ELISA yöntemi antikor antijen ilişkisi olan ve antikora bağlanmış enzimlerin tespitini yapan kantitatif bir ölçüm testidir. Çalışmamızda GPx1, MnSOD2 ve NO enzimlerinin ELISA yöntemi ile ölçümlerini yaptık.

- Buzdolabında -20 C^0 sakladığımız proteinlerimiz ependorf tüp içerisinde dışarıya çıkarıp çözdürdük.
- Wash buffer (1:25) hazırlamak için 375 ml distile su ve 15 ml konsantre wash buffer hazırladık. 0.8 ml yeniden standart eklenmiştir.
- Standart çözeltisi örneklerin bulunduğu 96'lık well kuyucuğa A dan başlamak üzere 100:1 ekledik ve 37 C^0 de 90 dk inkübatörde beklettik.
- İnkübatörden alıp kuyucuktaki örnekleri ve standartları uzaklaştırdık ve önce 12 ml biyotinlenmiş Ab seyreltici ve 120:1 konsantre biyotinlenmiş Ab ile karıştırıp pipetaj işlemi yapıp ve buzda bekletilmiştir.
- İnkübe edildikten sonra içindeki sıvı atılarak ve 350:1 wash buffer solüsyonu ile 3 kez yıkama işlemi yaptık.
- HRP için konsantre HRP eşleniği 120:1 alınıp 12 ml HRP seyreltici ile karıştırıp pipetaj işlemi yapılmıştır. Her kuyucuğa HRP antikorunu 100:1 eklenip ve 30 dk 37 C^0 de çalkalayıcı inkübatöre bırakılmıştır.
- Sıvıları uzaklaştırdıktan sonra wash buffer ile 5 kez yıkama yapılmıştır.
- Her bir kuyucuğa 90:1 substrat reaktifi eklenip ve sızdırmazlık ile etrafı kapatılmıştır. 37 C^0 de 15-20 dk inkübe edilmiştir.
- Sıvı kısmı uzaklaştırmadan üzerine 50:1 stop solüsyonu ekledik ve renk maviden sarıya dönmüştür.
- Spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır.

3.2.6. ROS Potansiyelinin Tespiti

Hücrelerdeki oksidatif stres muse kiti kullanılarak tespit edilmiştir. Kitin çalışmasında süperoksit radikalının hücrelerdeki tespitine dayalı ve aynı zamanda hücrelerin yüzde oranını vermektedir.

Bu deney için 6 kuyu plaklara hücreler oluşturulmuştur. Hücreler her kuyucuğa eşit bir şekilde kültüre edilmiştir. Muse Oksidatif Stres Reaktifi stok solüsyonu 1x assay tamponun ile 1:100 oranında seyreltme işlemi yapılmıştır. Daha sonra seyreltilen reaktif oda sıcaklığında karanlık ortamda 1:80 oranında tekrar 1x assay tamponu ile seyreltilip çalışma solüsyonu için hazırlanmıştır. Hücrelerin üzerinden besi yeri çekilmiş sonra tripsin enzimi kullanılarak hücreler kuyulardan kaldırılmıştır. Kaldırılan hücreler ile çekilen besi yeri (ölü hücreleri içermektedir) falkonlara alınmış ve 5 dk 1200 rpm' de santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Hücre peletleri (5 x 105) 100 µl 1x assay tamponunda çözülmüştür. Çözülen hücrelerden 10 µl alınıp 1,5 ml' lik tüplere aktarılmıştır. Her tüpe 190 µl çalışma solüsyonu eklenmiş ve tüpler yavaşça vortekslenmiştir. Daha sonra tüpler 37 C⁰' de 30 dk inkübe edilmiştir. Son olarak muse analyzer cihazında ölçümleri yapılmıştır.

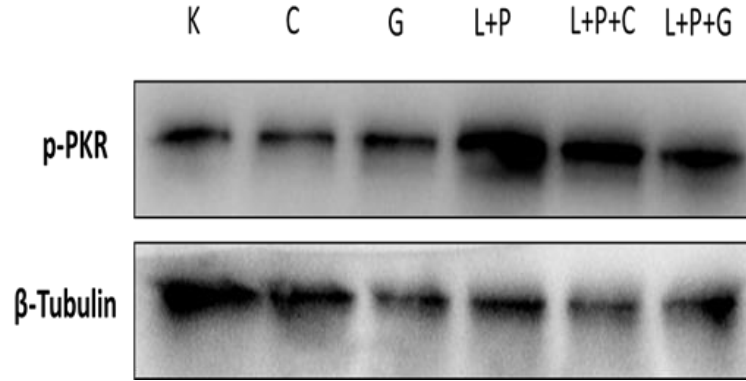
3.2.7. İstatiksel Analiz

Değişkenlerin dağılımları Shapiro Wilk testi kullanılarak belirlenmiştir. Normal dağılım gösteren grupların karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile saptanmıştır. Sürekli değişkenler Ortalama ± Standart Hata olarak sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık için $p \leq 0,05$ değeri kabul edilmiştir. Analizlerin uygulanmasında Graphpad Prism 8 programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

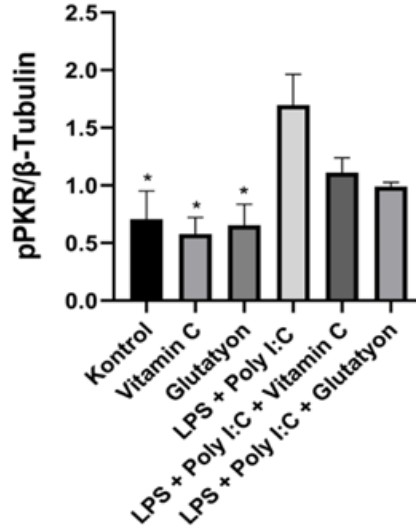
4.1. p-PKR İfadesinin Plasenta Trofoblast Hücrelerinde Protein Düzeyinde Belirlenmesi

Plasenta trofoblast hücrelerindeki p-PKR'nın protein düzeyindeki ifadesinin belirlenmesi için western blot analizi uygulanmıştır. Testler üç kez tekrar edilmiştir. LPS ve poly(I:C) gruplara uygulanarak p-PKR'nın aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. p-PKR ifadesi her grup için ayrı ayrı tespit edilmiştir. P-PKR'ın ifadesi sonucu elde edilen bant görüntüleri şekilde gösterilmiştir. p-PKR ifadeleri her grup için β -tubulin ifadesine göre normalize edilmiştir.



Şekil 15. p-PKR/ β -tubulin bant görüntüleri.

p-PKR ifadesinin kontrol grubunda $0,44 \pm 0,18$, C grubunda $0,48 \pm 0,089$, G grubunda $0,63 \pm 0,15$, L+P grubunda $1,83 \pm 0,33$, L+P+C grubunda $1,41 \pm 0,093$, L+P+G grubunda $0,98 \pm 0,033$ olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda L+P grubuna göre p-PKR ifadesinin şekil düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$) C ve G gruplarının L+P grubuna göre p-PKR ifadesinin düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$)(Şekil.16)

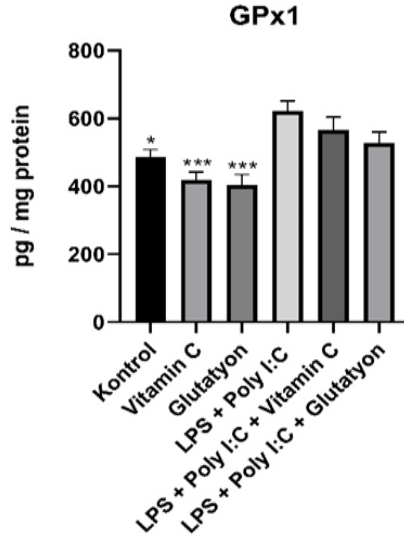


Şekil 16. Plasenta trofoblast hücrelerindeki p-PKR ekspresyonları.

4.2. ELISA Yöntemi ile Trofoblast Hücrelerindeki Enzimlerin Kantitatif Ölçümlerinin Belirlenmesi

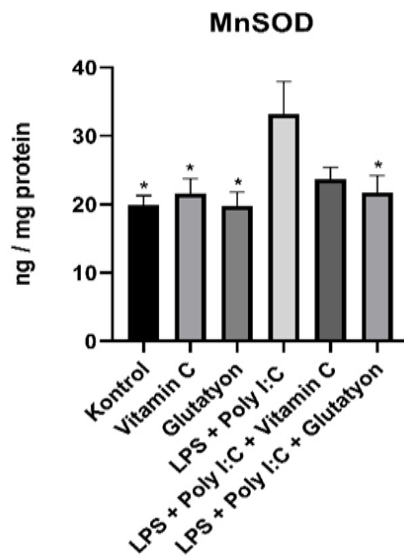
Plasenta trofoblast hücrelerinde ifade edilen GPx1, MnSOD ve NO enzimlerinin kantitatif tespitleri ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir. GPx1'in hücrede ilk antioksidan savunmayı başlatması, MnSOD yani süperoksit dismutazın ise süper oksit radikallerini hücrelerde yakalaması ve NO'nun plasenta anjiogenezinde seviyesinin yüksek olması gibi nedenlerden dolayı bu enzimlerin ölçümlerini yaptık. Sunulan değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Şekillerdeki sonuçlar LPS+ poly(I:C) grubuna göre ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05 olacak şekilde gösterilmiştir.

GPx1 enzim düzeyi kontrol grubunda 486,1±21,85ng/mg , C grubunda 419,1±22,66ng/mg, G grubunda 404,3±30,89ng/mg, L+P grubunda 622,5±28,7ng/mg , L+P+C grubunda 567,1±36,96ng/mg ve L+P+G grubunda 526±33,21ng/mg olarak tespit edilmiştir. C grubunun L+P grubuna göre gpx1 enzimin düşüklüğü anlamlı bulunmuştur.(***p < 0,001),(şekil). G grubunun L+P grubuna göre gpx1 enzim ifadesi anlamlı derecede düşük bulunmuştur.(***p < 0,001)(şekil) Kontrol grubunun L+P+S grubuna göre gpx1 enzim ifadesi düşük olup anlamlı bulunmuştur.(p < 0,05) (şekil) L+P+C ve L+P+G gruplarının ise L+P gruplarına göre gpx1 enzim ifadesindeki değişimler anlamlı bulunmamıştır.(Şekil.17)



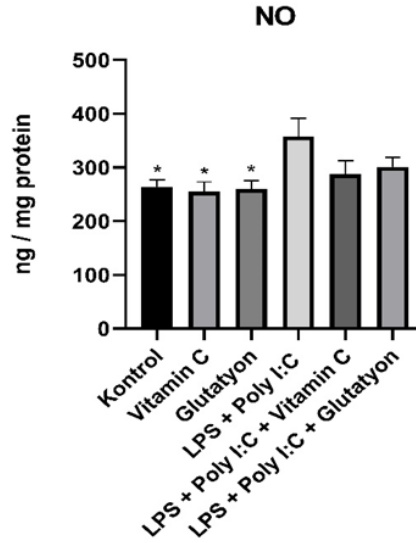
Şekil 17. Plasenta trofoblast hücrelerindeki GPx1 enzim ifadesi.

MnSOD enzim düzeyi kontrol grubunda $19,96 \pm 1,33$ ng/mg, C grubunda $21,54 \pm 2,21$ ng/mg, G grubunda $19,71 \pm 2,06$ ng/mg, L+P grubunda $33,24 \pm 4,73$ ng/mg, L+P+C grubunda $23,73 \pm 1,64$ ng/mg, L+P+G grubunda $21,75 \pm 2,46$ ng/mg olarak tespit edilmiştir. G grubunun MnSOD enzim ifadesi L+P grubuna göre düşük olup anlamlı bulunmuştur. C grubunun MnSOD enzim ifadesinin L+P grubuna göre düşük olup anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubunun ve L+P+G grubunun MnSOD enzim ifadesinin L+P grubuna göre düşük olup anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$) (Şeki.18)



Şekil 18. Plasenta trofoblast hücrelerindeki MnSOD enzim ifadesi.

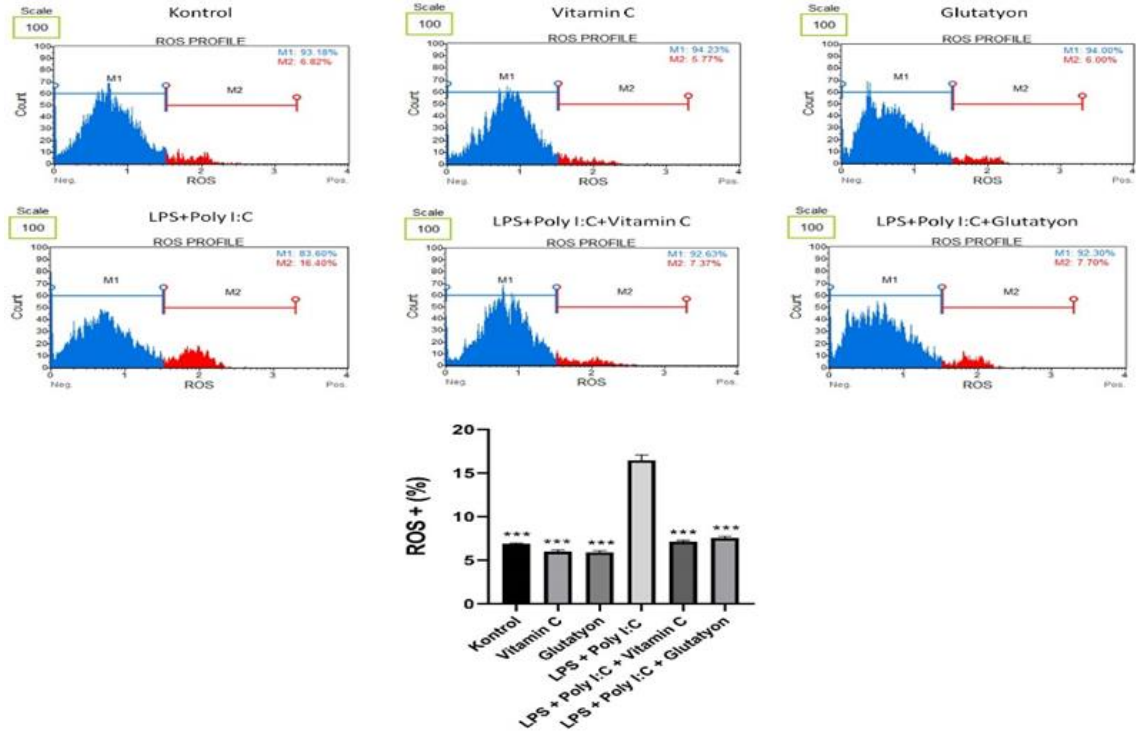
NO enzim düzeyi kontrol grubunda $264 \pm 13,08$ ng/mg ,C grubunda $255,8 \pm 17,41$ ng/mg, G grubunda $260,5 \pm 15,3$ ng/mg, L+P grubunda $358 \pm 34,09$ ng/mg, L+P+C grubunda $287,3 \pm 25,38$ ng/mg, L+P+G grubunda $301,1 \pm 17,49$ ng/mg olarak tespit edilmiştir. C grubundaki NO enzimin ifadesi L+P grubuna göre düşük olup anlamlı bulunmuştur. Kontrol ve G grubunun NO enzimin ifadesi L+P grubuna göre düşük olup anlamlı bulunmuştur.($p < 0,05$)(Şekil.19).



Şekil 19. Plasenta trofoblast hücrelerindeki NO enzim düzeyleri.

4.3. Grupların ROS Potansiyellerinin Karşılaştırılması

Çalışmada grupların ROS profil düzeyi % ortalama standart hata şeklinde tabloda belirtilen değerler olarak gösterilmiştir. Grupların şekilde ROS profillerinin grafiği ve çoklu karşılaştırılması verilmiştir.



Şekil 20. Plasenta trofoblast hücrelerindeki ROS profilindeki değişimler.

Tüm grupların L+P grubuna göre ROS + aktivitesi düşük olarak saptanmış ve anlamlı olarak bulunmuştur. (***) $p < 0,001$),(Şekil20)

Tablo 2. Gruplardaki ROS profillerinin çoklu karşılaştırması

	kontrol	C	G	L+P	L+P+C	L+P+G
ROS+	6,92±0,06	5,97± 0,22	5,91± 0,19	16,48±0,61	7,53± 0,11	7,55± 0,19
ROS-	93,8±0,06	94,03±0,22	94,09±0,19	83,52±0,61	92,87±0,11	92,45±0,19

5. TARTIŞMA

Gestasyonel diyabet diğer diyabet türleri gibi sürekli görülme de oluştuğunda anne ve bebek sağlığı için olumsuz sonuçları olabilmektedir. Gestasyonel diyabetin diğer diyabet türlerine benzer birçok özelliği bulunmaktadır. Son dönemde ER stresi birçok metabolik hastalıkları teşvik ettiği gibi gestasyonel diyabet patogenezinde de ön plana çıkmaktadır.

Dünyada gelişen temel tıp bilimleri ve genetik bilimler ışığında metabolik hastalıklarında modellemeleri yapılarak , hastalıkların oluşum patogenezinde moleküler düzeyde bilgiler edinip bu hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yeni ilaçlar ve kişiye özgü ilaç sistemlerinin geliştirilmesi için önemli bir durumdadır.

Çalışmamızda PKR aktivasyonunu LPS ve poly(I:C) gibi iki hücre toksini durumundaki maddeleri uygulayarak ER stresini oluşturulmuştur. PKR, eIF2a yolu aracılığıyla protein sentezini düzenleyen dört kinazdan biridir. Bu kinazlar, PKR'den ayrı olarak (PKR)-benzeri endoplazmik retikulum kinazı (PERK); genel kontrol baskılanmayan 2 kinaz (GCN2) ile düzenlenen eIF2a kinaz (HRI)'dır. Dört kinazın tümü, protein sentezinin hız sınırlayıcı basamağı olan mRNA translasyonunun başlangıç fazının ana düzenleyicisi olan a alt biriminde (eIF2a) ökaryotik başlatma faktörü 2'nin fosforilasyonunu düzenlemektedir. Dört kinazdan herhangi biri tarafından Ser 51 üzerinde eIF2a'nın fosforilasyonu, onun inhibisyonuna ve bunun sonucunda, antiviral faktörleri kodlayan ve entegre stres tepkisine aracılık eden mRNA'ların translasyonu ile birlikte, tam blokajına kadar genel protein sentezinin geçici olarak bastırılmasına yol açmaktadır. (Hoang ve diğerleri, 2018). PKR ayrıca viral olmayan patojenler bakteriyel lipopolisakkarit (LPS), sitokinler (örneğin, TNF-a, IL-1, IFN-y) kalsiyum, tunikamisin, arsenit, tapsigargin, ya da H ile reaktif oksijen türleri, yanlış katlanmış protein cevap stresi sonucundaki endoplazmik retikulum stresi PKR aktivasyonunu uyarmaktadır.(Gil ve Esteban 2000; Garcia ve diğerleri, 2007 ; Hugon ve diğerleri, 2017 ; Watanabe ve diğerleri, 2018).

Plasenta trofoblast hüclerinde PKR aktivasyonunu gerçekleştirmek için uyguladığımız LPS aynı zamanda TRBP proteininin fosforilasyonu gerçekleştirmiş olabilmektedir bu da PKR aktivasyonunu olumlu etkileyebilmektedir. Bundan dolayı ise hücrelerde JNK aktivasyonu gerçekleşebilmektedir. TRPB' nin fosforilasyonundan dolayı inflamasyon artmıştır. PKR'nin metabolik stres koşulları altında TAR RNA bağlayıcı protein (TRBP) ile

etkileşime girdiği ve TRBP'nin fosforilasyonunun PKR'nin aktivasyonu ile sonuçlandığı ve bunun da JNK aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Obez farelerde TRBP'nin aşırı ekspresyonu, glikoz metabolizmasının alevlenmesine neden olurken, karaciğerde TRBP fosforilasyonunun inhibisyonu, iyileştirilmiş insülin direnci ve glikoz metabolizmasının yanı sıra azaltılmış inflamasyon dahil olmak üzere faydalı etkilere sahip olduğu düşünülmüştür. (Nakamura ve diğerleri, 2015).

PKR aktivasyonunun gerçekleşmiş olması UPR yollarını aktif hale getirmiş olabilir ve oksidatif stres belirteçlerini arttırmış olabilmektedir. PKR CaMP II yi indüklediği için oksidatif stres belirteçleri artmıştır. CaMKII ayrıca NADPH oksidaz alt birimi NOX2'yi oksidatif strese neden olmak üzere indüklemektedir, bu da ER stresi sırasında pozitif bir ileri besleme döngüsü olarak PKR'ye bağlı CHOP indüksiyonu ile sonuçlanır. . Önemli bir ROS kaynağı olarak ER'de disülfid bağı oluşumunun rolü göz önüne alındığında, ER'de protein yanlış katlanması oksidatif strese katkıda bulunabilmektedir. ER protein katlanmasının mikro çevresi ciddi şekilde bozulduğunda, boş bir disülfid bağı oluşumu ve azalması döngüsü, büyük miktarda ROS üreterek ve sonunda apoptoza yol açan ER GSH seviyelerini aşağı yönde azaltarak oksidatif strese yol açabilmektedir. (Wei P.C. ve diğerleri 2012

Hücre kültürlerine uyguladığımız antioksidan moleküller olan askorbik asit ve glutatyon oksidatif stres belirteçlerinde pozitif anlamda geriye yönde bir azalma göstermiştir. Glutatyon, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürüp hücreleri endojen ve ekzojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır. (Cindrova-Davies T. Diğerleri 2007). Askorbik asit tokoferoksil radikalini indirgeyerek tokoferolün radikal temizleme aktivitesini düzenlerken, askorbik asitin redoks durumu hücre içi GSH tarafından kontrol edilmektedir. (Bisby RH, Parker AW 1995)

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda PKR aktivasyonunun oksidatif stres üzerine etkileri tespit edilmiş ve anlamlı karşılaştırılması yapılmıştır.

LPS ve poly(I:C) uyguladığımız hücrelerde PKR aktivasyonu gerçekleşmiştir. Glutasyon ve askorbik asit uyguladığımız hücrelerdeki p-PKR aktivasyonu sadece LPS ve poly(I:C) uyguladığımız hücelere göre ekspresyonları anlamlı derecede düşüktür. Glutasyon ve askorbik asit PKR aktivasyonunu olumlu yönde azaltmıştır. Çalışmamızda hücreler sabit glikoz konsantrasyonlarında çoğalmıştır. Farklı glikoz konsantrasyonlarının PKR aktivasyonuna etkileri araştırılabilir. Çalışmamızda p-PKR ekspresyon seviyesi ölçülmüştür. TLR4 proteininin ekspresyon seviyesi tespit edilirse PKR aktivasyonunda TLR4 proteininin etkileşimleri tespit edilebilir. Hps60 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri tespit edilirse PKR aktivasyonu ile korelasyonlar kurulabilir. Nrf2 oksidatif stres durumlarında aktif hale gelen bir mitokontriyal proteindir. Nrf2 nin ekspresyon tespitinin yapılması PKR aktivasyonu ve oksidatif stres belirteçlerinde çoklu karşılaştırma olanağı sağlayabilir.

PKR aktivasyonunun gerçekleşmiş olduğu hücrelerde oksidatif stres belirteçlerinde anlamlı derece artışlar olmuştur. Yalnızca LPS ve poly(I:C) uyguladığımız hücrelerde bu belirteçler en yüksek seviyede oldukları tespit edilmiştir. Hücelere uyguladığımız askorbik asit ve glutasyon oksidatif stres belirteçlerinde anlamlı derecede düşüş gerçekleştirmiştir. Çalışmamızda askorbik asit ve glutasyon konsantrasyonları sabit miktarlarda hücre gruplarına uygulanmıştır. Bu konsantrasyonlar farklı dozlarda uygulanırsa maksimum ve minimum aktiviteler tespit edilebilir. Farklı antioksidan maddeler uygulanırsa PKR aktivasyonunu etkilerini en fazla azaltan moleküller tespit edilebilir.

KAYNAKLAR

- Abedini, A. (2018). RAGE binds preamyloid IAPP intermediates and mediates pancreatic β cell proteotoxicity. *J Clin Invest*, 682-698.
- Adkins, A., Basu, R., Persson, M., Dicke, B., Shah, P., Vella, A., . . . Rizza, R. (2003). Higher Insulin Concentrations Are Required to Suppress Gluconeogenesis Than Glycogenolysis in Nondiabetic Humans. *American Diabetes Association*, 2213-2220.
- Akash, M. (2013). Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem*, 31-32.
- Alberts, B. (2002). Scientist support for biological weapons controls. *Science*, 1135-1137.
- Al-Hijji, J. (2003). Nitric oxide synthase activity in human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium. *Reprod Biol Endocrinol.* , 101-103.
- Atkinson, M., Eisenbarth, G., & Michels, A. (2014). Type 1 diabetes. *Lancet*, 69-82.
- Bae, Y. (2011). Regulation of Reactive Oxygen Species Generation in Cell Signaling. *Mol Cells*, 491-509.
- Ban, N., Yamada, Y., Someya, Y., Miyawaki, K., Ihara, Y., Hosokawa, M., . . . Seino, Y. (2002). Hepatocyte Nuclear Factor-1 α Recruits the Transcriptional Co-Activator p300 on the GLUT2 Gene Promoter. *American Diabetes Association*, 1409-1418.
- Barlowe , C., Yeung, L., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M., . . . Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, 895-907.
- Becattini, B., Zani, F., Breasson, L., Sardi, C., D'Agostino, V., Choo, V., . . . Solinas, G. (2016). JNK1 ablation in mice confers long-term metabolic protection from diet-induced obesity at the cost of moderate skin oxidative damage. *FASEB J.*, 3124-3132.
- Benomar, Y. (2019). Molecular Mechanisms Underlying Obesity-Induced Hypothalamic Inflammation and Insulin Resistance: Pivotal Role of Resistin/TLR4 Pathways. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 130-140.

- Bergman, R. (2002). The evolution of beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest*, 35-45.
- Bisby, R. P. (1995). Reaction of ascorbate with the alpha-tocopheroxyl radical in micellar and bilayer membrane systems. *Arch Biochem Biophys*, 170-178.
- Burton, G. Y. (2017). Mitochondrial – Endoplasmic reticulum interactions in the trophoblast: Stress and senescence. *Elsevier*, 146-155. doi:<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.04.001>
- Bustamante, S., Pang, Y., Romero, S., Pierce, M., Voelker, C., Thompson, J., . . . Miller, M. (1996). Inducible nitric oxide synthase and the regulation of central vessel caliber in the fetal rat. *Circulation*, 1948-1953.
- Butler, A. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 102-110.
- Casanello, P. (2007). Equilibrative nucleoside (ENTs) and cationic amino acid (CATs) transporters: implications in foetal endothelial dysfunction in human pregnancy diseases. *Curr Vasc Pharmacol*, 69-84.
- Cerf, M. (2013). Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 27-37.
- Chan, C. Z. (2004). Diabetes in China: a societal solution for a personal challenge. *The Lancet*, 969-979.
- Chang, Y., Yu, Y., Shew, J., Lee, W., Hwang, J., Chen, Y., & Wei, P. (2013). Deficiency of NPGPx, an oxidative stress sensor, leads to obesity in mice and human. *EMBO Mol Med*, 1165-1179.
- Chaudhuri, G. (1993). NO is more important than PGI₂ in maintaining low vascular tone in fetoplacental vessels. *Am J Physiol*, 2036-2043.
- Cho, N., Shaw, J., Karuranga, S., Huang, Y., Rocha Fernandes, J., Ohlrogge, A., & Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Elsevier*, 271-281.
- Clapham, D. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 1047-1058.

- Cudmore , M. (2006). VEGF-E activates endothelial nitric oxide synthase to induce angiogenesis via cGMP and PKG-independent pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 1275-1282.
- Davies, T. B. (2007). Nuclear Factor- κ B, p38, and Stress-Activated Protein Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways Regulate Proinflammatory Cytokines and Apoptosis in Human Placental Explants in Response to Oxidative Stress. *The American Journal of Pathology*, 1515-1519. doi:DOI: 10.2353/ajpath.2007.061035
- Dejana , E. (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell*, 209-221.
- DiMeglio, L. E.-M. (2018). Type 1 diabetes. *Lancet*, 2449-2462.
- Feng, G. (1992). Identification of double-stranded RNA-binding domains in the interferon-induced double-stranded RNA-activated p68 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 5447-5451.
- Ferrannine, E., Bjorkman, O., Reichard, G., Pilo, A., Olsson, M., Wahren, J., & DeFronze, R. (1985). The Disposal of an Oral Glucose Load in Healthy Subjects: A Quantitative Stud. *American Diabetes Association*, 580-585.
- François Tanti, J. J. (2009). Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Current Opinion in Pharmacology*, 753-762.
- Fukumoto, H., Seino, S., Imura, H., & Bell, G. (1988). Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *PNAS*, 5434-5438.
- Fukumoto, H.; Seino, S.; Imura, H. (1998). Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *PNAS*, 5434-5438.
- Galehdar , Z., Swan, P., Fuerth, B., Callaghan, S., Park, D., & Cregan, S. (2010). Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J Neurosci*, 938-948.
- Gao, Y. (2014). Akt: a new activation mechanism. *nature*, 785-786.

- García , M. (2007). The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie*, 799-811.
- Goncalves, M. H. (2018). Phosphatidylinositol 3-Kinase, Growth Disorders, and Cancer. *N Engl J Med*, 2052-2062.
- Harjutsalo, V., Sjöberg, L., & Tuomilehto, J. (2008). Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet*, 1777-1782.
- Hebert , D. (2010). ERAD substrates: which way out. *Semin Cell Dev Biol*, 526-532.
- Hotamisligil, G. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 860-867.
- Hubel, C. (1999). Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Hubel CA. Oxidative stress in the Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 222-223.
- Hugon, J. (2009). Could PKR inhibition modulate human neurodegeneration. *Expert Rev Neurother*, 1455-1457.
- Hull, CM.; Peakman , M.; Tree, T. (2017). Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it? *Diabetologia*, 1839-1850.
- Hung , T. (2001). In vitro ischemia-reperfusion injury in term human placenta as a model for oxidative stress in pathological pregnancies. *Am J Pathol*, 1031-1043.
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., . . . Hinuma, S. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*, 173-176.
- Jauniaux, E. (1994). Ultrasonographic investigation of placental morphologic characteristics and size during the second trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 130-137.
- Jauniaux, E. (2000). Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol*, 2111-2122.
- Jo, Y. (2010). Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 185-198.
- Kahn, H., Morgan, T., Case, L., Dabelea, D., Davis, E. M., Lawrence, J., & Marcovina, S. (2009). Association of type 1 diabetes with month of birth among U.S. youth: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. *American Diabetes Association*, 2010-2015.

- Khalid, M. (2021). Insulin Signal Transduction Perturbations in Insulin Resistance. *Dermatology and Diabetes*, 16-22.
- Kharroubi, AT.; Darwish, HM. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*, 850-867.
- Kim, J. (2010). TLR4 and Insulin Resistance. *Gastroenterol Res Pract.*, 2-7.
- Knowles, R. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 249-258.
- Krogvold, L., Edwin, B., Buanes, T., Frisk, G., Skog, O., Anagandula, M., . . . Undlien, D. (2015). Detection of a Low-Grade Enteroviral Infection in the Islets of Langerhans of Living Patients Newly Diagnosed With Type 1 Diabetes. *Diabetes* , 1682-1687.
- Kuhen , K. (1997). Isolation of the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase Pkr promoter and identification of a novel DNA element within the 5'-flanking region of human and mouse Pkr genes. *Virology*, 119-130.
- Kukko, M., Kimpimäki, T., Korhonen, S., Kupila, A., Simell, S., Veijola, R., . . . Knip, M. (2005). Dynamics of Diabetes-Associated Autoantibodies in Young Children with Human Leukocyte Antigen-Conferred Risk of Type 1 Diabetes Recruited from the General Population . *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2712-2717.
- Lappas , M. (2005). Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *J Endocrinol*, 457-465.
- Laursen, J. (2001). Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*, 1282-1288.
- Leslie, R. (2010). Predicting Adult-Onset Autoimmune Diabetes. *American Diabetes Association*, 330-331.
- Li, S. (2006). Molecular basis for PKR activation by PACT or dsRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 5-10.

- Li, Y. (2004). Mechanisms of shear stress-induced endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Biol Reprod*, 785-796.
- Liang, H. (2019). Mammalian Target of Rapamycin at the Crossroad Between Alzheimer's Disease and Diabetes. *Adv Exp Med Biol*, 185-225.
- Mackenzie, R. (2014). Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 55-64.
- Manning, B. A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 381-405.
- Marhfour, I., Lopez, X., Lefkaditis, D., Salmon, I., Allagnat, F., Richardson, S., . . . Eizirik, D. (2012). Expression of endoplasmic reticulum stress markers in the islets of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*, 2412-2417.
- Marinoni, E., Di Iorio, R., Lucchini, C., Netta, T., Letizia, C., & Cosmi, E. (2004). Adrenomedullin and nitric oxide synthase at the maternal-decidual interface in early spontaneous abortion. *J Reprod Med*, 153-161.
- Maurel, M. (2014). Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci*, 245-254.
- Meldolesi, J. P. (1998). The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci*, 968-997.
- Meusser, B. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol*, 766-772.
- Mlinar, B. (2007). Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clinica Chimica Acta*, 20-35.
- Mordwinkin, N., Ouzounian, J., Yedigarova, L., Montoro, M., Louie, S., & Rodgers, K. (2013). Alteration of endothelial function markers in women with gestational diabetes and their fetuses. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 507-512.
- Myatt, L. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Elsevier*, 66-69.
- Nakamura, T., Furuhashi, M., Li, P., Cao, H., Tuncman, G., Sonenberg, N., . . . Hotamisligil, G. (2010). Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell*, 338-348.

- Novoa, I. (2001). Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-Mediated Dephosphorylation of eIF2 α . *J Cell Biol*, 1011-1022.
- Oh , Y. (2018). Fatty Acid-Induced Lipotoxicity in Pancreatic Beta-Cells During Development of Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9-16.
- Ostman, J., Lönnberg, G., Arnqvist, H., Blohmé, G., Bolinder, J., Schnell, A., . . . Nyström, L. (2008). Gender differences and temporal variation in the incidence of type 1 diabetes: results of 8012 cases in the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden 1983-2002. *Journal of Internal Medicine*, 386-394.
- Porter, K. (1945). A STUDY OF TISSUE CULTURE CELLS BY ELECTRON MICROSCOPY : METHODS AND PRELIMINARY OBSERVATIONS. *J Exp Med*, 223-246.
- Practice Guideline. (2018, February). ACOG Practice Bulletin No. 190: Gestational Diabetes Mellitus. *Obstet Gynecol*, 49-64.
- Rabiee, A. K.-L. (2018). Distinct signalling properties of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in mediating insulin/IGF-1 action. *Cell Signal*, 1-15.
- Ribatti , D. (2009). Morphological and molecular aspects of physiological vascular morphogenesis. *Angiogenesis*, 101-111.
- Rivera, E., Lizarbe, T., Moreno, M., Novoa, J., Rodrigo, J., Fernández, A., & Zaragoza, C. (2005). Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 3685-3690.
- Robert A Saxton, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 960-976.
- Rouillard, A. (2016). The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database (Oxford)*, 100-103.
- Ruderman , N., Xu, X., Nelson, L., Cacicedo, J., Saha, A., Lan, F., & Ido, Y. (2010). AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 751-760.
- Ruiz, J. (2017). Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. *Cell*, 692-706.
- Sharma, M., Aggarwal, S., Nayar, U., Kishore Vikram , N., Misra, A., & Luthra, K. (2021). Differential expression of insulin receptor substrate-1(IRS-1) in visceral and

subcutaneous adipose depots of morbidly obese subjects undergoing bariatric surgery in a tertiary care center in north India; SNP analysis and correlation with metabolic profil. *Diabetes Metab Syndr*, 981-986.

Silva, J. (2015). Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. *Cell Adhesion & Migration*, 88-110.

Skyler, J., Bakris, G., Bonifacio, E., Darsow, T., Eckel, R., Groop, L., . . . Ratner, R. (2017). Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *American Diabetes Association*, 241-255.

Sobrevia , L., Salsoso , R., Fuenzalida , B., Barros, E., Toledo , L., Silva , L., . . . Leiva, A. (2016). Insulin Is a Key Modulator of Fetoplacental Endothelium Metabolic Disturbances in Gestational Diabetes Mellitus. *Front Physiol*, 117-119.

Świdarska, E., Strycharz, J., Wróblewski, A., Szemraj, J., Drzewoski, J., & Śliwińska, A. (2018). Role of PI3K/AKT pathway in insulin-mediated glucose uptake. *Blood Glucose Levels*, 1-18.

Takeda, J., Kayano, T., Fukomoto, H., & Bell, G. I. (1993). Organization of the Human GLUT2 (Pancreatic β -Cell and Hepatocyte) Glucose Transporter Gene. *American Diabetes Association*, 773-777.

Todd, J. (2010). Etiology of Type 1 Diabetes. *Cell Press* , 457-467.

Voorde, J. (1987). Release of endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vessels. *Circ Res*, 517-522.

Wang, D., Wang, Y., Zou, X., Shi, Y., Liu, Q., Huyan, T., . . . Tie, L. (2020). FOXO1 inhibition prevents renal ischemia–reperfusion injury via cAMP-response element binding protein/PPAR- γ coactivator-1 α -mediated mitochondrial biogenesis. *Br J Pharmacol*, 432-448.

Wang, J., Wang, C., Li, S., Li, W., Yuan, G., Pan, Y., & Chen, H. (2017). Anti-diabetic effects of Inonotus obliquus polysaccharides in streptozotocin-induced type 2 diabetic mice and potential mechanism via PI3K-Akt signal pathway. *Biomed Pharmacother*, 1669-1677.

Westermeier , F., Riquelme , J., Pavez , M., Garrido, V., Díaz , A., Verdejo, H., . . . Lavandero , S. (2016). New Molecular Insights of Insulin in Diabetic Cardiomyopathy. *Front Physiol*, 125-127.

- Wisessaowapak C, W. P. (2021). Arsenic disrupts neuronal insulin signaling through increasing free PI3K-p85 and decreasing PI3K activity. *Toxicol Lett*, 40-50.
- Xu, H., Barnes, G., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C., . . . Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 1821-1830.
- Yamaguchi, N. (2005). Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. *FEBS Letters*, 6821-6826.
- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., . . . Mori, K. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell*, 365-376.
- Yen, C. (2008). Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res*, 2283-2301.
- Zhang , Z., Zhang , L., Zhou, L., Lei , Y., Zhang , Y., & Huang, C. (2019). Redox signaling and unfolded protein response coordinate cell fate decisions under ER stress. *Redox Biol*, -.
- Zhu, Q., Ghoshal, S., Rodrigues, A., Gao, S., Asterian, A., Kamenecka, T., . . . Chakraborty, A. (2016). Adipocyte-specific deletion of Ip6k1 reduces diet-induced obesity by enhancing AMPK-mediated thermogenesis. *J Clin Invest*, 4273-4288.
- Zhu, Y. (2016). Prevalence of Gestational Diabetes and Risk of Progression to Type 2 Diabetes: a Global Perspective. *Curr Diab Rep*, 92-118

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Plasental Trofoblast Hücre Serilerinde Pkr Kinaz Aktivasyonun Oksidatif Stres Üzerine Etkisi” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Ramazan KARAYEL

... / ... / ...

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, adı : KARAYEL Ramazan
Uyruk : T.C
Doğum yeri ve tarihi : Ahmetli 1933
Telefon : 0533 306 72 27
E posta : ramazankryl45@gmail.com
Yabancı dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Yıl
Lisans	Uşak Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2018

BURSLAR ve ÖDÜLLER

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Kurum	Ünvan
2011-	Turgutlu Devlet Hastanesi	Hemşire

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

2. PROJELER

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler