

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

GESTASYONEL DİYABETTE PLASENTA DOKULARINDA
İNSÜLİN DİRENCİ VE İNFLAMASYONUN BELİRLENMESİ

ELİF BAYRAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdullah YALÇIN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-21030 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2023

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Elif BAYRAK tarafından hazırlanan “Gestasyonel Diyabette Plasenta Dokularında İnsülin Direnci ve İnflamasyonun Belirlenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 26/12/2022

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

Üye : Prof. Dr. Gizem DÖNMEZ 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 Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK
Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp ve ilgiyle bana faydalı bilgilerini sunan ve her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdullah YALÇIN' a,

Engin akademik bilgilerinin yanı sıra yol göstericiliğiyle de hayatıma dokunan, güzel enerjisiyle motivasyon sağlayan ve başarısıyla örnek alınası çok sevgili hocam Prof. Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN'a,

Bizleri kırmayıp tez savunmamda jüri üyeliğini kabul eden değerli hocam Doç. Dr. Ayşegül YILDIZ'a,

Hastaların teşhisinin konulmasında ve dokuların temin edilmesinde emekleri olan değerli hocalarım Doç. Dr. Mustafa ÜNÜBOL' a ve Doç. Dr. Meryem KÜREK EKEN' e,

Tüm hayatım boyunca maddi-manevi desteklerini benden esirgemeyen, her daim arkamda bildiğim ve sonsuz güvenleriyle yaşamıma ışık tutan canım aileme,

Günlerce süren doku homojenize etme maceramda beni yalnız bırakmayan, deneylerimde bilgi, tecrübeleriyle yardımcı olan ve aynı zamanda bu süreçte bana motivasyon kaynağı olan canım arkadaşlarım Ayşenur Akkulak'a ve Emre Yeşliören'e,

Tez çalışmamda her yardıma ihtiyacım olduğunda tecrübelerini benimle paylaşan Arş. Gör. Dr. Umut Kerem Kolaç'a, Arş. Gör. Dr. Bakiye Göker Bağca'ya, Temel Tıp Bilimi'ndeki değerli hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

Ve son olarak da bu hayatı keyifli kılan ve enerji kaynaklarım canım yiğenlerim Eymen Kerem'e, Ecrin'e, Miray'a, Emir' e ve canım kardeşim Efe'ye çok büyük teşekkürlerimi sunuyorum.

Elif BAYRAK

Aydın, 2022

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ.....	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Diyabetes Mellitus	3
2.1.1. Diabetes Mellitus Tipleri	3
2.1.2. Karbonhidrat Metabolizması	4
2.1.3. Diabetes Mellitusun Komplikasyonları.....	5
2.1.4. İnsülinin Fizyolojik Rolü-İnsülin Direnci	7
2.1.4.1. Protein Kinaz B (PKB/AKT)	8
2.1.4.2. İnsülin Reseptör Substratı 1 (IRS-1)	9
2.1.5. İnflamasyon	11
2.1.5.1. Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF- α)	12
2.1.5.2. İnterlökin-1 Beta (IL-1 β)	13
2.1.5.3. İnterlökin-6 (IL-6)	13
2.1.5.4. Nükleer Faktör Kappa-B Yolağı (NF- κ B)	14

2.2. Hamilelikte Maternal Metabolik Değişimler	15
2.2.1. Hamilelikte Diyabet : Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)	16
2.3. Plasenta.....	20
2.3.1. Plasentanın Fizyolojik Yapısı.....	20
2.3.2. Gestasyonel Diabetes Mellitusta Plasenta	21
2.4. Hamilelik İmmünolojisi.....	22
2.4.1. Gestasyonel Diabetes Mellitus'ta İnflamasyon	23
2.5. Hamilelik Hormonları ve GDM.....	24
2.5.1 Maternal Hormonlar	24
2.5.2. Plasental Hormonlar	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Gereç	27
3.1.1. Cihazlar.....	27
3.1.2. Biyolojik Materyal	27
3.1.3. Kimyasal Maddeler, Kitler, Enzimler, Reaktifler ve Laboratuvar Malzemeleri.....	28
3.1.4. Tamponlar	29
3.1.5 Antikorler	29
3.1.6. Primerler	30
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Hasta Seçimi ve Plasenta Dokularının Hazırlanması	30
3.2.1.1. Hücre Hatlarının Pasajlanması.....	31
3.2.1.2. Hücrelerin Dondurulması	31
3.2.1.3. Hücrelerin Çözülmesi.....	32
3.2.1.4. SWAN71 Hücrelerinin Sitokinlerle Muamelesi.....	32
3.2.2. Hücrelerden Protein İzolasyonu	32
3.2.3. Proteinlerin Kantitatif Analizi.....	33

3.2.4. Western Blot Analizi.....	34
3.2.5. RNA İzolasyonu.....	34
3.2.6. cDNA Sentezi.....	35
3.2.7. Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (q-PCR)	36
3.2.8. ELISA Analizi	37
3.2.9. İstatiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR.....	42
4.1. Kontrol, GDM ve Pre-DM Gruplarındaki Hamile Kadınların Karakteristik Özellikleri	42
4.2. Plasental Dokularındaki İnflamasyonun q-PCR Analizi ile Belirlenmesi.....	47
4.3. İnflamasyon Ortamı Oluşturularak İnsülin Yolağı İndüklenen Plasenta Hücrelerinde p-AKT ve p-IRS-1 Ekspresyonlarının Belirlenmesi.....	51
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	58
EKLER.....	64
EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi	64
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	65
ÖZ GEÇMİŞ.....	66

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Alfa
ADA	: Amerikan Diyabet Derneği
AKT	: Protein Kinaz B
ALT	: Alanin Transaminaz
AMPK	: 5' AMP ile Aktifleştirilmiş Protein Kinaz
B	: Beta
Bp	: Baz Çifti
°C	: Santigrat Derece
cDNA	: Komplementer DNA
DM	: Diabetes Mellitus
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi
ER	: Endoplazmik Retikulum
g	: Gram
GDM	: Gestasyonel Diabetes Mellitus
GLUT	: Glukoz Transporter
GSK-3	: Glikojen Sentaz Kinaz-3
HBA1C	: Glikolize Hemoglobin
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
IL	: İnterlökin
İR	: İnsulin Reseptörü
kDa	: Kilodalton
mg	: Mikrogram
mg	: Miligram

min	: Dakika
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells
ng	: Nanogram
OGTT	: Oral Glikoz Tolerans Testi
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
pg	: Picogram
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PPAR	: Peroksizom Proliferatörle Aktive Edilen Reseptör
Pre-DM	: Hamilelik Öncesi Diyabet
q-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türü
RT	: Room temprature
sn	: Saniye
T1DM	: Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	: Tip 2 Diabetes Mellitus
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
U	: Enzim Birimi
μl	: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. PI3K/AKT sinyal yolu	9
Şekil 2. İnsülin sinyal yolları.....	10
Şekil 3. 2005–2018'de küresel GDM prevalansı	17
Şekil 4. İnsan plasentasının bariyeri	20
Şekil 5. Gebelik komplikasyonlarındaki pro- ve anti-inflamatuvar sitokin dengesizliği	22
Şekil 6. BCA analizinin standart grafiği.....	33
Şekil 7. Plasental doku proteininin standart grafiği.....	37
Şekil 8. ELISA analizinde kullanılan IL-1 β antikorunun standart eğri grafiği.....	38
Şekil 9. ELISA analizinde kullanılan IL-6 ELISA antikorunun standart eğri grafiği.....	39
Şekil 10. ELISA analizinde kullanılan TNF- α antikorunun standart eğri grafiği	39
Şekil 11. ELISA analizinde kullanılan NF- κ B antikorunun standart eğri grafiği.....	40
Şekil 12. Kontrol, GDM ve Pre-DM'de plasenta dokusunun IL-1 β seviyelerinin ELISA sonucu	43
Şekil 13. Kontrol, GDM ve Pre-DM'de plasenta dokusunun IL-6 seviyelerinin ELISA sonucu	44
Şekil 14. Kontrol, GDM ve Pre-DM'de plasenta dokusunun TNF- α seviyelerinin ELISA sonucu	45
Şekil 15. Kontrol, GDM ve Pre-DM'de plasenta dokusunun NF- κ B seviyelerinin ELISA sonucu	46
Şekil 16. Kontrol, GDM ve Pre-DM'de plasenta dokusunun IL-1 β mRNA seviyelerinin q-PCR sonuçları	47
Şekil 17. Kontrol, GDM ve Pre-DM'de plasenta dokusunun IL-6 mRNA seviyelerinin q-PCR sonuçları.....	48
Şekil 18. Kontrol, GDM ve Pre-DM'deki plasenta dokusunun TNF-a mRNA seviyelerinin q-PCR sonuçları.....	49

Şekil 19. Kontrol, GDM ve Pre-DM'de plasenta dokusunun NF- κ B mRNA seviyelerinin q-PCR sonuçları	50
Şekil 20. Sitokinlere maruz kalan SWAN71 hücrelerinin p-AKT/AKT ve p-IRS-1/IRS-1 ekspresyon seviyeleri Western Blot analizi sonucu	52

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi	27
Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin, primerlerin, kitlerin, enzimlerin, reaktiflerin ve laboratuvar gereçlerinin listesi.....	28
Tablo 3. Çalışmada Western blot için kullanılan tamponlar.	29
Tablo 4. Çalışmada kullanılan antikorların listesi	29
Tablo 5. Çalışmada kullanılan primerler	30
Tablo 6. BCA analizinin standart grafiği.....	33
Tablo 7. cDNA sentezi için kullanılan bileşenleri	35
Tablo 8. cDNA sentezinin reaksiyon koşulu.	36
Tablo 9. q-PCR reaksiyon bileşenleri.....	36
Tablo 10. q-PCR reaksiyonu.....	37
Tablo 11. ELISA analizi için kullanılan antikorların standart konsantrasyonları	38
Tablo 12. Gruplardaki hamile kadınların/bebeklerin karakteristik özellikleri	42
Tablo 13. Gruplardaki hastaların IL-1 β seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi..	43
Tablo 14. Gruplardaki hastaların IL-6 seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi..	44
Tablo 15. Gruplardaki hastaların TNF- α seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi	45
Tablo 16. Gruplardaki protein örneklerinin NF- κ B seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi.....	46
Tablo 17. Gruplardaki protein örneklerinin IL-1 β m-RNA seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi.	47
Tablo 18. Gruplardaki protein örneklerinin IL-6 m-RNA seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi.....	48

Tablo 19. Gruplardaki protein örneklerinin TNF- α m-RNA seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi.....	49
Tablo 20. Gruplardaki protein örneklerinin NF- κ B mRNA seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi.....	50

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Sitokinlere maruz kalan SWAN71 hücrelerinin p-AKT/AKT ve p-IRS-1/IRS-1 ekspresyon seviyelerinin membran görüntüsü.....	51
--	----

ÖZET

GESTASYONEL DİYABETTE PLASENTA DOKULARINDA İNSÜLİN DİRENCİ VE İNFLAMASYONUN BELİRLENMESİ

Bayrak E., Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2022.

Amaç: Bu çalışmanın amacı GDM'li kadınlardan alınan plasenta örneklerinde inflamasyon ve insülin direnci ile ilişkili biyomarkörlerin hamilelik öncesi diyabet tanısı almış hamile kadınlardan alınan plasenta örneklerindeki seviyesinin kıyaslanmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma, etik kurul onayı alındıktan sonra Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne gelen hamile kadınlardan alınan plasenta doku örnekleri ile gerçekleştirildi. Gestasyonel diyabetli kadınlardan (GDM grubu)(n:10), glukoz intoleransı olmayan gebelerden (kontrol grubu) (n:12) ve hamilelik öncesi diyabet tanısı almış kadınlardan (Pre-DM grubu)(n:10) plasenta örnekleriyle 3 grup belirlendi. Plasenta dokularında inflamasyon düzeyini belirlemek için IL-1 β , IL-6, TNF- α sitokinleri ve NF- κ B sinyal yolu q-PCR ve ELISA analizleri kullanılarak analiz edildi. ELISA analizinde, kullanılan standartlar (IL-1 β , IL-6, TNF- α ve NF- κ B) ile trofoblast hücrelerinde (Swan71) inflamasyon ortamı oluşturuldu. LPS+Pol I:C ve kontrol grubu da dahil olmak üzere 6 gruba insülin verilerek insülin sinyal yolu indüklendi. Daha sonra insülin sinyal yolağında önemli rol oynayan IRS-1, Akt, p-Akt ve p-IRS-1 protein ekspresyon seviyelerine bakıldı. Ardından her grupta sinyalin ne kadar aktive olduğu Western blot ile analiz edildi. Veriler tek yönlü ANOVA testi kullanılarak değerlendirildi.

Bulgu: Çalışmadaki veri sonuçlarına göre plasenta dokularında mRNA düzeyinde IL-1 β , IL-6, TNF- α ve NF- κ B seviyeleri kıyaslandığında kontrol, GDM ve Pre-DM gruplarının hiçbirinde anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Ancak bu durum ELISA analizi ile incelendiğinde IL-1 β , IL-6, TNF- α ve NF- κ B seviyeleri gruplar arasında farklı düzeyde olduğu tespit edilmiştir. IL-1 β seviyesi, GDM grubunda ve Pre-DM grubunda kontrol gruba göre; IL-6 ve TNF- α seviyesi, GDM grubunun diğer iki gruba göre; NF- κ B seviyesi GDM

grubu kontrole göre ve Pre-DM grubuna göre anlamlı bir şekilde artış gösterdiği sonucu elde edildi. İnflamasyon ortamı oluşturulan trofoblast hücrelerinde Akt fosforillenmesi TNF- α grubunda daha fazla görüldü. IRS-1 fosforillenmesi ise kontrole kıyasla en fazla TNF- α ve NF- κ B grubunda elde edildi.

Sonuç: Plasenta dokusunda GDM inflamasyonunun, Pre-DM grubuna göre görece arttığı gözlemlendi. Bu artış mRNA düzeyinde görülmedi ancak protein seviyesinde kontrol ve Pre-DM grubuna göre arttı. Bu durum inflamasyona neden olan etkenin maternal dokulardan gelen sitokinler olduğunu düşündürmektedir. Diyabette insülin direncinin neden olduğu inflamasyonun sonucunda salgılanan sitokinlerin, maternal dokudan plasentaya geçerek buradaki sitokin seviyesinde artışa neden olduğu sonucuna ulaşılabilir.

Anahtar kelimeler: Diyabet, Gestasyonel Diyabet, İnflamasyon, İnsülin Direnci, Plasenta.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF INSULIN RESISTANCE AND INFLAMMATION IN THE PLACENTAL TISSUE DURING GESTATIONAL DIABETES MELLITUS

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

Objective: The aim of this study was to compare the levels of biomarkers associated with inflammation and insulin resistance in placental samples from women with GDM and in placenta samples from pregnant women who were previously diagnosed with diabetes.

Material and Methods: The study was carried out with placenta tissue samples taken from pregnant women who came to Aydın Adnan Menderes University Training and Research Hospital after the approval of the ethics committee. Three groups were determined with placenta samples from women with gestational diabetes (GDM group) (n:10), pregnant women without glucose intolerance (control group) (n:12), and women diagnosed with diabetes before pregnancy (Pre-DM group) (n:10). IL-1 β , IL-6, TNF- α cytokines and NF-kB signaling pathway were analyzed using q-PCR and ELISA analyzes to determine the level of inflammation in placental tissues. Inflammation environment was created in trophoblast cells (Swan71) with the standards (IL-1 β , IL-6, TNF- α and NF-kB) used in ELISA analysis. Insulin signaling pathway was induced by administering insulin to 6 groups, including LPS+Pol I:C and control group. Then, IRS-1, Akt, p-Akt and p-IRS-1 protein expression levels, which play an important role in the insulin signaling pathway, were examined. Then, how much the signal was activated in each group was analyzed by Western blot. Data were evaluated using one-way ANOVA test.

Results: According to the data results in the study, no significant difference was observed in any of the control, GDM and Pre-DM groups when the mRNA levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and NF-kB levels were compared in placental tissues. However, when analyzed by ELISA, IL-1 β , IL-6, TNF- α and NF-kB protein levels were found to be at different levels between the groups. IL-1 β level in the GDM group and Pre-DM group compared to the control group; IL-

6 and TNF- α levels were found in the GDM group compared to the other two groups; It was concluded that NF-kB level increased significantly in the GDM group compared to the control and Pre-DM group. Akt phosphorylation in trophoblast cells in which an environment of inflammation was created was more common in the TNF- α group. IRS-1 phosphorylation was the highest in TNF- α and NF-kB groups compared to the control.

Conclusion: It was observed that GDM inflammation in the placental tissue increased relative to the Pre-DM group. This increase was not seen in the mRNA level, but increased in the protein level compared to the control and Pre-DM groups. This suggests that the factor causing inflammation is caused by cytokines from maternal tissues. It can be concluded that the cytokines secreted as a result of inflammation caused by insulin resistance in diabetes pass from the maternal tissue to the placenta and cause an increase in the cytokine level there.

Keywords: Diabetes, Gestational Diabetes, Inflammation, Insulin Resistance, Placenta.

1. GİRİŞ

Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM), ciddi risk ve olumsuz sağlık etkileri nedeniyle araştırmalarda önemli ilgi görmektedir. GDM, ilk olarak gebeliğın ikinci trimesterinde veya üçüncü trimesterinde kendini gösteren bir diyabet türüdür. En yaygın metabolik hastalıktır ve gebelik sırasında kadınların %25 kadarını etkileyebilir. Hamilelik, hem hamile kadınları hem de doğmamış çocuklarının uzun vadeli sağılığını etkileyen hassas bir dönemdir (Choudhury & Devi Rajeswari, 2021).

Hamilelik sırasında, metabolik durum önemli ölçüde değişir. Bu dönemin önemli sonuçlarından biri insülin etkisinin ve duyarlılığının değişmesidir. Bu etki, gebeliğın ikinci yarısında insülin direnci ve bunun sonucunda ortaya çıkan hiperglisemi nedeniyle artar (Choudhury & Devi Rajeswari, 2021).

GDM ile komplike olan gebeliklerde, dolaşımdaki artan inflamatuvar moleküllerin bir sonucu olarak metabolik ve inflamatuvar yollarda düzensizlik vardır (Siddiqui ve diğerleri, 2019). GDM'de maternal immün toleransın yanı sıra plasental inflamasyon dengesi bozular ve aşırı insülin direnci meydana gelebilir. Salgılanan inflamatuvar sitokinlerin neden olduğu inflamasyonun, GDM'de artan insülin direnciyle bağlantılı olduğuna inanılmaktadır (Sharma ve diğerleri, 2022).

Pro-inflamatuvar (TNF- α ve IL-6) ve anti-inflamatuvar belirteçlerin (IL-4 ve IL-10) anormal salgılanması ile insülin direnci arasında çeşitli çalışmalarda bir ilişki kurulmuştur. Araştırmacılardan bazıları, GDM'den etkilenen kadınlarda artan TNF- α ve IL-6 düzeylerini ve azalan IL-10 düzeylerini doğrulamıştır. TNF- α 'nın ayrıca beta fonksiyonunu ve insülin sinyallemesini bozduğu da rapor edilmiştir, bu da GDM gelişiminin bir nedeni olarak atfedilebilmektedir (Siddiqui ve diğerleri, 2019).

IL-6, inflamasyonda aşırı derecede eksprese edilir. Esas olarak plasenta üretimine bağlı olarak hamilelikte IL-6'daki artış, gebeliğe bağlı insülin direnci ile ilişkilendirilmiştir. Bazı çalışmalarda, IL-6 konsantrasyonu, vücut yağ yüzdesi, BMI, insülin duyarlılığı ve hamilelik sırasında ve doğumdan sonra plazma glukoz seviyeleri ile pozitif korelasyon göstermiştir (Abell ve diğerleri, 2015).

GDM ayrıca daha yüksek oranda IRS-1 serin fosforilasyonunu sergilemektedir. IRS-1'in serin fosforilasyonu, fosfoinositid 3 kinaza (PI3K) bağlanma yeteneğini bozmakta ve IR-p'nin tirozin kinaz aktivitesini inhibe etmektedir (Nguyen-Ngo ve diğerleri, 2019).

Protein kinaz B (AKT), kritik bir sinyal iletim aracı olarak diyabetik komplikasyonların gelişiminde önemli bir işleve sahiptir (Zhang ve diğerleri, 2019). Fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K)-protein kinaz B/Akt (Akt) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolları, insülin sinyali bozuk olduğunda işlevini yerine getiremez, bu da hücrelerin metabolizmasını ve normal fizyolojik yanıtı bozmaktadır (Villalobos ve diğerleri, 2019).

Çalışmada GDM'li kadınlardaki plasenta dokusunda GDM ilişki biyomarkörlerin tespiti yapılarak GDM tanısındaki:

- I. GDM'li kadınların plasentalarında insülin sinyallemesini göstermek
- II. GDM'li kadınlarda inflamasyon biyo-belirteçlerinin analiz etmek
- III. GDM'li ve daha önceden diyabet tanısı konulmuş kadınlarda hem insülin sinyallenmesi hem de inflamasyon belirteçlerinin karşılaştırmak.

Çalışmamızda GDM'li kadınlardan alınan plasenta örneklerinde inflamasyon ve insülin direnci ile ilişkili biyomarkörlerin daha önceden diyabet tanısı almış hamile kadınlardan alınan plasenta seviyesinin kıyaslanması gerçekleştirildi. Elde edilen verilerle birlikte gruplar arasındaki değişimlerin sonucunda maternal dolaşımdaki sitokinlerin plasentaya taşınması ile mi, yoksa plasentada var olan sitokinlerin mi bu duruma neden olduğu tartışıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM), insülin sekresyonundaki yetersizlik veya biyolojik fonksiyonundaki problemlerden kaynaklanan ve yüksek kan şekeri seviyeleri ile karakterize edilen bir hastalıktır (Guthrie ve diğerleri, 2004; Choudhury & Devi Rajeswari, 2021).

Önceleri tek bir hastalık olarak değerlendirilmesinin yanı sıra, DM'nin bugün çeşitli heterojen hastalıkları içerdiği ve daha geniş bir hastalık yelpazesine yol açtığı bilinmektedir (Choudhury & Devi Rajeswari, 2021). DM birçok genetik, epigenetik ve patofizyolojik anormallikleri, farklı komplikasyon profilleri ve enfeksiyonlar, besinler, egzersiz rejimleri ve bağırsak mikrobiyomu gibi çoklu çevresel etkileri olan bir sendromdur (Hoogwerf, 2020).

DM dünyada en sık görülen metabolik hastalıklardan biridir. DM, dünya popülasyonunda artan morbidite ve ölüm oranları nedeniyle kanser ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra gelmektedir (Choudhury & Devi Rajeswari, 2021). Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) tahminlerine göre, 2017 yılında dünya çapında 425 milyondan fazla kişiye diyabet teşhisi konulmuştur ve bu sayının 2045 yılına kadar 629 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir (Choudhury & Devi Rajeswari, 2021).

2.1.1. Diabetes Mellitus Tipleri

Amerika Diyabet Birliği (ADA) tarafından 2021 yılında belirtilen rapora göre, DM'nin dört farklı biçimi vardır:

(1) Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM), β -hücre yıkımına neden olan otoimmün bir hastalık, yetişkinlikteki latent otoimmün diyabet dahil olmak üzere genellikle insülin yetmezliğine yol açmaktadır;

(2) Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM), genellikle insülin direncinden kaynaklanan β -hücresi tarafından salgılanan insülin miktarının yetersiz olması sonucu ortaya çıkmaktadır;

(3) Spesifik tip olan Monogenik Diyabet Sendromları (MODY), pankreatik ekzokrin hastalıkları ve kimyasal maddeler nedeniyle veya organ nakli sonrası yenidoğan diyabeti ve olgunluk başlangıçlı diyabet gibi diğer nedenlerin başında gelen diyabettir;

(4) Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM), hamileliğin özellikle ikinci veya üçüncü trimesterında tanısı konulan diyabet türüdür (Amerikan Diyabet Derneği, 2021).

DM, açlık sırasındaki plazma glikoz seviyesi veya 75-gr glikoz kullanılarak gerçekleştirilen oral glikoz tolerans testinin (OGTT) ardından iki saatlik plazma glikoz seviyesi gibi plazma glikoz kriterleri veya A1C kriterleri kullanılarak belirlenebilmektedir. Bu testler DM teşhisi için uygundur, ancak her insanda DM'yi her zaman tespit edememektedir (Amerikan Diyabet Derneği, 2021).

2.1.2. Karbonhidrat Metabolizması

Vücuda alınan besinler, sindirildikten sonra bağırsak sistemi yoluyla kan dolaşımı tarafından absorbe edilir. Alınan besinlerin bir kısmı hemen kullanılırken, çoğunluğu karbonhidratlar ve lipidler başta olmak üzere daha sonra kullanılmak için saklanır (Guthrie ve diğerleri, 2004). Yağ, ihtiyaç halinde kullanılmak için yağ hücrelerinde depolanır. Karbonhidrat, özellikle beyinde daha sonra kullanılmak üzere, karaciğer ve kas hücrelerinde glikojen olarak depolanır (Guthrie ve diğerleri, 2004).

Memeli hücrelerde glikoz taşınması metabolizma için gerekli bir durumdur. Taşınma işlemi kolaylaştırılmış difüzyon ile glikoz taşıyıcılar aracılığıyla meydana gelir. Bu taşınma bazı hücre tiplerinde, kas dokusunda, kalpte, beyaz ve kahverengi adipoz dokuda insülin ile uyarılır. Glikoz taşınmasında insülin aksiyonu insülin reseptörüne (İR) bağlanmasıyla gerçekleşir. Glikoz taşınmasında görevli beş tip glikoz taşıyıcı vardır: GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 ve GLUT5. GLUT1 ve GLUT4 insüline duyarlı dokularda bir arada bulunur. GLUT4, GLUT1'den çok daha fazladır. GLUT1, çoğunlukla bazal glikoz taşınmasında rol oynar. Bu nedenle, bazal durumda GLUT1, plazma zarında bulunan ana taşıyıcıdır ve GLUT4 çoğunlukla hücre içerisindedir. İnsülin stimülasyonundan sonra GLUT4 ve ayrıca GLUT1 (ancak çok daha az ölçüde) hücre yüzeyine taşınır (Assimacopoulos-Jeannet ve diğerleri, 1991).

Glikoz, pankreas β -hücreleri tarafından insülin salgılanmasının birincil düzenleyicisidir ve bir dizi olayı tetikler. İnsülinin işlevi, iskelet kası ve yağ dokusu gibi insülin hedef dokularında glikoz alımını uyararak kan glikoz seviyelerini homeostatik bir aralıkta tutmayı sağlar (Rachdaoui, 2020). İnsülin, kan glukoz seviyesinin etkisi altında β -hücreleri tarafından oluşturulur. Üretilen insülin, hücre yüzeyinde bulunan bir protein olan İR ile hücre düzeyinde etkileşime girmesiyle her biri ayrı bir enzim tarafından gerçekleştirilen bir dizi hücre içi süreci tetikler (Guthrie ve diğerleri, 2004). İnsülinin, İR'lerine bağlanması, insülinin fizyolojik etkilerine aracılık eder (Artunç ve diğerleri, 2016). Biyolojik etkilerine, en az iki ek varyantı, İR-A ve İR-B insülin reseptörlerinin aktivasyonu aracılık eder. İR-A'nın insülin için afinitesi, İR-B ile karşılaştırıldığında daha yüksektir ve bu varyantların aktivasyonu, β -alt birim otofosforilasyonunun aktivasyonu ile sonuçlanır. İR otofosforilasyonu, insülin reseptör substratlarının (IRS'ler) devreye girmesine ve aktivatör fosforilasyonuna neden olur (Pardo ve diğerleri, 2019).

İnsülin, GLUT4 üzerinden etki gösterir. İnsülinin İR ile etkileşimi sonucunda GLUT4, hücre yüzeyine geçerek, glikoz ve protein gibi daha büyük moleküllü besinlerin hücreye girmesine olanak sağlar (Guthrie ve diğerleri, 2004). Böylece homeostatik denge düzenlenir.

2.1.3. Diabetes Mellitusun Komplikasyonları

Diyabet komplikasyonlarının gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmaya yönelik çok sayıda çalışma olmasına rağmen, bunların kesin patofizyolojisi tam olarak anlaşılammıştır. Ancak ana mekanizmalardan biri oksidatif strestir. Oksidatif stres, serbest radikal oluşum hızı antioksidan savunma sistemlerini aştığında gelişmekte ve bu da serbest radikallerin toksik etkilerine neden olmaktadır. Serbest radikal türleri biyolojik homeostazda önemli fizyolojik bileşenlerdir, ancak üretimleri vücudun antioksidan kapasitesinden daha fazla ve aşırı arttığında oksidatif stres ortaya çıkmaktadır (Yaribeygi ve diğerleri, 2020).

DM, artan reaktif oksijen türleri oluşumuna bağlı artan oksidatif stres ile ilişkili bir durumdur ve altta yatan ana neden hiperglisemidir. Ayrıca proinflamatuvar bir ortam, sitokin sinyallemesinden dolayı ROS oluşumunu uyarılmaktadır (Gauster ve diğerleri, 2017). Oksidatif stres, patofizyolojik moleküler mekanizmaları indükleyen ve insülin direncine ve DM'ye yol açan bir dizi zararlı yolu başlatan, insülin direnci gelişiminin yanı sıra diyabet

komplifikasyonları için önemli bir olaydır (Yaribeygi ve diğeri, 2020).

Makrovasküler, mikrovasküler ve nörolojik komplifikasyonlar olmak üzere üç diyabetik komplifikasyon mevcuttur. Ancak yüksek kan şekeri seviyeleri tüm bu komplifikasyonlarda ortak bir nedendir (Guthrie ve diğeri, 2004).

Hamilelik dönemindeki komplifikasyonlar ise maternal diyabete yanıt olarak meydana gelen fonksiyonel değişiklikleri, azalmış yağ asidi oksidasyonunu, bozulmuş mitokondriyal fonksiyonu ve artan reaktif oksijen türlerinin üretimini içerir. Plasentada ise anormal plasental fonksiyon, besin transferini etkileyebilir ve fetal dolaşıma salınan biyoaktif moleküllerin oluşumunu değiştirebilir (Jiang ve diğeri, 2017). GDM gebeliğindeki plasentalar, normal gebeliklerdeki plasentalardan daha büyük ve daha ağırdır. GDM'de doğum ağırlığı ve plasenta ağırlığı normal gebeliklere göre daha yüksektir. Bu nedenle GDM durumunda, büyüyen fetüsün artan beslenme gereksinimlerine yanıt vermek için plasentanın etkinliğini korumak için büyür (Carrasco-Wong ve diğeri, 2020). Plasentanın merkez bölgesinin kalınlığı ve plasenta kotiledonlarının sayısı da normal gebeliklerdeki plasentalara kıyasla GDM'de daha yüksektir. Hiperglisemi, kotiledonlarda arteriyel vasküler dirence yol açan bir faktör olduğundan, plasentanın büyümesi, fetüse uygun besin taşınmasını sağlayan gelişimi sırasında adaptif bir yanıt olabilir (Carrasco-Wong ve diğeri, 2020). Sonuçta fetal büyümeyi etkiler ve yavruları daha sonraki yaşamda metabolik hastalığa yatkın hale getirir (Jiang ve diğeri, 2017).

GDM'de hiperglisemi, endotel hücrelerine zarar verebilir ve bu da hipertansiyon ile ilişkili vasküler fonksiyon bozukluğuna neden olabilir. Bu nedenle GDM'nin gebelikte ve doğum sonrası dönemde hipertansiyon insidansını arttırdığı öne sürülmüştür. Hem diyabet hem de hipertansiyon, dünya çapında gebeliklerin %3 ila %5'ini etkileyen ve yüksek tansiyon ve protein ürüsü ile karakterize edilen bir hastalık olan preeklampsinin gelişimi için risk faktörleridir (Alejandro ve diğeri, 2020). Gebelikte hiperglisemi genellikle doğumdan sonra düzelse de, GDM hastalarında gebelikten sonra da devam eden uzamış insülin direnci ve β -hücre disfonksiyonu da gözlenebilir (Alejandro ve diğeri, 2020). Bu nedenle, önceden teşhis edilmiş GDM'si olan kadınların yaşamlarının ilerleyen dönemlerinde %50 gibi yüksek bir riskle Tip 2 Diyabet (T2D) geliştirme riski daha yüksektir (Alejandro ve diğeri, 2020). Aşırı besin depolama, doğumda yenidoğan boyutunda bir artışa veya makrozomiye neden olur. GDM gebeliklerinin %15 ila %45'i makrozomik bebeklerle sonuçlanır, yağ kütlesinin büyük kısmı fetüsün karın ve omuzlarında yoğunlaşarak omuz distosisi ve doğum travması riskini artırır. Hamilelik sırasında hipertansiyon ve obezite gibi diğer risk faktörleriyle

birleşen GDM'nin varlığı, dünya çapında yaklaşık %10,6'ya ulaşan bir prevalans olan erken doğum ve ölü doğuma da yol açabilir (Alejandro ve diğerleri, 2020).

2.1.4. İnsülinin Fizyolojik Rolü-İnsülin Direnci

İnsülin, karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması, iyon ve amino asit taşınması, hücre bölünme döngüsü, çoğalması ve farklılaşma, nitrik oksit (NO) üretimi üzerinde çeşitli etkileri olan bir hormondur (Mancusi ve diğerleri, 2020). İnsülinin birincil işlevi, hedef dokularda D-glukoz, aminoasitler ve lipidler gibi metabolik substratların metabolizmasını düzenlemektir (Pardo ve diğerleri, 2019; Artunç ve diğerleri, 2016).

Hücreler, plazma hücre zarında eksprese edilen insülin reseptörlerinin aktivasyonunu takiben insüline yanıt verir. Bu da hücre içi hücre sinyallemede hücre metabolizmasının aktivasyonu ile sonuçlanan modifikasyonlara yol açar (Villalobos ve diğerleri, 2019).

Spesifik bir hormon konsantrasyonuna beklenenden daha zayıf bir fizyolojik tepki olarak karakterize edilen insülin direnci, glukoz metabolizması üzerinde yeterli insülin etkisinin olmaması durumudur (Mancusi ve diğerleri, 2020). Hücrelerin insüline etkili bir şekilde yanıt veremedikleri ve dolayısıyla optimalin altında bir glikoz alımıyla sonuçlanan bir patolojidir (Yaribeygi ve diğerleri, 2020). İnsülin direnci, vücudun periferik hücrelerinde (öncelikli olarak kas ve yağ hücrelerinde) ve karaciğerde oluşmaktadır. Yaşlanma, sedanter yaşam ve obezite gibi çevresel faktörlerin yanı sıra genetik faktör kaynaklı da ortaya çıkmaktadır (Guthrie R ve Guthrie D, 2004).

İnsüline dirençli durumlarda insüline karşı hücresel duyarlılık azalır ve insülin sinyal yolunun aktivasyonu için daha yüksek insülin konsantrasyonları gerekmektedir (Artunç ve diğerleri, 2016; Rachdaoui, 2020). Hiperinsülinemi, hiperglisemi, inflamasyon, lipid fazlalığı, mitokondriyal disfonksiyon ve endoplazmik retikulum (ER) stresi insülin direncine katkıda bulunan faktörlerdendir. Protein fosfatazların hiperaktivasyonu, artan adaptör protein ekspresyonu ve insülin sinyal moleküllerinin artan O-N-asetilglukozamin modifikasyonu, insülin direncinin gelişimi ile bağlantılıdır (Artunç ve diğerleri, 2016).

İskelet kası, yağ dokusu ve karaciğer gibi periferik dokulardaki insülin direnci obezite ile karakterize nedenlerdir (Rachdaoui, 2020). Aynı zamanda, DM'nin ve bunun sonuçlarının altında yatan birincil moleküler yollardan biri ve aynı zamanda inflamatuvar yanıtın da bir nedenidir (Yaribeygi ve diğerleri, 2020).

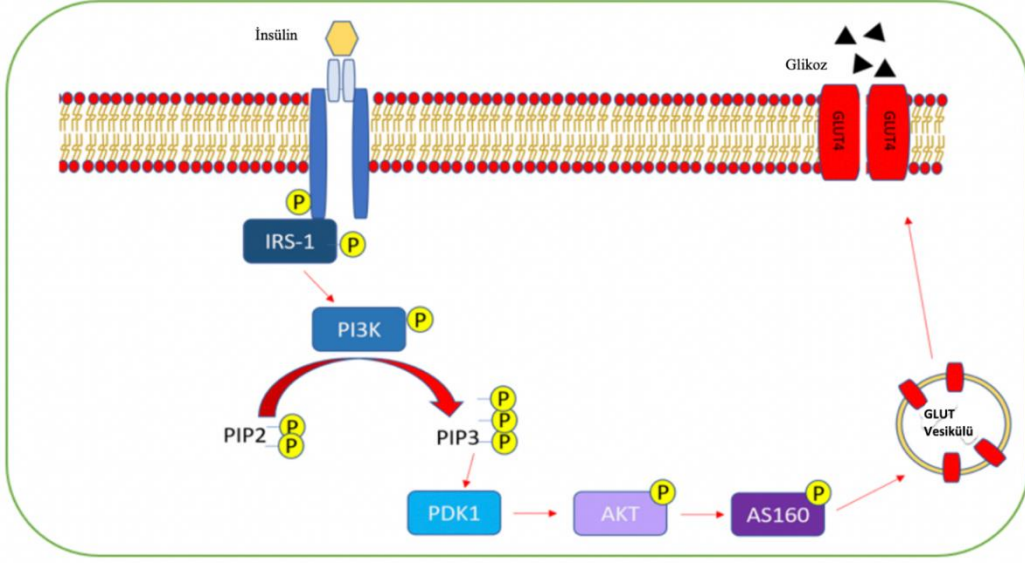
Plasenta, fetal glikoz değişimindeki dengeyi sağlamak için maternal insülin direncini ve hepatik glukoz üretimini arttıran hormonlar salgılar (Baeyens ve diğerleri, 2016). Kortizol, östrojen, progesteron, insan plasental büyüme faktörü (hPG), insan plasental laktojeni (hPL) gibi plasental hormonlar hamilelik sırasında insülin direncinin gelişmesine aracılık eden hormonlardır (Choudhury ve diğerleri, 2021; Samra ve diğerleri, 2022). Plasental hormona bağlı olarak insülin direncinde ilerleyici bir artış vardır (Sweeting ve diğerleri, 2022). Böylece maternal dolaşımdaki glukoz seviyelerini yükselterek glikoz dengesini korur (Baeyens ve diğerleri, 2016).

Bununla birlikte, GDM'li kadınların plasentalarında leptin ve reseptörleri kontrollere kıyasla daha yüksek bir ifade edilir. Bunun sonucunda sinyal moleküllerinin aracılık ettiği protein sentezi daha çok aktive edilir. Daha yüksek plasental protein sentezi, GDM'deki plasenta ve fetal büyümedeki artışı kısmen açıklar (Arroyo-Jousse ve diğerleri, 2020).

2.1.4.1. Protein Kinaz B (PKB/AKT)

Protein Kinaz B (PKB/AKT), glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde yer alır (Lungkaphin ve diğerleri, 2014). Aynı zamanda Akt, fosfatidilinositol 3-kinaz/protein kinaz B (PI3K/Akt) yolağında önemli bir rol oynar. PI3K'nın aktivasyonu, Akt'ı Thr308 ve Ser473 gibi kinaz bölgelerinde p-Akt'a fosforile eder ve daha sonra aşığı akış ile ilgili sinyal yollarını fosforile eder. Böylece hücrenel fonksiyonlar modüle edilir (Li ve diğerleri, 2017).

İnsülin sinyal zinciri, insülinin reseptörüne bağlanmasıyla başlatılır ve insülin reseptörü substrat (IRS) proteinini aktive eder (Lungkaphin ve diğerleri, 2014). Aktive edilmiş IRS'ler, PI3K ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ile ilgili iki önemli hücre içi sinyal yolunun substratlarını fosforile eder (Gołacki ve diğerleri, 2022). PI-3K, glikoz taşıyıcı tip 4'ün (GLUT4) insülinle uyarılan hücre içi translokasyonundaki ana rolü nedeniyle metabolik aktiviteden sorumluyken; MAPK insülinin mitojenik etkisinden sorumludur. Aktive edilmiş PI3K, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3) üretmek için hücre zarının fosfolipidleri üzerinde hareket eder (Gołacki ve diğerleri, 2022). PI3K aktivasyonu PKB/AKT gibi aşığı akış sinyal moleküllerinin aktivasyonunu indükler (Lungkaphin ve diğerleri, 2014). Bu reaksiyonlar sonucunda GLUT4 vesiküllerinin hücre yüzeyine geçmesine aracılık eder. Bu durum GLUT4'un glikoz ve protein gibi daha büyük moleküllu besinlerin hücreye girmesine olanak sağlar.



Şekil 1. PI3K/AKT sinyal yolu (Samra ve diğerleri, 2022'den uyarlanmıştır).

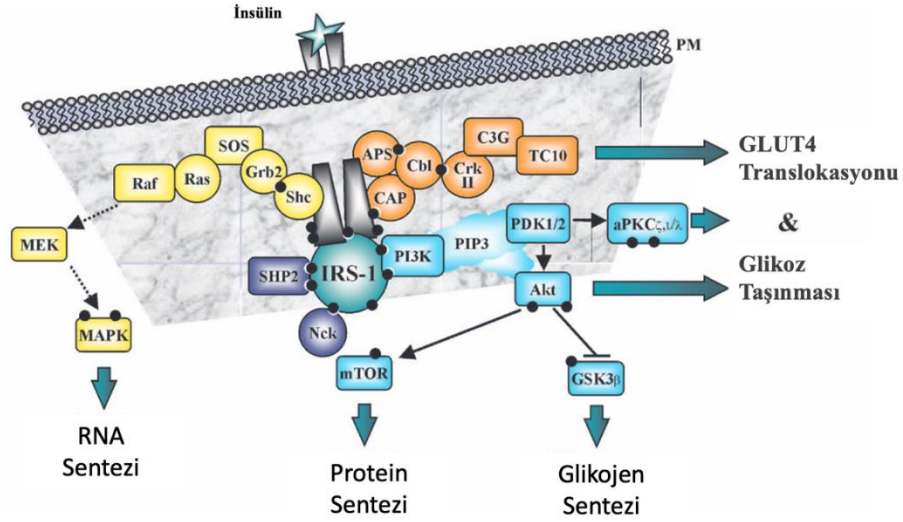
İnsülinle uyarılan glikoz kullanımının yaklaşık %90'ı iskelet kasında meydana gelir ve glikoz metabolizmasının ve enerji homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. İnsülin, PI3K/AKT sinyal yolu aracılığıyla glikoz taşınmasını, glikojen sentezini ve protein sentezini teşvik ederek iskelet kası metabolizmasını düzenler (Huang ve diğerleri, 2018).

PI3K/AKT yolunun aktivasyonu, pankreas β hücrelerinden insülin sekresyonunu destekler. AKT'nin pankreatik β hücrelerinde aşırı ekspresyonu ve konstitütif aktivasyonu, β hücre kütlelerinde, proliferasyonunda ve hücre boyutunda bir artışa neden olur (Huang ve diğerleri, 2018). Böylece PI3K/AKT sinyalini bozarak insülin direncine neden olur ve insülin direnci PI3K/AKT sinyalini daha da şiddetlendirerek bir kısır döngü oluşturur. Son olarak, kısır döngü obeziteye ve DM'ye yol açabilir.

2.1.4.2. İnsülin Reseptör Substratı 1 (IRS1)

İnsülin reseptör substrat (IRS) proteinleri, insülin sinyalleşmesinde merkezi bir rol oynar (Schmitz-Peiffer & Whitehead, 2003). Dört üyesi vardır: IRS1, IRS2, IRS3, IRS4. Memeli hücrelerinde her biri benzer bir yapıyı paylaşır. IRS1 öncelikle iskelet kası ve yağda işlev görür, IRS2 ise karaciğerde baskın role sahiptir. Birçok iskele proteini gibi, IRS1 de ayırık modüler alanlar içerir. Bunların en iyi karakterize edilenleri, IRS1'i aktif İR'ye bağladığı

görülen N-terminalindeki Pleckstrin Homology (PH) ve Fosfotirozin Bağlama (PTB) alanlarıdır. IRS1'in C-terminal bölgesi, doğrudan İR tarafından fosforile edilen bir dizi konsensüs tirozin fosforilasyon motifi içerir (Schmitz-Peiffer & Whitehead, 2003).



Şekil 2. İnsülin sinyal yolları (Schmitz-Peiffer & Whitehead, 2003'den uyarlanmıştır).

İnsülin sinyali, İR otofosforilasyonu ve aktivasyonu ile sonuçlanan, hücre yüzeyinde transmembran tirozin kinaz reseptörüne bağlandığında başlar. Aktive edilmiş İR, proteinlerin IRS ailesi, Shc, APS, CAP ve c-Cbl dahil olmak üzere birçok adaptör/iskele molekülünü fosforile eder. Spesifik motifler içindeki bu proteinlerin tirozil fosforilasyonu, aşağı akış efektörlerini toplamaya hizmet eder. Grb2/SOS kompleksinin tirozin fosforile edilmiş Shc'ye alımı, transkripsiyonu destekleyen MAPK kaskadının aktivasyonuna yol açar. IRS1'in (veya IRS-2) fosforilasyonu, protein fosfataz SHP2, adaptör protein Nck ve lipid kinaz, PI3K gibi efektörlerin toplanmasına yol açar. PI3K'nin aktivasyonu, plazma zarının iç yaprakçığında PIP3 oluşumuna yol açarak, fosfoinositide bağımlı protein kinaz-1/2 (PDK1/2), atipik PKC'ler (aPKC α/β ve aPKC $\gamma/1$) ve Akt dahil olmak üzere serin/treonin (Ser/Thr) kinazların toplanması ve aktivasyonu ile sonuçlanır. Memeli rapamisin hedefi (mTOR) ve Glikojen Sentaz Kinaz-3b (GSK3 β) dahil olmak üzere aşağı akış substratlarının fosforilasyonu, artan protein ve glikojen sentezini teşvik eder. Akt, aPKC ve TC10'un aktivasyonunun tümü, GLUT4'ün hücre içi bir bölmeden hücre içine artan glukoz taşınmasını kolaylaştırdığı plazma zarına maksimum insülinle uyarılmış translokasyonu için gereklidir (Schmitz-Peiffer & Whitehead, 2003).

Kalıcı hiperinsülinemi durumunda, İR ekspresyonu azalır ve İR kinaz aktivitesinin inhibe edilmesine neden olur (Reinehr ve diğerleri, 2018; Rachdaoui, 2020). Aynı zamanda IRS1 ve IRS2'nin tirozin fosforilasyonunun inhibe edilmesi gibi hücre içi sinyalizasyon basamaklarının değiştirilmesi gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla periferik insülin direncine katkıda bulunur (Reinehr ve diğerleri, 2018; Rachdaoui, 2020). GDM'li kadınlar daha büyük oranda serin fosforile edilmiş IRS1 sergiler. IRS1'in serin fosforilasyonu, PI3K bağlanma yeteneğini bozar ve tirozin kinazı inhibe eder (Nguyen-Ngo ve diğerleri, 2019).

2.1.5. İnflamasyon

T2DM ile ilgili yapılan çalışmalarda, T2DM gelişiminden önce inflamasyon belirteçlerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Bu artış inflamasyonun T2DM tanısından önce insülin direnci ile birlikte ortaya çıktığını düşündürmektedir (King, 2008). Son yıllarda, inflamatuvar sistemin diyabet patogenezindeki rolü giderek daha fazla araştırılmaktadır. İnflamatuvar profilde birkaç hücre tipi tarafından eksprese edilen bir grup protein olan sitokinler, immün mediatörleri ve düzenleyiciler olarak işlev görürler (Xiao ve diğerleri, 2014). İnsülin direnci, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve interleukin-6 (IL-6) gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin anormal salgılanması ve interleukin-4 (IL-4) ve interleukin-10 (IL-10) gibi anti-inflamatuvar mediatörlerin üretimini azalması ile ilişkilendirilir (Xiao ve diğerleri, 2014). DM ve insülin direnci etiolojisinin düşük dereceli kronik inflamasyon içerdiğine dair kanıtlar artmaktadır (Yaribeygi ve diğerleri, 2020).

İnflamasyon, endoplazmik retikulum (ER) stresinin metabolik homeostazı olumsuz etkilediği baskın mekanizmadır. Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B), c-Jun N-terminal kinazlar (JNK) ve apoptoz sinyal yollarının aktivasyonunu içerir. Endoplazmik retikulum (ER) stresine yanıt olarak, katlanmamış protein yanıtı (UPR) ile ilgili üç yolak aktive edilir. Bu yollardan ikisi, protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) tarafından yönetilir. Bu aktivasyon, NF- κ B sinyal yolunu uyararak IRS1 fosforilasyonu aracılığıyla insülin aksiyonunun inhibisyonuna neden olur. İnositol gerektiren enzim 1 (IRE1)'in aracılık ettiği yolak ise JNK sinyal yolunun aktivasyonuna neden olur (Zatterale ve diğerleri, 2020).

Dolaşımdaki inflamatuvar sitokinler, çeşitli mekanizmalarla β -hücre fonksiyonunu etkiler. Örneğin, TNF-a, IL-1 β ve interferon-gama (IFN-y) gibi inflamatuvar sitokinler, β -

hücre kalsiyum regülasyonunu ve ardından insülin salınımını bozar. Adacık amiloid polipeptidi, adacık hücrelerinde IL-1 β üretimini artırır. Pro-inflamatuvar sitokin IL-1 β , T2DM'de adacık iltihabının ana düzenleyicisidir. IL-1 β , artan apoptoz yoluyla β -hücre yetmezliğine önemli bir katkıda bulunur. Genel olarak, doğal ve adaptif bağışıklık hücreleri ile insülin direnci ve β -hücre fonksiyonu arasında karmaşık bir etkileşim vardır.

2.1.5.1. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)

Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α), bir metalloproteinaz tarafından parçalanmış bir transmembran proteindir. TNF- α , pro-inflamatuvar bir sitokindir. İnsülin reseptörü substratı 1 (IRS-1), insülinin bir insülin reseptörü ile etkileşimini durduran TNF- α tarafından fosforile edilir (Reinehr ve diğerleri 2018). TNF- α , yağ dokusu monositleri ve makrofajlar tarafından üretilerek insülin direncine yol açmaktadır (Abell ve diğerleri, 2015). TNF- α ayrıca yağ dokusunda hormona duyarlı lipazın aktivitesini de artırarak serbest yağ asidinin dolaşıma salınımını artırmaktadır (Reinehr ve diğerleri, 2018). Viseral yağ dokusu TNF- α üretiminin derecesi, yetişkinlerde hem insülin direnci hem de obezite ile olumlu şekilde artar (Reinehr ve diğerleri, 2018).

1990'larda yapılan TNF- α çalışmaları ilk olarak inflamasyon ve IR arasındaki ilişkiyi ortaya çıkardı. TNF- α , adiposit lipolizini artırarak ve IRS-1'in (insülin reseptörü substratı-1) serin/treonin fosforilasyonunu artırarak insülin direncine neden olan, yağ dokusundan türetilen bir pro-inflamatuvar sitokindir (Chen ve diğerleri, 2015). IKK β /NF- κ B yolu da dahil olmak üzere birkaç sinyal yolu, insülin direnci patogeneğinde yer alır. TNF- α 'nin adenosin monofosfatla aktive olan protein kinaz (AMPK) yolunu aktive ederek hem visseral hem de subkutan adipositlerde glukoz alımını artırabildiği, JNK1/2'yi aktive ederek visseral adipositlerde insülin direncini tetiklediği bildirilmiştir (Chen ve diğerleri, 2015). Bununla birlikte, IR'yi tedavi etmek için TNF sinyalini bloke etmeyi amaçlayan TNF- α süper aile üyesi sTWEAK (çözünür tümör nekroz faktörü benzeri zayıf apoptoz indükleyicisi) gibi terapilerle ilgili çalışmalar, TNF- α 'in insülin direncinde rol oynadığını göstermiştir (Chen ve diğerleri, 2015).

2.1.5.2. İnterlökin-1 Beta (IL-1 β)

IL-1 β geni tarafından pro-inflamatuvar sitokin olan IL-1 β üretilir (Liu ve diğeri, 2020). IL-1 β salgılanması inflamasyon aktivitesi ile düzenlenir (Chen ve diğeri, 2015). Artan IL-1 β protein seviyelerinin inflamatuvar yanıtı artırır, nitrik oksit (NO) oluşturarak pankreas beta hücrelerinde hasara neden olur ve pankreas adacıklarında insülin salınımını bloke eder (Liu ve diğeri, 2020).

IL-1 β , periferik dokularda ve makrofajlarda insülin sinyalini bozarak insülin direncine katkıda bulunur, bu da beta hücrelerinin insülin duyarlılığının azalmasına ve olası insülin sekresyonunun bozulmasına yol açar. Endotel hücreleri ve monositler gibi çeşitli hücrelerde IL-1 β seviyeleri hiperglisemi sırasında artar (Chen ve diğeri, 2015).

IL-1 β , obezitenin neden olduğu inflamasyonun güçlü bir aracısıdır ve T2D'nin patogenezinde yer alır. Hipergliseminin pankreas beta hücreleri üzerinde olumsuz sonuçlara aracılık eder (Zatterale ve diğeri, 2020). IL-1 β ayrıca T2DM inflamasyonunun neden olduğu organ disfonksiyonunun başlatılmasında ve sürdürülmesinde hayati bir rol oynar. IL-1 β , sistemik inflamasyonu artırabilir ve makrofajlar gibi başlıca insülin hedefli hücrelerde insülin etkisini inhibe edebilir (Chen ve diğeri, 2015).

2.1.5.3. İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6, pro-inflamatuvar bir sitokindir (Reinehr ve diğeri, 2018). IL-6, özellikle adipoz doku olmak üzere birçok doku tarafından salgılanır. GLUT4 ve IRS-1 ekspresyonunu azaltarak insülin direncine neden olur. Bu etkiler, Janus kinaz-sinyal dönüştürücüsünün ve transkripsiyon aktivatörünün (JAK-STAT) sinyal yolunun aktivasyonu ve sitokin sinyal 3 baskılayıcısının (SOCS3) ekspresyonunun artmasıyla ortaya çıkar. IL-6 ayrıca PI3K yolunu bloke eder, glikojen sentezini bozar ve insülin direncini indükler. İnsan iskelet kasındaki insülin direncinin, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3)'ü aktive ederek toll benzeri reseptör-4 (TLR-4) gen ekspresyonunu indükleyen IL-6 stimülasyonu ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Chen ve diğeri, 2015).

IL-6, bozulmuş insülin sinyalleşmesine yol açarak hem karaciğer hem de adipoz dokuda insülinle uyarılan tirozin fosforilasyonunun inhibisyonunu teşvik eder. Ancak iskelet

kası üzerindeki IL-6 etkisi için çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (Zatterale ve diğerleri, 2020). IL-6, plazma membranında GLUT4 translokasyonunu artırır. Ayrıca, murin iskelet kası hücrelerinde IL-6'nın, JNK aktivasyonu yoluyla insülin ile uyarılan glikoz alımını azaltabildiğini gösterilmiştir (Zatterale ve diğerleri, 2020).

IL-6'nın maternal plazma seviyeleri, GDM ile pozitif ilişkilidir. Boylamsal çalışmalar, normal bir hamilelik boyunca bu seviyelerin ilerlemesinde heterojenlik olduğunu göstermiştir. Çalışmalar, IL-6 seviyelerinin GDM'nin patofizyolojik durumunun bir yan ürünü olmaktan ziyade, ileriye dönük olarak GDM gelişimini tahmin edip etmediğini henüz belirlememiştir (Rodrigo & Glastras, 2018).

2.1.5.4. Nükleer Faktör Kappa B Yolağı (NF- κ B)

Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B), p65/RelA, RelB, c-Rel, p50/p105 ve p52/p100 gibi Rel ailesi proteinlerinden oluşan bir transkripsiyon faktörüdür (Chen ve diğerleri, 2015). Normal koşullarda I κ B proteinlerine bağlı olarak sitoplazmada tutulur (Samra ve diğerleri, 2022). I κ B, NF- κ B'nin nükleer lokalizasyonunu engeller. Obez bireylerde olduğu gibi çeşitli patojenik uyarımlarla stimülasyondan sonra, iki alt birim (IKK α ve IKK β) içeren IKK kompleksi aktive olur ve bu, I κ B α 'in Ser32 ve 36'da fosforilasyonunu tetikler. NF- κ B'nin nükleer lokalizasyon sekansını açığa çıkarır ve çekirdeğe translokasyonunu ve TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi enflamatuvar aracılara kodlayan hedef genlerin yukarı regülasyonunu tetikler (Chen ve diğerleri, 2015). Adipositlerdeki IKK β eksikliği, serbest yağ asidi-(FFA-) ile indüklenen TNF- α ve IL-6 ekspresyonunu tamamen önlerken, IKK β aktivasyonu, leptin ve adiponektin gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe eder (Chen ve diğerleri, 2015).

Bununla birlikte, rezistin, TNF- α , IL-6 ve IL-1 β gibi pro-inflamatuvar sitokinler, artan lipid birikimi nedeniyle plasenta ve adipositler tarafından üretildiğinde, I κ B- α 'nın inhibe edilmesi indüklenir. Sonuç olarak, NF- κ B aktive edilir. İnflamasyon ve insülin direncini kodlayan genlerin transkripsiyonunda yer aldığı çekirdeğe doğru yer değiştirir (Samra ve diğerleri, 2022).

2.2. Hamilelikte Maternal Metabolik Değişiklikler

Hamilelik, vücudun tüm sistemik uyum mekanizmalarının değiştiği ve yüksek düzeyde strese maruz kaldığı fizyolojik bir durumdur (Pardo ve diğerleri, 2019). Hamileliğin ilk dönemlerinde, pankreas β -hücrelerinde hem hipertrofi hem de hiperplazi meydana gelmekte ve bu hücreler diyetle alınan glikoz alımını dengelemek için insülin seviyelerini yaklaşık olarak % 60 oranında yükseltir (Lizárraga ve diğerleri, 2021; Lorenzo ve diğerleri, 2019). Bunun sonucunda maternal dokular insüline karşı giderek duyarsız hale gelir (Kampmann ve diğerleri, 2019). Hamilelik sırasında meydana gelen insülin direnci, maternal glikoz kullanımını sınırlayan ve böylece gelişmekte olan fetüsün yeterli miktarda besin ihtiyacını glikoz olarak almasını sağlayan evrimsel bir süreçtir (Kampmann ve diğerleri, 2019; Pardo ve diğerleri, 2019). Fetal ve plasental gelişime yardımcı olmak için bu süreç hamilelik boyunca değişir (Lizárraga ve diğerleri, 2021). Gebelik sırasında gelişen maternal insülin direncinin derecesi, anneden fetüse glikoz geçişinin derecesi ile ilişkilidir (Kampmann ve diğerleri, 2019). Hamile olmayan kadınlara kıyasla karaciğer, kas ve yağ hücrelerinde insülin duyarlılığı ikinci trimesterin sonunda azalmaya başlar ve üçüncü trimesterde % 45-70'e düşer (Lizárraga ve diğerleri, 2021).

Hamileliğin ilerleyen dönemlerinde ise maternal yağ depoları azalırken, serbest yağ asidi seviyeleri yükselir (Vejrazkova ve diğerleri, 2014) ve glikoz metabolizması hamilelik öncesi seviyelere göre %40-60 oranında bozulur (McElwain ve diğerleri, 2021).

Fetüsün büyümesi ve gelişmesi, anneden fetüse plasenta boyunca besin akışıyla gerçekleşir. Fetüse glikoz iletimi, fetal ve maternal dolaşım arasındaki konsantrasyon gradyanına bağlıdır (Baeyens ve diğerleri, 2016). Büyüyen fetüs, maternal glikozun artan bir fraksiyonunu plasentaya yönlendirir ve böylece maternal dolaşımdaki glikozu düşürür. Plasenta, fetal glikoz değişimindeki dengeyi sağlamak için maternal insülin direncini ve hepatik glukoz üretimini arttıran hormonlar salgılar. Böylece maternal dolaşımdaki glukoz seviyelerini yükselterek glikoz dengesini korur (Baeyens ve diğerleri, 2016).

Annedeki insülin direnci, annenin enerji için karbonhidratlar yerine lipitleri kullanmasına ve ayrıca karbonhidratları fetüs tarafından kullanımına neden olur. Fetüs, hamilelik süresi boyunca enerji gereksinimini bu özellik sayesinde sağlar (Lizárraga ve diğerleri, 2021). Bu adaptif süreçler insülin talebindeki artışı telafi edemediğinde, maternal

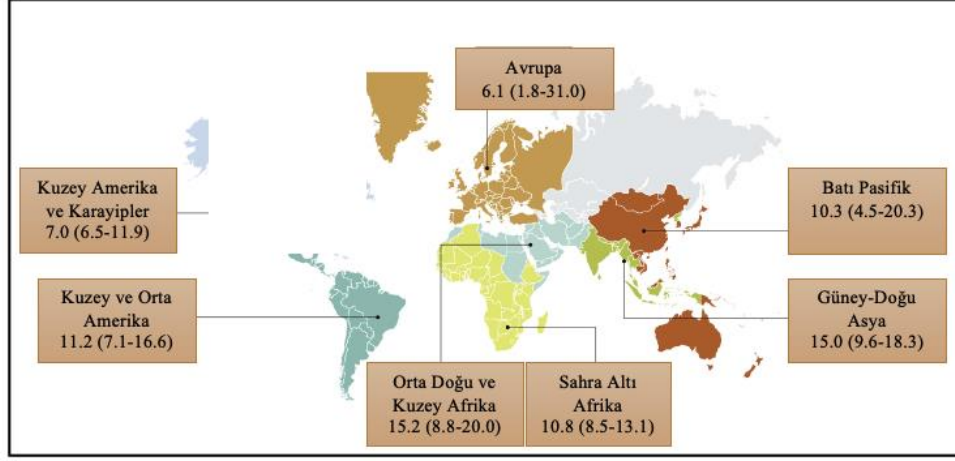
kan glukoz seviyeleri yükselir ve bu da GDM gelişimine neden olur (Lorenzo ve diğerleri, 2019)

2.2.1.Hamilelikte Diyabet : Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

GDM, gebelik sırasında ortaya çıkan glikoz intoleransı olarak tanımlanmaktadır (Choudhury ve diğerleri, 2021). Hamile bir kadında GDM'nin ilk örneği 1824'te Alman araştırmacılar tarafından belgelenmiştir. Hamileliğin 20-24. haftalarındaki diyabet semptomlarının en erken tanımı ise Lambie tarafından 1926'da bildirilmiştir. 1957 ve John O'Sullivan'ın tarafından 1961 ve 1964 tarihli makalelerinde daha fazla vurgulanarak dikkat çekmiştir (Choudhury ve diğerleri, 2021).

GDM, gestasyonun ikinci yarısında görülen insülin sekresyonundan sorumlu pankreas beta hücre disfonksiyonu sonucu ilerleyici insülin direnciyle karakterize edilen klinik bir durumdur (Succurro ve diğerleri, 2021). Metabolik ve üreme komplikasyonları nedeniyle önemli bir küresel sağlık sorunudur (Choudhury ve diğerleri, 2021).

GDM, birçok genetik varyasyonun diyet ve çevresel değişkenlerle etkileşimi ile ortaya çıkan poligenik bir hastalıktır (Lorenzo ve diğerleri, 2019). GDM'yi etkileyen çeşitli faktörler vardır. Obezite, ailede diyabet öyküsü bulunması, 25 yaşın üzerinde olmak, önceki hamilelik süresinin uzun olması, polikistik over sendromu (PKOS) gibi nedenler GDM için risk faktörleridir. Ayrıca Afrika-Amerikalı, Asya-Amerikalı, Amerikan Kızılderili, Hispanik veya Latino bölgeleri ve Pasifik Adaları gibi bölgelerde daha yaygın görülmektedir (Choudhury ve diğerleri, 2021). Alta yatan etioloji ve mekanizmalarının tam olarak tespit edilememesinden dolayı kesin tanı geliştirmek oldukça zor olmaktadır (Lorenzo ve diğerleri, 2019).



Şekil 3. 2005–2018'de küresel GDM prevalansı (McIntyre ve diğerleri, 2019'de uyarlanmıştır)

Amerikan Diyabet Derneği tarafından 2021 yılında GDM, aşağıda gösterildiği gibi bir adım ve iki adım stratejisi ile teşhis edilmektedir:

Tek adımlı strateji;

24-28 haftalık gebelikte henüz diyabet teşhisi konmamış bir kadından alınan plazma glikozu ile 75 g OGTT (oral glikoz tolerans testi) açken ve 1 ve 2 saatte ölçülür. En az 8 saatlik gece açlığının ardından sabah OGTT testi uygulanmaktadır. Plazma glikoz sonuçlarından herhangi biri,

- Aç kalma durumu : 92 mg/dL (5,1 mmol/L)
- Bir saat : 180 mg/dL (10.0 mmol/L)
- İki saat : 153 mg/dL (8,5 mmol/L)

yukarıdaki kriterlere eşit veya daha yüksek olduğunda, GDM teşhisi konulmaktadır.

İki adımlı strateji;

Adım 1'de henüz diyabet tanısı almamış kadınlarda hamileliğin 24-28. haftalarında tokluk durumunda 50 g glikoz yükleme testi (GLT) yapılmaktadır. Plazma glikozu 1 saatte ölçülmektedir. Yüklemeden 1 saat sonra belirlenen plazma glikoz seviyesi 130, 135 veya 140 mg/dL'den (sırasıyla 7,2, 7,5 veya 7,8 mmol/L) yüksek ise 100 g OGTT'ye geçilmektedir.

Adım 2’de ise hastanın açlık durumunda 100 g OGTT testi uygulanmaktadır. Aşağıdaki dört plazma glukoz değerinden en az ikisi, açlıkta ve OGTT sırasında 1, 2 ve 3 saatte ölçülmektedir. Glikoz sonuçları:

- Aç kalma durumu : 95 mg/dL (5.3 mmol/L)
- Bir saat: 180 mg/dL (10.0 mmol/L)
- İki saat: 155 mg/dL (8,6 mmol/L)
- Üç saat : 140 mg/dL (7,8 mmol/L)

yukarıdaki kriterlere eşit veya bundan daha büyük olduğunda, GDM teşhisi konulmaktadır (ADA, 2021).

Dünya çapında GDM prevalansı %5 ile %25.5 arasında değişmektedir ve ırk, etnik köken, yaş, vücut kompozisyonu ile tarama ve tanı kriterlerine bağlıdır (Choudhury ve diğerleri, 2021). Bu sadece geçici bir durum değil, aynı zamanda tip 2 diyabetes mellitus, hipertansiyon ve aterosklerotik hastalık için de yüksek risk faktörüdür (Zhang ve diğerleri, 2021).

Diyabete benzer şekilde, GDM gelişimi, b-hücre disfonksiyonu, insülin direnci, yağ dokusu disfonksiyonu, glukoneogenez, bağırsak mikrobiyotası disbiyozu ve oksidatif stres dahil olmak üzere birçok mekanizmayla ilişkilidir. Bu karmaşıklık nedeniyle, hastalığın patogenezinin ilişkin bilgileri sınırlı kalmaktadır (Lu & Hu, 2022).

GDM’li kadınların, hamilelik sırasında normoglisemili kadınlara göre tip 2 diyabet (T2DM) geliştirme riski yedi kat ve kardiyovasküler hastalık (KVH) geliştirme riski iki kat daha fazladır (Succurro ve diğerleri, 2021). Dünya çapındaki gebeliklerin yaklaşık yüzde 9 ila 25’i GDM’den etkilenmektedir. Oranlar, araştırma demografisine ve teşhis kriterlerine göre değişmektedir (Alejandro ve diğerleri, 2020).

Obezite, aşırı besin ve enerjiye maruz kalmaktan kaynaklanan kronik düşük dereceli bir inflamasyon durumudur (Rodrigo & Glastras, 2018). Bu pro-inflamatuvar ortam, değişen çeşitli adipokin, kemokin ve sitokin seviyeleri ile kendini gösterdiği gibi, yağ dokusu, karaciğer ve pankreas içindeki metabolik hücrelerel süreçleri de değiştirmektedir (Rodrigo & Glastras, 2018). Obezitedeki pro-inflamatuvar sitokinlerin ayrıca hamilelikle ilişkili insülin duyarlılığını da azalttığı bilinmektedir (Lizárraga ve diğerleri, 2021). Yetişkinlerde görülen diyabet için bir risk faktörü olan obezite, GDM prevalansındaki artışla da ilişkilendirilmiştir (Gaither ve diğerleri, 1999).

Hamileliğin ilk üç ayında insülin üretimi, artan pankreas beta-hücre hacmi ve yüksek hormon duyarlılığının bir sonucu olarak kademeli olarak artmaktadır (Valencia-Ortega ve diğerleri, 2021). GDM'de maternal yağ ve iskelet kası dokularındaki hatalı insülin sinyal yolları nedeniyle insülin direnci artmaktadır (Samra ve diğerleri, 2022). İnsülin direnci ve hepatik glukoz üretimi düzeyi için beta hücre kompanzasyonu yetersiz olduğunda GDM gelişmektedir (Abell ve diğerleri, 2015).

GDM'nin patofizyolojisi halen çalışılıyor olmasına rağmen, hiperglisemiye yol açan iki anahtar yolla ayırt edilir: pankreas hücre yetmezliği ve kötüleşen insülin direnci. Gebeliğin son döneminde insülin direnci en yüksek düzeyde olduğunda, GDM gelişen kadınlarda buna uyum sağlayan hücrelerin yanıtında bir eksiklik vardır (Valencia-Ortega ve diğerleri, 2021).

İnflamatuvar belirteçler, çoğunlukla, GDM'li kadınlarda gebelik sırasında GDM'li olmayan kadınlara kıyasla yükselir (Ryan, 2018). GDM ile komplike olan gebeliklerde, dolaşımdaki artan inflamatuvar moleküllerin bir sonucu olarak metabolik ve inflamatuvar yollarda düzensizlik vardır (Siddiqui ve diğerleri, 2019). GDM'de, dolaşımdaki pro-inflamatuvar sitokinlerde (IL-1, IL-6, TNF- α ve leptin) artış ve anti-inflamatuvar moleküllerde (IL-4, IL-10 ve adiponektin) azalma gerçekleşmektedir ((Ryan, 2018; Lorenzo ve diğerleri, 2019; Samra ve diğerleri, 2022). Leptinin kendisi, düşük dereceli bir inflamatuvar duruma yol açan TNF- α üretimini artırmaktadır (Siddiqui ve diğerleri, 2019).

TNF- α 'nın ayrıca normal glukoz toleransı olan hamile kadınlarda ve gestasyonel diyabetli kadınlarda insülin duyarlılığı ile ters orantılı olduğu bulunmuştur (Kampmann ve diğerleri, 2019). TNF- α 'nın, insülin reseptörü substratı- (IRS-) 1'in serin fosforilasyonunu artırarak ve insülin reseptörü (IR) tirozin kinaz aktivitesini azaltarak insülin sinyalleşmesinin bozulması yoluyla insülin direncine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Böylece, insülin direncini indüklemek veya alevlendirmek için plasenta ve iskelet kasında TNF- α üretilebilmektedir. Bununla birlikte, daha sonraki çalışmasında sağlıklı hamile kadınlarda TNF- α ile insülin direnci arasındaki bir ilişki doğrulanamadı. Ancak Catalano, TNF- α 'nın gebelikte insülin direncinin gelişiminde önemli bir rol oynadığını desteklemektedir (Kampmann ve diğerleri, 2019).

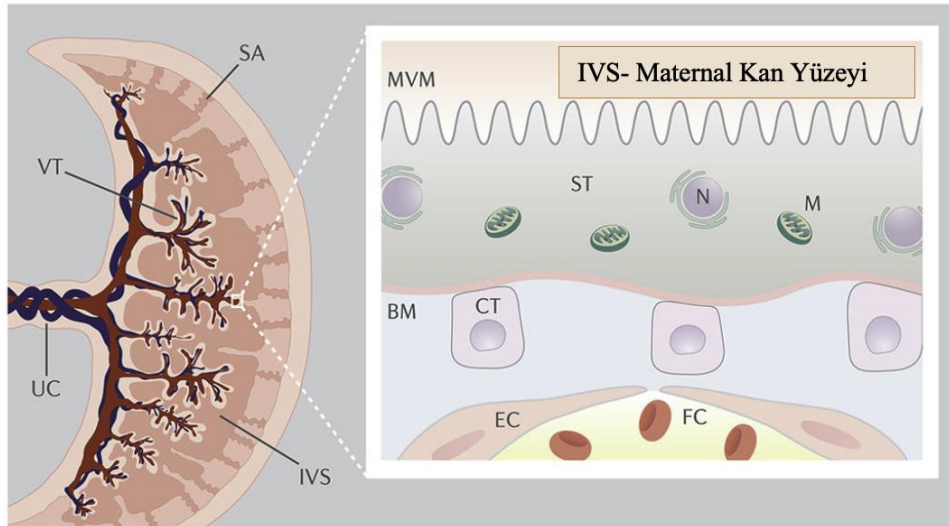
İnsülin direncinin GDM'nin ana nedenlerinden biri olduğu bildirildiğinden; anormal sitokin düzeylerinin GDM ile ilişkili olabileceği varsayılabilmektedir (Siddiqui ve diğerleri, 2019).

2.3. Plasenta

Maternal doku ve fetüs arasında yer alan plasenta, intrauterin yaşamı sürdüren geçici bir organdır (Carrasco-Wong ve diğerleri, 2019). Bu organ endokrin, immünolojik ve beslenme görevlerini yerine getirerek fetal büyümeyi destekler (Carrasco-Wong ve diğerleri, 2020). Plasenta, maternal ve fetal alanlar arasındaki bölgeyi kapsamaktadır ve fizyolojik bir bariyer olarak görev yapar (Sharma ve diğerleri, 2022).

2.3.1. Plasentanın Fizyolojik Yapısı

Trofoblasta farklılaşan fetal trofektoderm ve villöz çekirdekte fibroblastlara, endotelial hücrelere ve makrofajlara yol açan ekstraembriyonik mezoderm, insan plasentasının öncüleridir. Fetal kan damarlarını içeren ve sinsityotrofoblast tarafından kaplanan ve dolayısıyla spiral arterlerden intervillöz alana giren anne kanına doğrudan maruz kalan trofoblast villöz ağacı, insan plasentasının fonksiyonel birimidir. İnsan plasentasında üç çeşit trofoblast hücresi bulunur: sitotrofoblastlar, ekstravillöz trofoblastlar ve sinsityotrofoblastlar (Kelly ve diğerleri, 2020).



Şekil 4. İnsan plasentasının bariyeri (Kelly ve diğerleri, 2020'den uyarlanmıştır).

Plasentanın, fetal gelişimi desteklemek için beslenme, endokrin ve immünolojik işlevleri vardır. Döllenme ve zigot oluşumundan sonra embriyo, blastomer oluşumunu içeren seri hücresel bölünmeler aşamasına girer. Sonraki hücre bölünmelerini takiben, iki hücre tipinden oluşan blastosist oluşur; iç zonda bulunan iç hücre kütleli blastosist ve embriyonun gelişeceği ve trofoblast hücreleri en dış katmanda konumlandırılmıştır. Embriyo implantasyonu sırasında, trofoblast hücreleri desidualize stromaya girer ve çoğalır. Trofoblast, iki hücre tabakasından oluşur, iç tabakayı oluşturan sitotrofoblast (CTB) ve anne kanıyla doğrudan temas halinde olan çok çekirdekli hücrelerin bir tabakası olan sinsiyo trofoblast (STB). Trofoblastın altında yatan ekstra embriyonik mezoderm, fetal makrofajlar (Hofbauer hücreleri) ve endotelial hücreler tarafından oluşturulan kılcal damarlardır. Bu tabakalar, besinlerin maternalden fetal dolaşıma transferini düzenleyen birkaç villözde organize edilen maternal-fetal bariyeri oluşturur (Carrasco-Wong ve diğerleri, 2019).

2.3.2. Gestasyonel Diabetes Mellitusta Plasenta

Plasenta hamilelikte insülin direncinin gelişmesinde çok önemli bir rol oynar. Plasenta, maternal ve fetal ortamlar arasındaki plasental yapı ve işlevdeki değişiklikler fetal büyüme ve gelişmeyi etkiler. Anne ve fetus arasındaki glikoz değişimi, fetal büyüme ve gelişimi için çok önemlidir (Kampmann ve diğerleri, 2019).

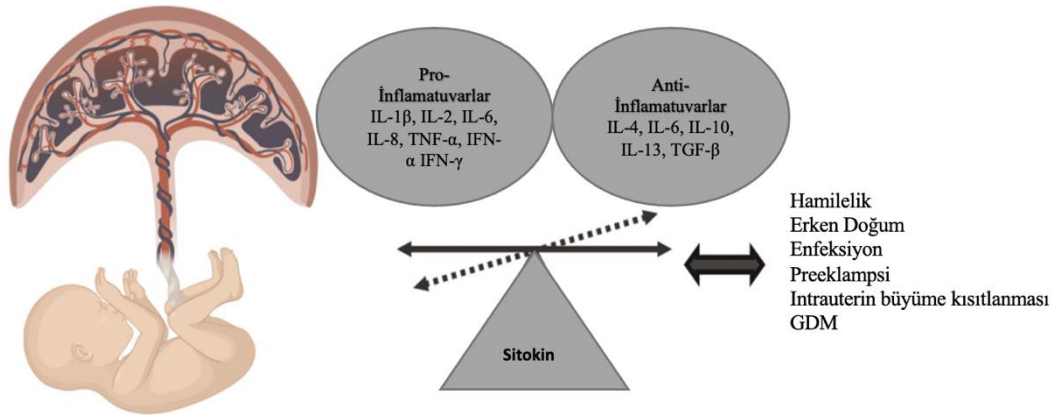
GDM'nin bir sonucu olarak plasenta çeşitli şekillerde değişebilir. Morfolojik olarak, plasentada çeşitli anormallikler gözlenir. GDM plasentaları:

- (1) daha yüksek plasenta ağırlıkları,
- (2) villöz fibrinoid nekroz gibi dejeneratif lezyonların varlığı,
- (3) korangiosis gibi vasküler lezyonlar,
- (4) villöz immatürite ve
- (5) nükleus varlığına göre kronik fetal hipoksi gösterir (Lizárraga ve diğerleri, 2021).

Normal gebeliklerle karşılaştırıldığında, GDM gebeliklerin doğum ağırlıkları ve plasenta ağırlıkları daha fazladır. Normal gebeliklerdeki plasentalara kıyasla, GDM'li plasentalar da merkezde daha kalındır ve daha fazla kotiledon içerir. Plasentanın büyümesi,

fetüse uygun bir besin taşınmasını sağlamak için gelişimi sırasında adaptif bir yanıt olabilir, çünkü hiperglisemi kotiledonlarda arteriyel vasküler dirence neden olan bir faktördür. Plasentanın merkez bölgesinin kalınlığı ve plasenta kotiledonlarının sayısı da normal gebeliklerdeki plasentalarla karşılaştırıldığında GDM'de daha yüksektir (Carrasco-Wong ve diğerleri, 2019).

Plasenta, GMD'nin eşlik ettiği inflamasyona katkıda bulunur. Yağ dokularının plasenta ile etkileşerek inflamasyona ve insülin direncine neden olabileceği öne sürülmüştür (Samra ve diğerleri, 2022). Her iki doku tipi de yüksek düzeyde IL-6, IL-8, TNF- α , resistin ve leptin sergiler. Kanıtlar, IL-6 ve TNF- α 'nın, leptinin kendisi IL-6 ve TNF- α düzeylerini yükselttiği için inflamasyonu güçlendiren leptini yukarı doğru düzenlediğini göstermiştir (Samra ve diğerleri, 2022). Sonuçta plasentadaki pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokin dengesi GDM 'de bozulur. (Munro ve diğerleri, 2021)



Şekil 5. Gebelik komplikasyonlarındaki pro- ve anti-inflamatuvar sitokin dengesizliği (Munro ve diğerleri, 2021'den uyarlanmıştır).

2.4. Hamilelik İmmünolojisi

Plasenta, anne ve fetus arasında arayüz görevi görür. Hamile kadınlarda zaten var olan immün-metabolik ağın karmaşıklığını artıran TNF- α , leptin ve resistin dahil olmak üzere çeşitli sitokinler salgılar (Siddiqui ve diğerleri, 2019). Sağlıklı bir hamilelikte, plasenta üçüncü trimesterde TNF- α üretir, ancak düzensiz dağılımı nedeniyle büyük kısmı annenin kan dolaşımına salınır. Termde, az miktarda IL-1a ve TNF- α plasentadan geçer. Ancak IL-6'nın

daha kolay geçtiği görülür (Ingvorsen ve diğerleri, 2015). Kortizol ve TNF- α gebeliğin sonlarında yükselir ve insülin duyarlılığı düşer (Lizárraga ve diğerleri, 2021).

Sağlıklı bir hamilelikte, hamile olmayan sağlıklı kadınlara kıyasla kontrollü hafif sistemik inflamasyon vardır (Munro ve diğerleri, 2021). Bu süre boyunca, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hücreleri, TNF- α , IL-6 ve IL-1 β gibi yüksek pro-inflamatuvar sitokin seviyeleri ile aktifleştirilmiş fenotipler sergiler. Hamilelik boyunca uygun bir pro- ve anti-inflamatuvar sitokin dengesinin sürdürülmesi gereklidir (Munro ve diğerleri, 2021).

Hamilelik sırasında plasenta, insülin duyarlılığının azalmasına katkıda bulunur. Pro-inflamatuvar sitokinler ve plasental büyüme hormonu (PGH) bu sürece katkı sağlamaktadır. Pro-inflamatuvar sitokinlerin ayrıca gebelikle ilişkili insülin duyarlılığını düşürdüğü bilinmektedir (Lizárraga ve diğerleri, 2021).

2.4.1. Gestasyonel Diabetes Mellitus'ta İnflamasyon

Hamilelik boyunca uygun bir pro- ve anti-inflamatuvar sitokin dengesinin sürdürülmesi gereklidir (Munro ve diğerleri, 2021). Sitokinler GDM'de kronik inflamatuvar süreç riskini arttırdığı varsayılan inflamatuvar araçlardır (Liu ve diğerleri, 2020). Son kanıtlar, GDM'nin yalnızca artan insülin direnci ve glukoz intoleransı sorunu değil, aynı zamanda düşük dereceli sistemik ve plasental inflamasyon durumu olduğunu düşündürmektedir (Sharma ve diğerleri, 2022). Salgılanan inflamatuvar sitokinlerin neden olduğu inflamasyon, GDM'de artan insülin direnciyle bağlantılı olduğuna inanılmaktadır (Sharma ve diğerleri, 2022).

IL-1 β , Nod benzeri reseptör proteini 3 (NLRP3) tarafından üretilen GDM sırasında maternal IR'nin başlatılmasında önemli inflamatuvar sitokindir. Sonuç olarak, NLRP3 inflamatuvarının aktivasyonu, yüksek IL-1 β üretimine aracılık etmekte ve böylece maternal insülin direncini başlatmaktadır. Böylece anormal glukoz metabolizmasına neden olmaktadır (Wu ve diğerleri, 2021).

TNF- α , doğrudan GDM'ye neden olabilen beta hücre ve insülin sinyalleşmesini bozar. Ayrıca, GDM'de hipergliseminin neden olduğu oksidatif stres ve inflamatuvar değişiklikler, daha yüksek TNF- α ve IL-6 seviyeleriyle ilişkilidir (Abell ve diğerleri, 2015). TNF- α 'nın ayrıca normal glukoz toleransı olan hamile kadınlarda ve gestasyonel diyabetli kadınlarda

insülin duyarlılığı ile ters orantılı olduğu bulunmuştur. TNF- α 'nın, IRS-1'in serin fosforilasyonunu artırarak ve IR tirozin kinaz aktivitesini azaltarak insülin sinyallemesinin bozulması yoluyla insülin direncine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Kampmann ve diğerleri, 2019). Böylece, insülin direncini indüklemek için plasenta ve iskelet kasında TNF- α üretilebilir. Sonraki çalışmalarda, sağlıklı hamile kadınlarda TNF- α ile insülin direnci arasındaki bir ilişki doğrulanamadı, oysa Catalano, TNF- α 'nın gestasyonel diyabetli kadınlarda insülin direncinin gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Kampmann ve diğerleri, 2019).

2.5. Hamilelik Hormonları ve GDM

Hamilelik döneminde hücre çoğalması, strese tepki, hücreler arası iletişim gibi hücresel fizyolojik süreçleri, β -hücre adaptasyonunun regülasyonu ve ayrıca lipit metabolizması ve elektron taşınması gibi metabolik süreçler hormonlar aracılığıyla düzenlenir. Bu adaptif yanıtların çoğu, laktojenler, büyüme hormonu, östrojen, progesteron gibi hamilelik hormonları ve hepatik büyüme faktörleri ve serotonin gibi hormonlar tarafından düzenlenir (Pretorius & Huang, 2022).

Hamileliğe özgü hormonlar , insan koryonik gonadotropin (hCG), insan plasental laktojeni (hPL) ve insan plasental büyüme hormonudur (hPGH). Prolaktin, östradiol ve kortizol gibi hormonlar hamilelik sırasında anne dolaşımında artmaktadır (Kampmann ve diğerleri, 2019). Hamilelik döneminde anne vücudunun yanı sıra plasentadan da hormon salımını gerçekleştirir.

2.5.1. Maternal Hormonlar

Hamilelik sırasında insülin duyarlılığındaki değişiklikler ile kortizol, leptin, insan koryonik gonadotropin (HCG), prolaktin, östrojen, progesteron ve hPL'nin plazma seviyeleri arasında bağlantılar gözlenmiştir (Kampmann ve diğerleri, 2019). İnsülin direncine, ağırlıklı olarak büyüme hormonu, kortikotropin salgılatıcı hormon, insan plasenta laktojeni, prolaktin, östrojen ve progesteron gibi hormonlar neden olmaktadır (Sweeting ve diğerleri, 2022).

Ayrıca, hamile olmayan bireylere HPL, progesteron veya glukokortikoidlerin uygulanması, insülin etkisinin körelmesi ile tutarlı olan metabolik değişiklikleri (hiperinsülinemi, hipoglisemi olmadan) indüklemektedir. Leptin, kortizol, HPL, insan koryonik gonadotropin, östradiol, progesteron ve pro-laktin gebelik öncesinden geç gestasyona kadar insülin duyarlılığında önemli bir değişime neden olmaktadır (Lain & Catalano, 2007).

Leptin, annede tokluk ve enerji homeostazını modüle eden bir hormondur. Aynı zamanda fetüsün canlılığını sürdürmeye çalışan çevreye yanıt veren plasenta tarafından üretilmektedir (Pérez-Pérez ve diğerleri, 2020). Plasental leptinin anne üzerindeki etkileri, anne yağının mobilizasyonu gibi enerji dengesinde endokrin aracılı değişikliklere katkıda bulunabilir, bu da gebelik ve GDM başlangıcı ile ilişkili insülin direncini daha da kötüleştirebilmektedir (Pérez-Pérez ve diğerleri, 2020). Gebe olmayan durumda, leptin periferik insülin duyarlılığını artırır, β -hücre fonksiyonunu iyileştirir ve tokluk sinyali olarak besin alımını baskılar (Stern ve diğerleri, 2021). Bununla birlikte, hamilelik, leptinin etkisini baskılayan ve hatta insülin direncini ve glukoz toleransının bozulmasına neden olabilen leptin duyarsızlığı ile ilişkilidir. Plazma leptin konsantrasyonları hamilelik sırasında hamile olmayan duruma göre iki kat daha yüksektir ve 28. gebelik haftasında en yüksek değerlere ulaşır (Stern ve diğerleri, 2021).

2.5.2. Plasental Hormonlar

Plasenta geçici ve oldukça güçlü bir endokrin organdır. Hamilelik döneminde gelişiminde bir dizi fizyolojik değişiklik meydana gelir. Bunlar, insan plasental büyüme hormonu (hPGH), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), insan-plasental laktojen (HPL), büyüme hormonu salan hormon (GHRH), adrenokortikotropin (ACTH), estradiol ve progesterondur (P4) (Kampmann ve diğerleri, 2019-Świątkowska-Stodulska ve diğerleri, 2022). Hamilelikte çok sayıda plasental ve plasental olmayan hormonlar arasında karmaşık bir etkileşim olur. Bunlardan en önemlisi östrojenler ve P4'dur. P4, sağlıklı bir hamileliği sürdürmek için en önemli kabul edilebilir (Świątkowska-Stodulska ve diğerleri, 2022).

Hamilelik sırasında annenin dolaşımına girerek daha yüksek konsantrasyonlarda bulunan hormonlar arasında prolaktin, östrojen ve kortizol bulunur (Kampmann ve diğerleri, 2019). Bu hormonların insülin etkisi üzerindeki etkisini destekleyen kanıtlar, hamilelik

sırasında insülin direnci ile fetal-plasental birimin eşzamanlı büyümesi artan plasental hormon konsantrasyonları arasındaki bir paralellik olduğunu öne sürmektedir (Lain & Catalano, 2007). Kortizol, östrojen, progesteron, insan plasental büyüme faktörü (hPG), insan plasental laktojeni (hPL) gibi plasental hormonların hamilelik sırasında insülin direncinin gelişmesine aracılık ettiği düşünülmektedir (Choudhury ve diğerleri, 2021; Samra ve diğerleri, 2022).

Önemli kanıtlar, maternal yağ dokusundan ziyade plasentanın, maternal leptin düzeylerinin yükselmesine önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermektedir. Hücresel düzeyde, plasental leptin sinsityotrofoblastlarda ve fetal vasküler endotelial hücrelerde eksprese edilir. İnsan plasentaları ile ilgili *in vitro* çalışmalara göre, toplam plasental leptinin yaklaşık %95'i anne dolaşımına salınır. Bu bakımdan plasenta, maternal leptin duyarsızlığında önemli role sahiptir. Plasenta veya anne kaynaklı leptin, plasental leptin reseptörlerini bağlayarak hCG üretimini de indükleyebilir (Stern ve diğerleri, 2021).

Plasental hormonlara bağlı olarak insülin direncinde ilerleyici bir artış vardır (Sweeting ve diğerleri, 2022). Dolayısıyla hamilelikle ilgili insülin direnci yalnızca tek bir hormonun etkisinde olan bir durum değildir (Kampmann ve diğerleri, 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi.

Cihaz Adı	Model
Hassas terazi	Shimadzu, Japonya
Su Banyosu	Memmert, Almanya
İnkübatör	Nuaire, USA
Isı bloğu	Allsheng, Çin
Vorteks	Velp Scientifica, İtalya
-80°C Buzdolabı	Nuaire, USA
-20°C Buzdolabı	Samsung, Türkiye
pH Metre	Mettler toledo, USA
Sıvı nitrojen tankı (-196°C)	-
Distile su cihazı	Nüve, Türkiye
Buz makinası	Uğur buzaL60, Türkiye
Santrifüj	Nüve, Türkiye
Soğutmalı santrifüj	Nüve, Türkiye
Otoklav	Hirayama, Japonya
NanoDrop	Nabi, Kore
Orbital çalkalayıcı	IKA KS 130,
Plate okuyucu	Epoch, USA
UV	G:Box Syngene, UK
Dikey jel elektroforezi	BioRad, USA
Homojenizatör makinesi	Tehtnica Millmix 20, Slovenya
q-PCR	Bio-Rad CFX Maestro, USA
Pipet (10, 100, 200, 1000'lük)	Eppendorf, USA

3.1.2. Biyolojik Materyal

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından gestasyonel diabetes mellitus (GDM) tanılı, hamilelik öncesi diyabet tanılı (Pre-DM) hastalar ve normal glikoz toleransına sahip kadınlar belirlendi. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen sezaryen doğum sonrası plasenta dokuları temin edildi. Kadınlar çalışmaya, Aydın Adnan Menderes

Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'nun 17.03.2021 tarihli, 2021/57 Protokol no'lu ve 4 Karar no'lu izniyle dahil edildi.

3.1.3. Kimyasal Maddeler, Kitler, Enzimler, Reaktifler ve Laboratuvar Gereçleri

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin, primerlerin, kitlerin, enzimlerin, reaktiflerin ve laboratuvar gereçlerinin listesi.

Adı	Marka
DNA markörü	GeneDirex, Mısır
Dulbecco's PBS (1x)	Sigma, USA
Falcon (15 mL, 50 mL)	Isolab, Türkiye
Şırınga	BD-Luer-Lok™ Tip, Kanada
Vial	Tarsons, Mısır
Etanol	Merck, Almanya
RNase içermeyen su	GeneAll Biotechnology, Kore
RIPA lizis tamponu	A.B.T. Laboratory Industry
RNA izolasyon kiti	GeneAll Biotechnology, Kore
Doku lizis tamponu (ProtinEx)	GeneAll Biotechnology, Kore
BCA protein analiz kiti	Thermo Scientific, USA
Proteaz/fosfataz inhibitörü	A.B.T. Laboratory Industry, Türkiye
Homojenizatör	Tehtnica Millmix 20, Slovenya
Real-Time PCR	Bio-Rad CFX Maestro, USA
Pipet (2.5,10,100,1000'lik)	Eppendorf, Almanya
Pipet ucu (10,100,1000'lik)	Aegene, Türkiye
Cam boncuk	Sigma Aldrich, USA
DNA yükleme boyası	GeneAll Biotechnology, Kore
qPCR SYBR-Green MasterMix	A.B.T. Laboratory Industry, Türkiye
cDNA sentez kiti	A.B.T. Laboratory Industry, Türkiye

3.1.4. Tamponlar

Tablo 3. Çalışmada Western blot için kullanılan tamponlar.

Tamponlar	Bileşenler
Tris-Buffered Salline (TBS) Tamponu	6.05 gr Tris-HCl ve 8.76 gr NaCl 1 lt dH ₂ O içinde çözdürülerek pH=7.6 olacak şekilde hazırlanmıştır.
Yıkama Tamponu	Gerekli miktarda yıkama tamponu TBS ve 0.1% Tween20 oranı olacak şekilde hazırlanmıştır.
Transfer Tamponu	14.4 gr glisin, 3.03 gr Tris-Baz, 200 ml metanol ve 2 ml SDS (%10) 1 lt dH ₂ O içinde çözdürülerek hazırlanmıştır.
10X Yürütme Buffer	144 gr glisin, 30.3 gr Tris-Baz ve 10 gr SDS 1 lt dH ₂ O içinde çözdürülerek hazırlanmıştır.
Strip Tampon	200 mL SDS (%10), 62.5 mL İM Tris (pH=6.7) dH ₂ O ile tamamlanarak dH ₂ O ile çözülmüştür. Sıyırma adımından önce, 50 mL strip tamponuna 350 µl β-merkaptoetanol ilave edildi.
Bloklama Tamponu	Gerekli miktarda bloklama tamponu %5 süt tozu içeren TBS tamponu ile hazırlanmıştır.
BSA Tamponu	Gerekli miktarda BSA bloklama solüsyonu, %3 BSA içeren TBS tamponu ile hazırlanmıştır.

3.1.5. Antikorlar

Tablo 4. Çalışmada kullanılan antikorların listesi.

Antikor	Oran	Türü	Kaynak
IRS-1	1:1000	Tavşan	Elabscience (Cat No: E-AB-66979)
p-IRS-1	1:1000	Tavşan	BT Lab (Cat No: BT-PHS00881)
AKT	1:1000	Tavşan	BT Lab Cat No: BT-AP00334)
p-AKT(S473)	1:1000	Tavşan	BT Lab (Cat No: BT-PHS00864)
β-tubulin	1:1000	Tavşan	BT Lab (Cat No: BT-PH09778)
Sekonder Antikor	1:5000	Tavşan	BT Lab (Cat No: AS00010)

3.1.6. Primerler

Tablo 5. Çalışmada kullanılan primerler.

Gen	Reverse primer / Forward primer	TM (°C)	Baz Çifti (bp)
IL-1 β	5'-GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG-3'	57.06	22
	5'-CCACAGACCTTCCAGGAGAATG-3'	56.70	22
IL-6	5'-TTCTGCCAGTGCCCTTTTGCTG-3'	56.70	22
	5'-AGACAGCCACTCACCTCTTCAG-3'	56.70	22
TNF- α	5'-ATGGGCTACAGGCTTGTCACCTC-3'	56.70	22
	5'-CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG-3'	56.70	22
NF- κ B	5'-TCTGCTCCTGAGCATTGACGTC-3'	56.70	22
	5'-GCAGCACTACTTCTTGACCACC-3'	56.70 °C	22
Actb	5'-CAAGGTCTCAAACATGATCT-3'	52.97 °C	22
	5'-AACTGGGACGACATGGAGA-3'	51.78 °C	20

3.2. Yöntem

3.2.1. Hasta Seçimi ve Plasenta Dokularının Hazırlanması

Çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile yapılmıştır (Tarih: 17/03/2021, Belge no: E.16928, Protokol no: 2021/57, Aydın, TÜRKİYE). Plasental doku örnekleri Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği' nde gerçekleşen sezaryen doğumlardan belirtilen etik ilkelere uygun olarak alınmıştır.

Gebe kadınlar üç ana gruba ayrılmıştır:

- Herhangi bir metabolik hastalığı olmayan kontrol grubu (n = 12),
- Gebelik öncesi diyabet tanısı almış Pre-DM grubu (n = 10)
- Gebelik sırasında glukoz intoleransı nedeniyle GDM tanısı alan kadınlar (n = 10).

GDM tanısı ADA'nın kriterlerine göre gerçekleştirilmiştir. Hastalara hamileliğin yaklaşık 28. haftasında 2 saatlik 75 gr OGTT uygulanarak uygulanan testin ardından;

- kandaki açlık glikoz konsantrasyonu ≥ 92 mg/dl,
- kandaki 1 saatlik glikoz konsantrasyonu ≥ 180 mg/dl ve
- kandaki 2 saatlik glikoz konsantrasyonu ≥ 153 mg/dl

yukarıdaki üç glikoz konsantrasyonundan herhangi ikisinin uyması koşuluyla GDM tanısı konuldu.

Daha önceden diyabeti olan kadınlar, ilk trimesterdeki glikozile hemoglobin (HbA1c) değerlerine göre diyabet tanısı konuldu. T2DM hariç herhangi bir kronik hastalığı olan, önceden kanser öyküsü, kardiyovasküler hastalığı olan kadınlar çalışmaya alınmadı. Çalışmaya dahil edilen hamilelerde otoimmün hastalık veya akut fetal distres, koryoamniyonit, preeklampsi veya vasküler/renal komplikasyonlar gibi diğer kronik rahatsızlıklar mevcut değildir.

Beyaz kan hücresi (WBC) sayıları her hasta için gebeliğin 3. trimesterinde değerlendirildi. Alanin transaminaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) karaciğer enzim düzeyleri ölçülmüştür. Çalışmaya alınan hamilelerin amniyotik sıvı indeksi (ASI) değerlendirildi. Bebeklerin doğum ağırlıkları ölçülerek APGAR skor testi uygulandı.

Sezaryen doğumla alınan plasenta dokularının hepsi tekil gebeliktir. Plasenta dokuları doğumdan hemen sonra fetal tarafın orta bölgesinden eksize edildi, desidual ve amniyotik membran kısımları ekarte edilerek alındı. PBS ile yıkanarak deneysel çalışma gerçekleştirilene kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.1.1. Hücre Hatlarının Pasajlanması

Swan 71 hücreleri, deneylerden önce % 60-70 konfluansa ulaştıklarında pasajlanmak için besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 5 ml PBS (1X) ile yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırıldı. Hücrelere 1 ml Tripsin-EDTA (% 0.05) eklendi ve 3 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi. Herbir petri için total hacmi 10 ml olmak üzere hücreler 2 farklı petri kabına ekildi.

3.2.1.2. Hücrelerin Dondurulması

% 70-80 konfluansa ulaşan hücrelerin besiyeri, ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 5 ml PBS (1X) ile yıkandıktan sonra PBS çekildi. 1 ml Tripsin-EDTA (% 0.05) eklendi ve 3 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi. Tripsin ortamdan uzaklaştırılarak hücrelere, %70 DMEM-

yüksek glikoz, %20 FBS ve %10 DMSO içeren 2 ml dondurma besiyeri eklendi ve dondurma tüplerine konuldu. Hücreler sırasıyla buz üzerinde 10 dakika, -20°C'de 20 dakika, gece boyunca -80°C'de ve ardından sıvı nitrojende muhafaza edildi.

3.2.1.3. Hücrelerin Çözülmesi

Dondurulmuş hücreler sıvı nitrojenden alındı. Hücreler inkübatöre (37°C'de) yerleştirildi. Çözöldükten sonra 10 ml Petri kaplarına aktarılmıştır ve 9 ml besiyeri verildi. Hücreler inkübatöre yerleştirildi. Ertesi gün, eski besiyeri tazeyle değiştirildi.

3.2.1.4. SWAN71 Hücrelerinin Sitokinlerle Muamelesi

ELISA analizinde kullanılan IL-6, TNF- α , NF- κ B ve IL-1 β antikor standartları ile plasenta hücrelerinde diyabet modeli oluşturuldu. Bunun için kontrol, IL-6, TNF- α , NF- κ B , IL-1 β ve LPS+Pol I:C grubu olmak üzere 7 grup belirlendi ve herbir grup için % 70 konfluansa sahip SWAN71 hücreleri ile deney dizaynı oluşturuldu. 10 ml besiyeri içindeki hücrelere 1 ml IL-6, TNF- α , NF- κ B ve IL-1 β sitokinleri eklendi. Pozitif kontrol olarak ise literatürle uyumlu olarak belirlenen konsantrasyonlarda LPS+Pol I:C eklendi. 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Ardından 10 mmolar insülin çözeltisi eklenerek 30 dakika 37°C'de bekletildi. Daha sonra Western Blot analizi için protein izolasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.2.2. Hücrelerden Protein İzolasyonu

% 70 konfluansa ulaşan petri kaplarındaki hücreler besiyerinden arındırıldı. Hücrelerin üzeri 5 ml PBS ile yıkanmış ve ortamdan uzaklaştırıldı. 1 ml tripsin eklenerek 37°C'de 3 dakika bekletildi. Daha sonra 1 ml PBS eklenerek 16.000 x g'de 4 °C' de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine içeriğinde % 1 fosfataz ve % 1 proteaz inhibitör kokteyli bulunan 1 ml RIPA tampon çözeltisi eklendi ve pipetaj yapıldı. 80°C kaldırılarak 4 kez dondur-çöz işlemi uygulandı. Bu uygulamanın ardından 16.000 x g'de

4 °C' de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant taze bir ependorfa aktarıldı. Elde edilen protein, deneyler gerçekleşene kadar -80 °C' de muhafaza edildi.

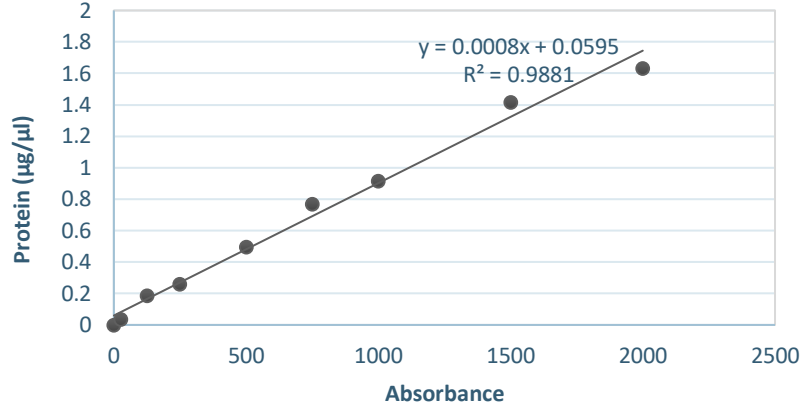
3.2.3. Proteinin Kantitatif Analizi

Proteinler izole edildikten sonra hücre lizatları 1:5 oranında seyreltildi. Proteinin kantitatif analizi, BCA analizi ile ölçüldü. Protein standardının hazırlanması için kullanılan BSA konsantrasyonları, Tablo 3'te verilen kit protokolüne (Sigma BCA analiz kiti) uygun olarak hazırlandı.

Tablo 6. BCA protein testinin standart solüsyonu.

Standart	Su miktarı	BSA Miktarı (µL)	BSA Konsantrasyonu (µg/mL)
A	0	Stoktan 300 µL	2000
B	125	Stoktan 375 µL	1500
C	325	Stoktan 325 µL	1000
D	175	B'den 175 µL	750
E	325	C'den 325 µL	500
F	325	E'den 325 µL	250
G	325	F'den 325 µL	125
H	400	G'den 100 µL	25
I	400	0	0=Blank

96-kuyucuklu mikropalakada her standart ve konsantrasyonu bilinmeyen proteinler 25 µL eklenerek pipetaj yapıldı. Hücreler 1:6 oranında seyreltildi. Her kuyucuğa 200 µL BCA çalışma reaktifi eklendi ve ardından çalkalayıcıda 30 saniye karıştırıldı. Mikropalakanın üzeri kapatılarak 30 dakika boyunca 37°'de inkübe edildi. Plaka oda sıcaklığına geldikten sonra absorbanı 562 nm'de plaka okuyucuda ölçüldü.



Şekil 6. BCA analizinin standart grafiği

Örneklerdeki protein konsantrasyonları standart grafiğe göre hesaplandı.

3.2.4. Western Blot Analizi

Örnekler her kuyuya 100 µg protein ile jele yüklenmek üzere hazırlandı. Toplam 30 µl kuyu hacmi için, örneklerin protein konsantrasyonlarına göre 6 µl 5x yükleme tamponu ve 24 µl örnek+lizat tamponu 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. Tüm materyaller dondurucudan çıkarıldıktan sonra kısa bir santrifüj işlemi uygulandı. Tüpler 95 °C' de 5 dakika inkübe edildi. 5 µl protein markörü ve 30 µl numune daha sonra jel kuyularına yüklendi. Proteinler 90 V'ta yürütüldü. Yürütme işleminden sonra transfer tamponunda transfer sandviçi hazırlandı ve 2 saat boyunca 70 V'ta transferi gerçekleştirildi. Transfer basamağından sonra membran blokaj solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Bloke etme adımından sonra membran, blokaj solüsyonunda 1:1000 konsantrasyonda primer antikor ile 4 °C'de 16 saat inkübe edildi. Membran daha sonra yıkama tamponu ile 5 dakika boyunca üç kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından, membran, oda sıcaklığında 2 saat süreyle bloke etme çözeltisine 1:5000 konsantrasyonda sekonder antikor ile muamele edildi. Daha sonra tekrar yıkama tamponu ile üç kez 10 dakika yıkandı. Yıkandıktan sonra, luminol arttırıcı solüsyon ve peroksit reaktifi 1:1 oranında karıştırılarak western ECL substratı (Bio-Rad) kullanıldı. Protein bandı 2 dakika sonra görüntüldü. Görselleştirmeden sonra membran, oda sıcaklığında 1 saat 30 dakika boyunca strip solüsyonu ile inkübe edildi. Strip işleminin ardından membran yıkama tamponu ile 3 kez 5 dakika yıkandı. 1 saat oda sıcaklığında bloke etme çözeltisi ile inkübe edildi ve bloklama çözeltisi içinde gece boyunca β-Tubulin (1:5000) veya başka bir birincil antikor (1:1000) ile işleme tabi tutuldu ve adımlar tekrarlandı. Protein

bantları ImageJ (NIH, USA) programı ile analiz edilerek miktarları belirlendi. Her grup için bantlar, referans proteinine göre normalleştirilmiş ve ekspresyon değişimleri hesaplandı.

3.2.5. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu Hybrid-R™ RNA izolasyon kiti (GeneAll) ile elde edildi. ~100 mg hacimdeki plasental doku ve $\sim 1 \times 10^7$ hücre, 1:1 hacimde cam boncuk ile 1 mL RiboEx içinde homojenleştirildi. Homojenat oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra 12.000 x g'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant taze tüpe alındı. 1 ml RiboEx™ başına 200 ul kloroform eklendi ve 15 saniye boyunca kuvvetlice çalkalandı. Örnek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. 12.000 x g'de 15 dakika 4 °C'de santrifüjlendi ve sulu faz yeni tüpe aktarıldı. Örnekler 1 hacim Buffer RBI eklendi ve alt üst edilerek iyice karıştırıldı. Karışım bir mini kolon tipi F'ye aktarıldı ve oda sıcaklığında ≥ 10.000 x g'de 30 saniye santrifüjlendi. Mini sütuna Tampon SWI eklendi. Örnekler, oda sıcaklığında 30 saniye boyunca ≥ 10.000 x g'de santrifüjlendi. 500 µl RNW Tamponu mini kolona eklenmiş ve ≥ 10.000 x g'de oda sıcaklığında 30 saniye santrifüjlendi. Bundan sonra, kalan yıkama tamponunu çıkarmak için oda sıcaklığında ilave 1 dakika boyunca ≥ 10.000 x g'de santrifüjlendi ve mini kolonu yeni 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Kolona 50 µl Nükleaz içermeyen su. 2 dk bekletildi. Örnekler oda sıcaklığında 2 dakika ≥ 10.000 x g santrifüjlendi.

3.2.6. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA örneklerinin saflıkları ve konsantrasyonları nanodrop ile belirlendi. 260 nm ve 280 nm absorbans değerleri dikkate alınarak 260/280 oranını ~ 2.0 olan RNA örnekleri kullanıldı. cDNA sentezi için her örnekten 100 ng/µl RNA olarak hesaplandı. Her örnek için Tablo 8 'de gösterilen miktarda bileşenler A.B.T.™ cDNA sentez kiti kullanılarak 10 µl cDNA sentez reaksiyonu hazırlandı.

Tablo 7. cDNA sentezi için kullanılan bileşenleri.

cDNA reaksiyon bileşenleri (10 µL)	Hacim (µL)
------------------------------------	------------

Reaksiyon tamponu (10x)	2
dNTP (2mM)	1
Random hexamer (50 µM)	2
Reverse transcriptaz enzimi (200 U/µL)	1
RNAase inhibitörü	0,5
RNAase içermeyen su	3.5

Karışım buz üzerine yerleştirilip hafifçe karıştırıldı. 10 µl ana karışım mikro santrifüj tüplerine aktarıldı. 10 µl RNA örnekleri eklendi ve pipetaj yapıldı. Daha sonra santrifüj edilerek buz üzerine yerleştirildi.

Tablo 8. cDNA sentezinin reaksiyon koşulu.

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
1	25	10 dk	1
2	37	120 sn	1
3	85	5 dk	1
4	4	∞	1

cDNA sentez reaksiyonu gerçekleştirildikten sonra örnekler –80 °C’ye alınarak muhafaza edildi.

3.2.7. Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (q-PCR)

q-PCR reaksiyonu için A.B.T. TM 2X SYBR-Green MasterMix kiti kullanıldı. Kit içerisindeki reaktifler oda sıcaklığında çözülerek buz üzerine yerleştirildi. 100 µl konsantrasyona sahip primerler belirtilen hacimde nükleaz içermeyen su kullanılarak 10 µM konsantrasyona getirildi.

Her örnek 20 µl hacim olacak şekilde reaksiyon Tablo 10'daki bileşenler kullanılarak 96 kuyucuklu plakada gerçekleştirildi.

Tablo 9. q-PCR reaksiyon bileşenleri.

q-PCR reaksiyon bileşenleri (20 µl)	Hacim (µL)
q-PCR SYBR-Green MasterMix	10
ROX boya	0.4
10 µM primer (forward)	0.5
10 µM primer (reverse)	0.5
cDNA	5
RNAase içermeyen su	3.6

Tüm reaktifler hazırlandıktan sonra hafifçe karıştırılıp hızlı bir şekilde santrifüj edildi. 96 kuyucuklu plakadaki reaksiyon Bio-Rad CFS Maestro q-PCR'ye yerleştirilerek PCR reaksiyonu Tablo 11'de gösterildiği gibi gerçekleştirildi.

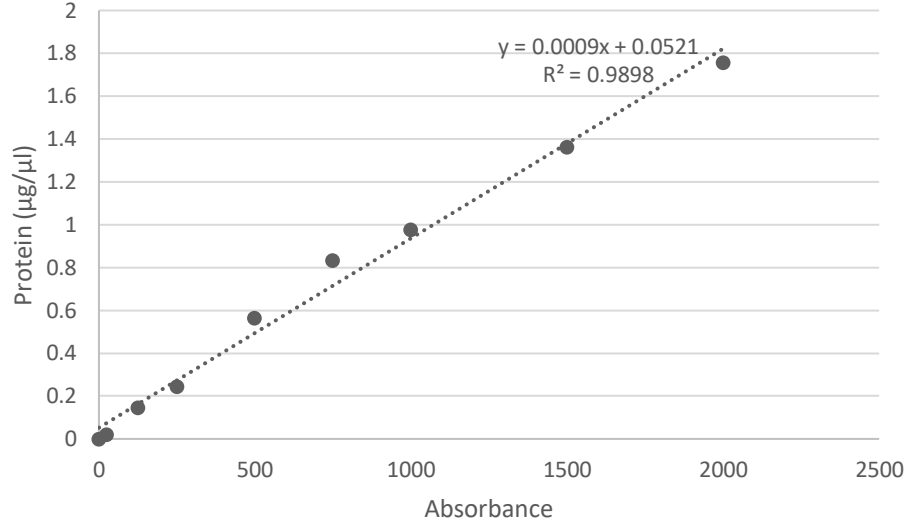
Tablo 10. q-PCR reaksiyonu.

Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
95	5 dk	1
95	15 sn	50
55	20 sn	50
72	30 sn	50

Reaksiyondaki döngü eşik (CT) değerleri, referans gene (β -aktin) göre normalize edilerek $2^{-\Delta\Delta CT}$ 'ye formülüne göre belirlendi. Her grup triplike olarak gerçekleştirildi.

3.2.8. ELISA Analizi

Plasental dokusu homojenize edilmeden önce fazla kan soğuk PBS (pH=7.4) ile uzaklaştırıldı. Miktarı 100 mg olarak tartılan doku, 1 ml PBS içinde doku/cam boncuk oranı 1:1 olacak şekilde cam boncuklar yardımıyla homojenize edildi.

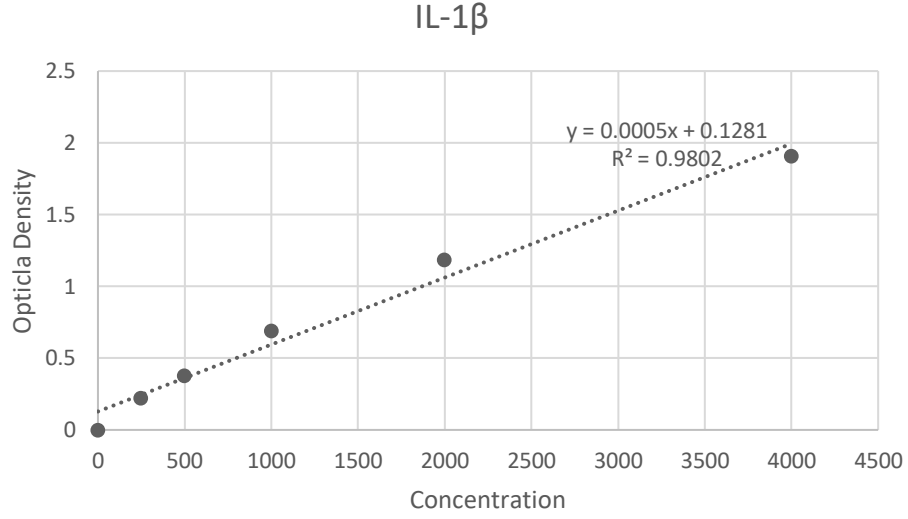


Şekil 7. Plasental doku proteininin standart grafiği.

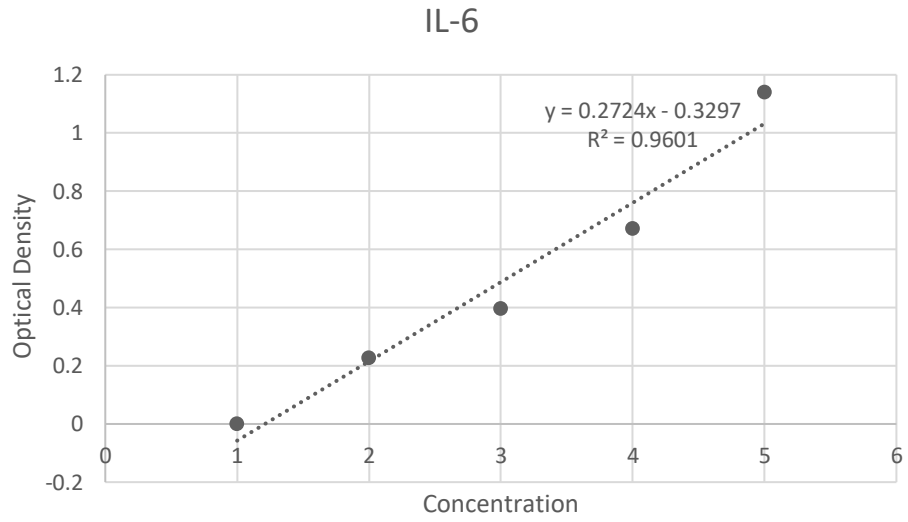
ELISA testi BT LAB ELISA test kiti ile yapıldı. Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve plasenta dokuları hazırlandı. Reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Deney, oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Tablo 11. ELISA analizi için kullanılan antikorların standart konsantrasyonları.

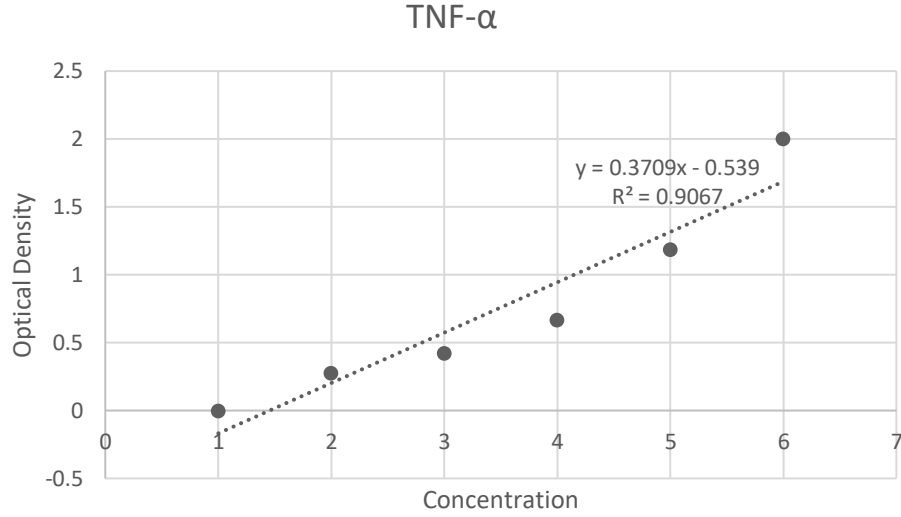
Antikor	Standart Konsantrasyon
IL-1β	No.5 4000 pg/ml
	No.4 2000 pg/ml
	No.3 1000 pg/ml
	No.2 500 pg/ml
	No.1 250 pg/ml
IL-6	No.5 320 ng/l
	No.4 160 ng/l
	No.3 80 ng/l
	No.2 40 ng/l
TNF-α	No.1 20 ng/l
	No.5 480 ng/l
	No.4 240 ng/l
	No.3 120 ng/l
NF-κB	No.2 60 ng/l
	No.1 30 ng/l
	No.5 6 ng/ml
	No.4 3 ng/ml
NF-κB	No.3 1,5 ng/ml
	No.2 0,75 ng/ml
	No.1 0,375 ng/ml



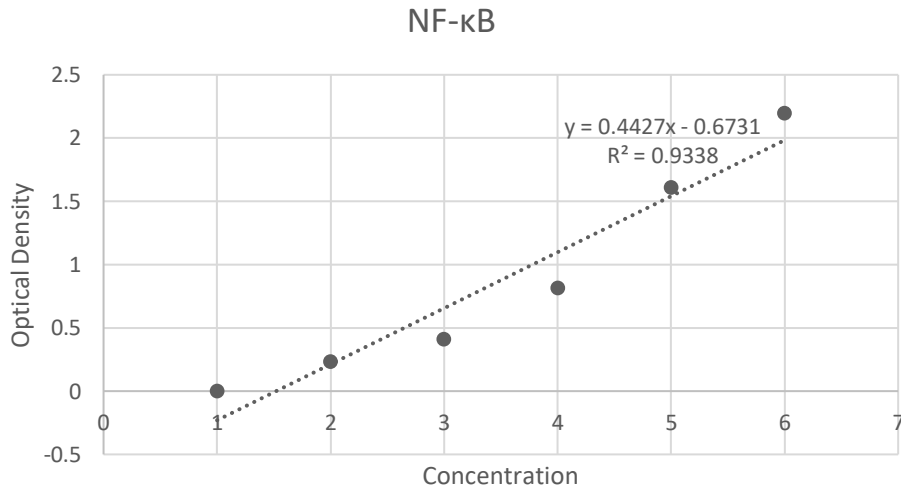
Şekil 8. ELISA analizinde kullanılan IL-1 β antikorunun standart eğri grafiği



Şekil 9. ELISA analizinde kullanılan IL-6 ELISA antikorunun standart eğri grafiği.



Şekil 10. ELISA analizinde kullanılan TNF- α antikorunun standart eğri grafiği.



Şekil 11. ELISA analizinde kullanılan NF- κ B antikorunun standart eğri grafiği.

ELISA analizi, üstte yer alan standart eğri grafiklerine göre yapıldı.

Her standart kuyucuğa 50 μ l hacminde standart solüsyonu eklendi. Kuyucuklara 40 μ l hacimde örnekler ve örneklerin bulunduğu kuyulara da 10 μ l IL-1 β antikorunu, ardından blank kuyucuk hariç örneklerin bulunduğu kuyulara ve standart kuyulara 50 μ l streptavidin-HRP eklendi. Her bir kuyucuk homojen duruma getirilerek, üzeri kapatıldı ve 60 dakika 37 °C'de inkübe edildi. 60 dakikanın ardından plaka 5 kez 300 μ l yıkama tamponu ile yıkandı. Her

kuyucuğa 50 µl substrat A ve 50 µl substrat B eklendi. Plaka yeni bir kapatıcı ile kaplanarak 37 °C'deki karanlıkta ortamda 10 dakika inkübe edildi. Standart ve örnekleri içeren kuyuya 50 µl stop solüsyonu eklendi. Standartların ve numunelerin optik yoğunluk (OD) değeri, 10 dakika içinde 450 nm'de absorbans değerleri bir mikropłaka okuyucu kullanılarak belirlendi.

IL-6, TNF- α ve NF- κ B antikorlarının ELISA analizi için IL-1 β ELISA analizinde uygulanan protokol, antikor çeşidi değiştirilerek gerçekleştirildi.

3.2.9. İstatiksel Analiz

Sürekli değişkenler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. Normal dağılıma uygunluk Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılan gruplardaki verilerin karşılaştırılması One way ANOVA ile gerçekleştirildi. Analizler Graphpad Prism (versiyon 9.4.0) yardımıyla yapıldı. Anlamlılık P değerleri “*”: $p < 0,05$, “**”: $p < 0,01$, “***”: $p < 0,001$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Kontrol, GDM ve Pre-DM Gruplarındaki Hamile Kadınların Karakteristik Özellikleri

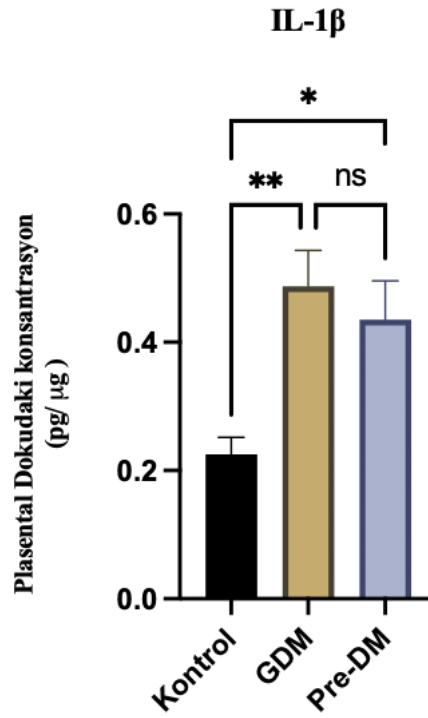
Çalışmaya dahil edilen kontrol (n=12), GDM (n=10) ve Pre-DM (n=10) gruplarındaki kadınların yaş ortalamaları, amniyotik sıvı indeksleri, AST ve ALT değerleri, beyaz kan hücreleri (WBC), hemogloblin A1C (HbA1c) değerleri, 75 g OGTT-28.hafta açlık kan şekeri (AKŞ), 1 saat kan şekeri, 2 saat kan şekeri, bebek kiloları, Apgar 1 dk ve Apgar 5 dk sonuçları Tablo 12’de verildi. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiş olup, anlamlılık *p < 0,05’dir.

Tablo 12. Gruplardaki hamile kadınların/bebeklerin karakteristik özellikleri

IL-1 β p değeri	Kontrol (n=12)	GDM (n=10)	Pre-DM (n=10)
Yaş	32,17 \pm 1,09	33,40 \pm 1,29	32,83 \pm 1,13
Amniyotik sıvı indeksi	10,08 \pm 0,74	11,50 \pm 1,22	11,83 \pm 1,37
AST (U/L)	15,00 \pm 1,30	15,50 \pm 0,61	16,92 \pm 1,30
ALT (U/L)	13,17 \pm 0,98	15,40 \pm 0,81	16,89 \pm 1,50
WBC (x10 ⁹ /L)	10,07 \pm 0,44	9,81 \pm 0,45	9,45 \pm 0,56
HbA1c (%)	4,82 \pm 0,10	7,0 \pm 0,12*	4,99 \pm 0,13
75 g OGTT ~ 28. hafta			
AKŞ (mg/dl)	86,08 \pm 2,85		98,33 \pm 2,17*
1 saat (mg/dl)	123,10 \pm 2,4		191,80 \pm 1,80*
2 saat (mg/dl)	103,6 \pm 2,45		162,0 \pm 1,53*
Bebek Kilo (g)	3106 \pm 127,4	3532 \pm 146,8	3248 \pm 119,7
Apgar 1 dk	8,333 \pm 0,188	8,000 \pm 0,258	7,833 \pm 0,241
Apgar 5 dk	9,167 \pm 0,166	9,000 \pm 0,258	8,917 \pm 0,228

4.2. Plasental Dokulardaki İnflamasyonun ELISA Analizi ile Belirlenmesi

Plasenta dokularında inflamasyonun tespiti için IL-1 β , IL-6, TNF- α ve NF- κ B belirteçleri belirlendi. Gruplardaki plasenta dokularından protein izole edilerek ELISA analizi gerçekleştirildi. Protein düzeyleri, kontrol grubuna göre göreceli kat değişimleri şeklinde verildi. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiş olup şekillerde kontrol grubuna göre anlamlı farklar ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05 olacak şekilde gösterildi.

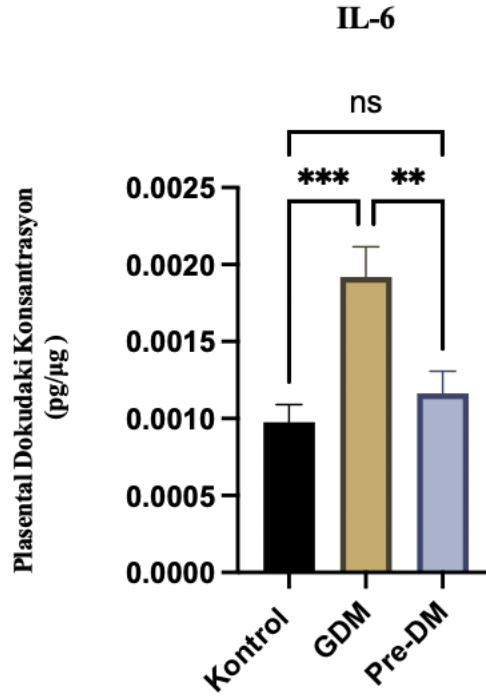


Şekil 12. Kontrol, GDM ve Pre-DM'de plasenta dokusunun IL-1 β seviyelerinin ELISA sonucu.

Tablo 13. Gruplardaki hastaların IL-1 β seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi.

IL-1 β p değeri	Kontrol	GDM	Pre-DM
Kontrol		0.0012	0.0137
GDM			0.7465
Pre-DM			

Hamile kadınların plasenta örneğinde IL-1 β protein ekspresyonu kontrol grubunda 0.22 \pm 0.02, GDM grubunda 0.48 \pm 0.05 ve Pre-DM'de 0.43 \pm 0.06 olarak belirlendi. GDM grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulundu. GDM ve Pre-DM arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Kontrol grubuna kıyasla pre-DM grubunda önemli ölçüde daha yüksek IL-1 β seviyesi tespit edildi (Şekil 12, Tablo 13).

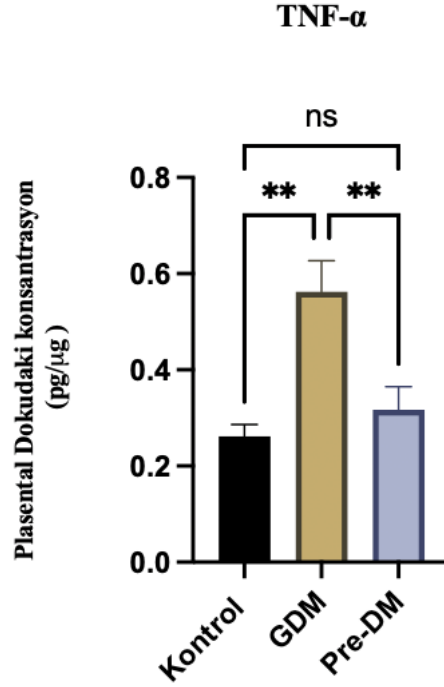


Şekil 13. Kontrol, GDM ve Pre-DM'de plasenta dokusunun IL-6 seviyelerinin ELISA sonucu.

Tablo 14. Gruplardaki hastaların IL-6 seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi.

IL-6 p değeri	Kontrol	GDM	Pre-DM
Kontrol grup		0.0004	0.6937
GDM grubu			0.0031
Pre-DM grubu			

Hamile kadınların plasenta örneğinde IL-6 protein ekspresyonu kontrol grubunda 0.00097 \pm 0.00011, GDM grubunda 0.0019 \pm 0.00019 ve Pre-DM'de 0.0011 \pm 0.0 olarak belirlendi. GDM grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı olarak daha yüksek bir IL-6 düzeyi bulundu. Pre-DM grubuna kıyasla GDM grubunda anlamlı bir IL-6 seviyesi tespit edildi. Kontrol grubu ile Pre-DM grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (Şekil 13, Tablo 14).

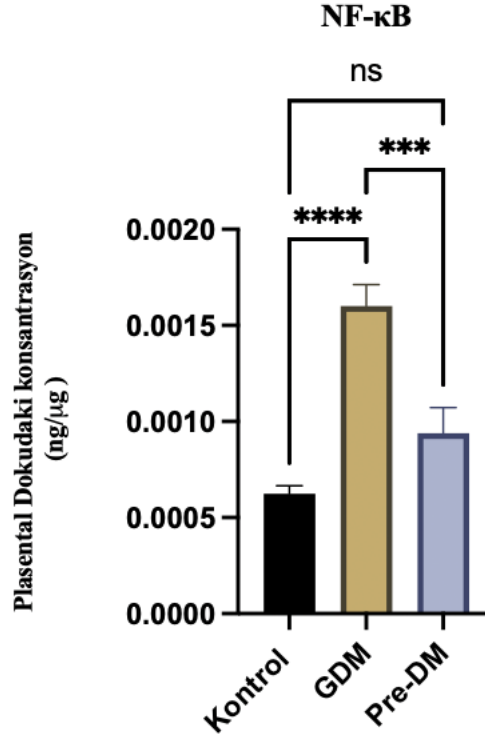


Şekil 14. Kontrol, GDM ve Pre-DM'de plasenta dokusunun TNF- α seviyelerinin ELISA sonucu.

Tablo 15. Gruplardaki hastaların TNF- α seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi.

TNF- α	Kontrol	GDM	Pre-DM
Kontrol		0.0013	0.73
GDM			0.0057
Pre-DM			

Hamile kadınların plasenta örneğinde TNF- α protein ekspresyonu kontrol grubunda 0.26 ± 0.02 , GDM grubunda 0.56 ± 0.064 ve Pre-DM'de 0.31 ± 0.048 olarak belirlendi. GDM grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı düzeyde TNF- α seviyesi bulundu. Pre-DM grubuna kıyasla GDM grubunda anlamlı düzeyde TNF- α seviyesi tespit edildi. Kontrol grubu ile Pre-DM grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi (Şekil 14, Tablo 15).



Şekil 15. Kontrol, GDM ve Pre-DM'de plasenta dokusunun NF-κB seviyelerinin ELISA sonucu.

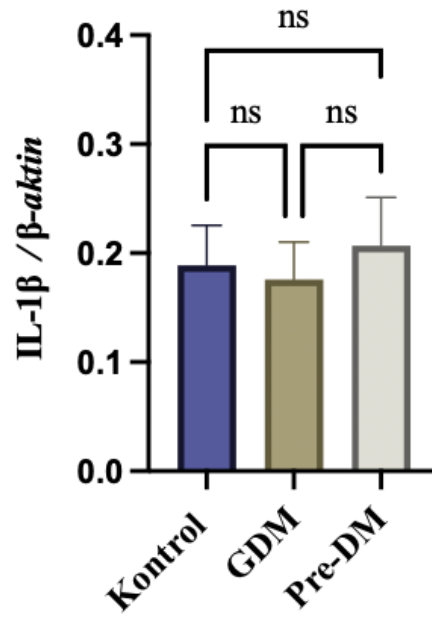
Tablo 16. Gruplardaki protein örneklerinin NF-κB seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi.

NF-κB	Kontrol	GDM	Pre-DM
Kontrol		0.0045	0.7981
GDM			0.0257
Pre-DM			

Hamile kadınların plasenta örneğinde NF-κB protein ekspresyonu kontrol grubunda $0,0006 \pm 4,185e-005$, GDM grubunda $0,0016 \pm 0,0011$ ve Pre-DM'de $0,00093 \pm 0,00013$ olarak belirlendi. GDM grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı düzeyde NF-κB seviyesi bulundu. Pre-DM grubuna kıyasla GDM grubunda anlamlı düzeyde NF-κB seviyesi saptandı. Kontrol grubu ile Pre-DM grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi (Şekil 15, Tablo 16).

4.2. Placental Dokularındaki İnflamasyonun q-PCR Analizi ile Belirlenmesi

Plasenta dokularında inflamasyonun tespiti için IL-1 β , IL-6, TNF- α ve NF- κ B belirteçleri belirlendi. Gruplardaki plasenta dokularından RNA izole edilerek q-PCR analizi gerçekleştirildi. Grupların plasenta dokularında saptanan mRNA ekspresyonları β -aktine göre normalize edildi, kontrol grubuna göre göreceli kat değişimleri şeklinde verildi. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiş olup şekillerde kontrol grubuna göre anlamlı farklar ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05 olacak şekilde gösterildi.

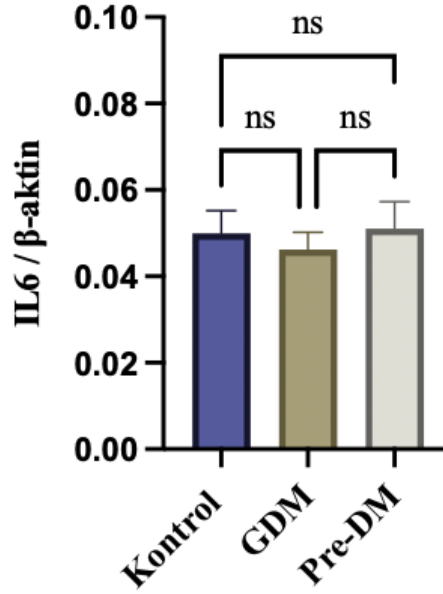


Şekil 16. Kontrol, GDM ve Pre-DM'de plasenta dokusunun IL-1 β mRNA seviyelerinin q-PCR sonuçları.

Tablo 17. Gruplardaki protein örneklerinin IL-1 β m-RNA seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi.

IL-1 β	Kontrol	GDM	Pre-DM
Kontrol		0,9860	0.9416
GDM			0.8399
Pre-DM			

Hamile kadınların plasenta örneğinde IL-1 β m-RNA düzeyi kontrol grubunda 0.188 \pm 0.036, GDM grubunda 0.1759 \pm 0.0344 ve Pre-DM'de 0.2069 \pm 0.0443 olarak belirlendi. Kontrol grubu ile GDM, kontrol ve Pre-DM veya GDM ve Pre-DM arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi (Şekil 16, Tablo 17).

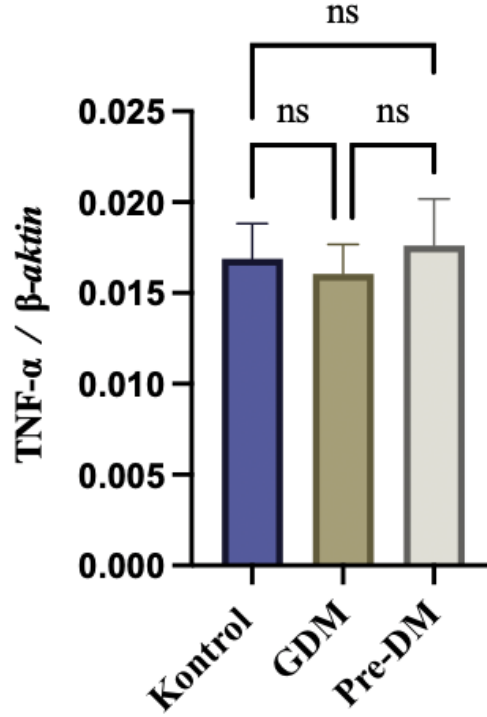


Şekil 17. Kontrol, GDM ve Pre-DM'de plasenta dokusunun IL-6 mRNA seviyelerinin q-PCR sonuçları.

Tablo 18. Gruplardaki protein örneklerinin IL-6 m-RNA seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi.

IL-1 β	Kontrol	GDM	Pre-DM
Kontrol grup		0.8649	0.9873
GDM grubu			0.778
Pre-DM grubu			

Hamile kadınların plasenta örneğinde IL-6 m-RNA düzeyi kontrol grubunda 0.0494 \pm 0.0052, GDM grubunda 0.0461 \pm 0.0040 ve Pre-DM'de 0.0510 \pm 0.0061 olarak belirlendi. Kontrol grubu ile GDM, kontrol ve Pre-DM veya GDM ve Pre-DM arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi (Şekil 17, Tablo 18).

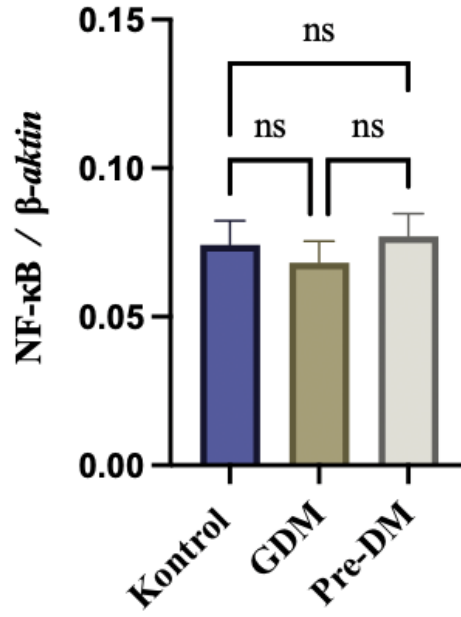


Şekil 18. Kontrol, GDM ve Pre-DM'deki plasenta dokusunun TNF- α mRNA seviyelerinin q-PCR sonuçları.

Tablo 19. Gruplardaki protein örneklerinin TNF- α m-RNA seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi.

TNF- α	Kontrol	GDM	Pre-DM
Kontrol		0.9556	0.9670
GDM			0.8569
Pre-DM			

Hamile kadınların plasenta örneğinde TNF- α m-RNA düzeyi kontrol grubunda 0.0168 ± 0.0019 , GDM grubunda 0.0160 ± 0.0016 ve Pre-DM'de 0.0176 ± 0.0025 olarak belirlendi. Kontrol grubu ile GDM, kontrol ve Pre-DM veya GDM ve Pre-DM ($p=ns$) arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi (Şekil 18, Tablo 19).



Şekil 19. Kontrol, GDM ve Pre-DM'de plasenta dokusunun NF-κB mRNA seviyelerinin q-PCR sonuçları.

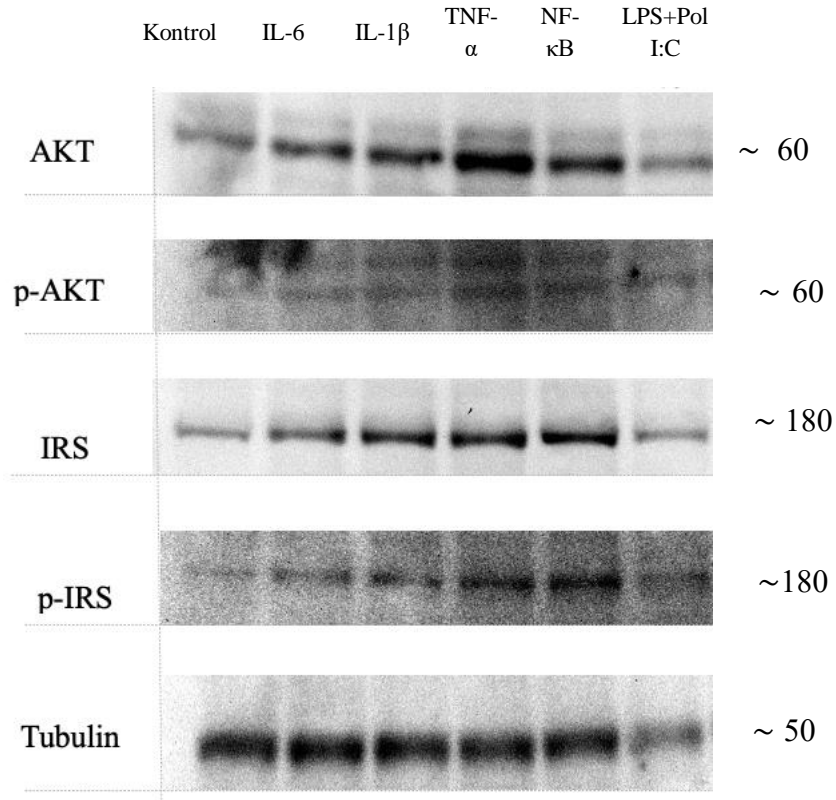
Tablo 20. Gruplardaki protein örneklerinin NF-κB mRNA seviyelerinin p değerlerinin karşılaştırma analizi.

IL-1β	Kontrol	GDM	Pre-DM
Kontrol		0.8429	0.9644
GDM			0.6825
Pre-DM			

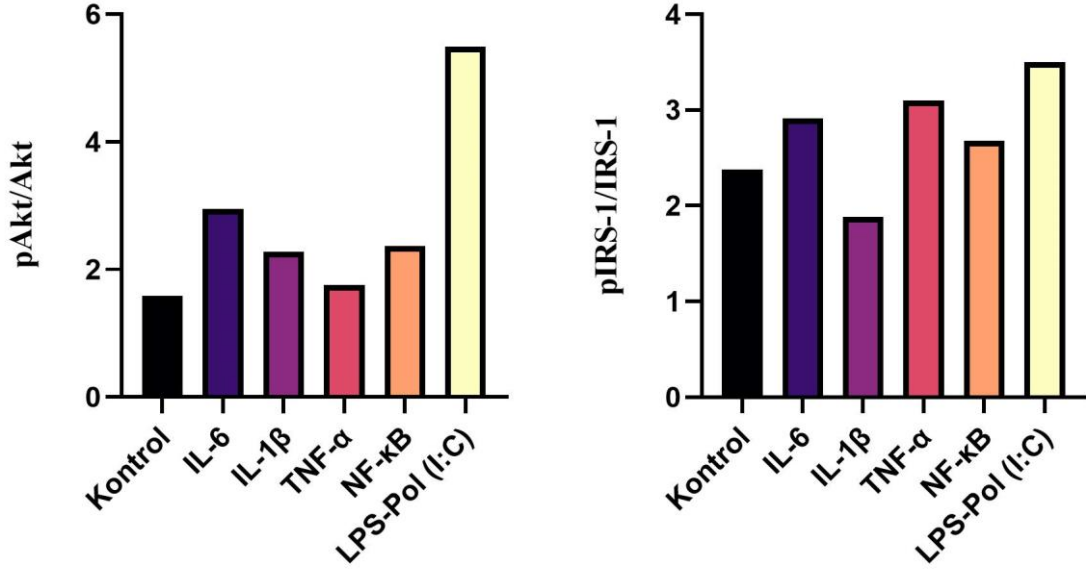
Hamile kadınların plasenta örneğinde NF-κB m-RNA düzeyi kontrol grubunda $0,0741 \pm 0,0081$, GDM grubunda $0,0681 \pm 0,0072$ ve Pre-DM'de $0,0770 \pm 0,0076$ olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu ile GDM, kontrol ile Pre-DM ve GDM ile Pre-DM ($p=ns$) arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 19, Tablo 20).

4.3. İnflamasyon Ortamı Oluşturularak İnsülin Yolağı İndüklenen Plasenta Hücrelerinde p-AKT ve p-IRS-1 Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Trofoblast hücrelerine IL-6, IL-1 β , TNF- α , NF- κ B sitokinleri verilerek inflamasyon ortamı oluşturuldu. Hücelere pozitif kontrol olarak literatürle uyumlu olarak LPS+Pol I:C uygulandı. Kontrol, IL-6, IL-1 β , TNF- α , NF- κ B ve LPS+Pol I:C olarak altı grup trofblast hücrelerine 20 dk insülin verilerek sonucunda glikoz metabolizmasında önemli rol oynayan AKT, p-AKT, IRS-1, p-IRS-1 ekspresyonlarına western blot analizi ile bakıldı. Her bir gruptaki protein ekspresyonları β -Tubuline göre normalize edildi. Kontrol grubu kullanılarak göreceli ekspresyon değişimleri gösterildi.



Resim 1. Sitokinlere maruz kalan SWAN71 hücrelerinin p-AKT/AKT ve p-IRS-1/IRS-1 ekspresyon seviyelerinin membran görüntüsü.



Şekil 20. Sitokinlere maruz kalan SWAN71 hücrelerinin p-AKT/AKT ve p-IRS-1/IRS-1 ekspresyon seviyeleri Western Blot analizi sonucu.

İnflamasyon ortamı oluşturulan trofoblast hücrelerinde pAkt/Akt ekspresyon seviyesi LPS-Pol (I:C) grubunda daha fazla görüldü. pIRS-1/IRS-1 ekspresyon seviyesinde gruplar arasında anlamlı bir değişiklik olmamıştır (Şekil 20).

5. TARTIŞMA

Anormal glukoz metabolizması ile karakterize bir durum olan DM, hem insülin direnci hem de insülin sekresyonunun bozulması ile ortaya çıkar. İnsülin sekresyonunun bozulmasını takip eden insülin direnci, kronik inflamasyonun bir sonucudur (Liu ve diğerleri, 2020). GDM, diyabet türlerinden biridir. Yapılan çalışmalara göre, kronik inflamatuvar reaksiyonlar ile GDM gelişimi arasında doğrudan bir bağlantı vardır. Patofizyolojik süreç hem insülin direncine hem de insülin sekresyonunun modifikasyonuna katkıda bulunur (Liu ve diğerleri, 2020). Kronik inflamasyonun insülin direnci gibi pankreas inflamatuvar bozukluklarının gelişiminde rolü vardır. GDM hastalarında ve normal hamile kadınlarda kalıcı inflamasyonun moleküler temelleri henüz tam olarak anlaşılammıştır. GDM'deki kronik inflamatuvar süreç için risk faktörleri olduğu düşünülen inflamatuvar araçlardan biri sitokinlerdir (Liu ve diğerleri, 2020).

Çalışmamızda kontrol (n=12), GDM (n=10) ve Pre-DM (n=10) olarak üç grup belirlendi. Belirlenen gruplardaki hamile kadınlardan plasenta örnekleri toplandı. Gruplardaki her bir kadından alınan plasenta örneğinde inflamasyon ve insülin direnci ile ilişkili belirteçlere bakıldı. Gestasyonel diyabete sahip ve önceden diyabet tanısı olan hamile kadınların plasenta örneklerindeki inflamasyon ve insülin direnci belirteçlerinin kıyaslanması kontrol grubu olarak belirlenen ve glikoz intoleransına sahip olmayan hamile kadınların plasenta örnekleriyle karşılaştırıldı.

IL-6, inflamasyon durumunda aşırı eksprese edilir. Esas olarak plasenta üretimine bağlı olarak hamilelikte IL-6'daki artış, gebeliğe bağlı insülin direnci ile ilişkilendirilmiştir. IL-6, doğumda GDM'li kadınlarda upregüle edilir. Bazı çalışmalarda, IL-6 konsantrasyonu, vücut yağ yüzdesi, BMI, insülin duyarlılığı ve hamilelik sırasında ve doğumdan sonra plazma glukoz seviyeleri ile pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir. GDM'nin önemli bir tahminicisi olduğu öne sürülmüştür (Abell ve diğerleri, 2015). Sonuçlarımızda ELISA analizi ile bakılan IL-6 sitokini GDM grubunun plasenta örneklerinde literatürle uyumlu olarak anlamlı derecede arttığı bulundu (Şekil 14, Tablo 13). Ancak gruplar arasında qPCR ile bakılan IL-6 mRNA düzeyinde bir fark gözlemlenmedi (Şekil 19, Tablo 18).

IL-1 β salgılanması inflamasyon aktivitesi ile düzenlenir. IL-1 β periferik dokularda ve makrofajlarda insülin sinyalini bozarak insülin direnci gelişimine katkıda bulunur, bu da β -

hücrelerinin insülin duyarlılığında azalmaya ve olası insülin sekresyonunda bozulmaya yol açar. IL-1 β sistemik inflamasyonu artırabilir. Ayrıca GDM'de görülen inflamasyonda artan sitokinlerden biridir (Chen ve diğerleri, 2015). Sonuçlarımızda ELISA analizi ile bakılan IL-1 β sitokini GDM grubunun plasenta örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı ancak Pre-DM ile arasında bir anlamlı fark olmadığı gösterildi (Şekil 14, Tablo 13). Ancak gruplar arasında qPCR ile bakılan IL-1 β mRNA düzeyinde bir fark gözlemlenmedi (Şekil 18, Tablo 17).

Hamilelik boyunca, plasenta insülin duyarlılığının azalmasına katkıda bulunur. Pro-inflamatuvar sitokinler ve plasental büyüme hormonu (PGH) bu duruma katkı sağlar (Lizárraga ve diğerleri, 2021). TNF- α plasenta tarafından üretilir ve anne kanındaki TNF- α seviyeleri ile insülin duyarlılığı arasındaki ilişki terstir (Lizárraga ve diğerleri, 2021). Sonuçlarımızda ELISA analizi ile bakılan TNF- α sitokini GDM ve Pre-DM grubunun plasenta örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gösterildi (Şekil 14, Tablo 13). Ancak gruplar arasında qPCR ile bakılan TNF- α mRNA düzeyinde bir fark gözlemlenmedi (Şekil 20, Tablo 19).

NF- κ B, sitoplazmada inhibitör bir protein olan I κ B- α tarafından bağlanır ve onu etkisiz hale getirir. Bununla birlikte, artan lipid birikimine bağlı olarak plasenta veya adipositler tarafından resistin, TNF- α , IL-6 ve IL-1 β gibi pro-inflamatuvar sitokinler üretildiğinde, I κ Ba'nın degradasyonu uyarılır. Sonuç olarak, NF- κ B aktive olur. İnflamasyon ve insülin direnci ile ilişkili kodlanan genlerin transkripsiyonunda yer alır. GDM'nin inflamatuvar ortamında NF- κ B arttığı gösterilmiştir. (Samra ve diğerleri, 2022). Sonuçlarımızda ELISA analizi ile bakılan NF- κ B sitokini GDM grubunun plasenta örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gösterildi (Şekil 14, Tablo 13). Ancak gruplar arasında qPCR ile bakılan NF- κ B mRNA düzeyinde bir fark gözlemlenmedi (Şekil 21, Tablo 20).

AKT, glikoz ve lipid metabolizmasını düzenler (Huang ve diğerleri, 2018). IRS-1, insülin sinyalleşmesinde önemli bir rol oynar (Schmitz-Peiffer & Whitehead, 2003). Araştırmalarda, AKT veya IRS adaptör proteinlerinin düşürülmesinin insülin kaynaklı glikoz alımını açıkça azalttığı bulundu. Her iki protein de insülin dirençli ve DM'li kişilerde işlevi bozulmuş bir proteindir (Schmitz-Peiffer & Whitehead, 2003) Ayrıca salgılanan inflamatuvar sitokinlerin neden olduğu inflamasyonun, GDM'de artan insülin direnci ile bağlantılı olduğuna inanılmaktadır (Huang ve diğerleri, 2018). Çalışmamızda trofoblast hücrelerinde IL-1 β , IL-6, TNF- α ve NF- κ B sitokinleriyle inflamasyon ortamı oluşturuldu. Plasenta

hücrelerinde Akt ve IRS-1 proteinlerinin ekspresyonlarına bakıldı. Akt fosforillenmesinin ekspresyon seviyesi LPS-Pol (I:C) grubunda daha fazla görüldü. Gruplar arasında IRS-1 serin fosforillenmesinin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır. İnflamasyon ortamının insülin sinyal yolunu baskılayacağı öngörülüyordu. Ancak inflamatuvar sitokinlerle oluşturulan inflamasyon ortamında insülin sinyal yolağında beklenenden farklı bir sonuç elde edildi. Sitokinlerin kombine olarak verilmesi diyabetik koşulda varolan inflamasyonu anlamamız açısından faydalı olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gestasyonel diyabet yalnızca hamilelik sırasında görülür. GDM, anne ve bebek için kısa ve uzun vadeli ciddi sağlık sorunlarına neden olur. Maternal insülin direnci, düşük dereceli inflamasyon ve endotel hücre disfonksiyonu, GDM ile komplike olan gebeliklerin üç temel özelliğidir. Yapılan çalışmalarla birlikte plasentada, anne yağ dokusu ve iskelet kasında insülin direnci, inflamasyon ve endotel hücre disfonksiyonu gibi sorunları içerdiği bulunmuştur.

Çalışmamızda kontrol grubu, GDM ve Pre-DM plasenta örneklerinde inflamasyon markörlerine bakılmıştır. IL-1B , IL-6, TNF- α ve NF- κ B olarak belirlenen inflamasyon markörlerinde protein düzeyi ve m-RNA düzeyi birbiriyle uyumsuzdur. ELISA testi ile elde edilen sitokin seviyeleri kontrol grubuna görece GDM grubunda farklılık göstermiştir. Ancak gruplar arasında IL-1B , IL-6, TNF- α ve NF- κ B'nin m-RNA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değer bulunamamıştır. Bu sonuçların maternal sitokinlerin, plasentaya transferinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bununla birlikte çalışmadaki inflamasyon ve insülin direnci ilişkili belirteçlere hamile kadından alınan serumdan bakılması daha etkili sonuçlara ulaşılmasına katkı sağlayabilir. Aynı zamanda bu belirteçlerin varlığına bebekten alınan kandan bakılarak da ulaşılabilir.

Inflamasyon, çeşitli sitokinler ve moleküler yollar aracılığıyla insülin direncinin gelişiminde önemli bir rol oynar. Plasenta seçici ve geçirgen bir yüzeye sahip olduğundan içerdiği sitokinlerin ve hormonların maternal bölgeyle arasında geçişi gerçekleşebilir. Bu nedenle, insülin direncini önlemek için inflamasyon uygun müdahalelerle hedeflenmelidir. Plasentadan kaynaklı inflamasyonun önlenmesi için anti-inflamatuvar ilaçların kullanılması doğum kontrolü için elzem olabilir.

Spesifik faktörler ve sinyal yolları genellikle birbiriyle ilişkilidir. Örneğin, IKK β /NF- κ B sinyalinin aktivasyonu, TNF- α ve IL-1 β gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını artırabilir ve bu da IKK β /NF- κ B sinyalini uyarabilir. Bu nedenle, inflamasyonla ilişkili insülin direncini analiz eden çalışmalar sırasında hem sitokinlerin dalgalanması hem de ilgili sinyal yollarının durumu dikkate alınmalıdır. Enflamasyonla ilişkili insülin direnci ile ilgili güncel çalışmaların çoğu hayvanlar üzerinde

gerçekleştirilmektedir ve bu da klinikte insülin direncinin iyileştirici bir etkisini göstermek için bu yöntemleri insanlara uygulamayı zorlaştırmaktadır. İnflamasyonu insülin direncine bağlayan mekanizmalar tam olarak anlaşılmadığı için, bunların ilişkisini detaylandırmak için iyi tasarlanmış ek klinik ve laboratuvar çalışmaları gerekmektedir.

PI3K/AKT sinyal yolu, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, metabolizmasını ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini düzenleyerek apoptoz ve kanser hücrelerinin hayatta kalmasına yol açar. Aşırı ekspresyon ve mutasyon gibi nedenlerle PI3K/AKT regülasyonu bozulduğunda obezite, DM ve kanser gibi hastalıklar ortaya çıkar. Bu noktada PI3K'nın farmakolojik inhibisyonu, hastalıkların olumsuz etkilerini tersine çevirebilen etkili ve güvenli bir anti-obezite ve anti-kanser müdahalesi olabilir. PI3K/AKT sinyalinin ve aşağı akış molekülünün manipülasyonu, obezite ve DM tedavisi için umut vaat eden terapötik hedefler olabilir.

GDM, tüm dünyada hamile kadınları etkileyen ciddi bir sağlık sorunudur. Bu aynı zamanda fetüsü de etkileyebilir ve yetişkinlikte sağlık profilini belirleyebilir. Bu nedenle GDM'nin fetüs ve annede patofizyolojik etkilerinin önlenmesi veya indirgenmesi çok önemlidir.

KAYNAKLAR

- Abell, S. K., de Courten, B., Boyle, J. A., & Teede, H. J. (2015). Inflammatory and other biomarkers: Role in pathophysiology and prediction of gestational diabetes mellitus. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 6, pp. 13442–13473). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms160613442>
- Alejandro, E. U., Mamerto, T. P., Chung, G., Villavieja, A., Gaus, N. L., Morgan, E., & Pineda-Cortel, M. R. B. (2020). Gestational diabetes mellitus: A harbinger of the vicious cycle of diabetes. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 14, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21145003>
- Arroyo-Jousse, V., Jaramillo, A., Castaño-Moreno, E., López, M., Carrasco-Neg e, K., & Casanello, P. (2020). Adipokines underlie the early origins of obesity and associated metabolic comorbidities in the offspring of women with pregestational obesity. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1866, Issue 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165558>
- Assimacopoulos-Jeannet, F., Cusin, I., Greco-Perotto, R. M., Terrettaz, J., Rohner-Jeanrenaud, F., Zarjevski, N., & Jeanrenaud, B. (1991). *Glucose transporters: structure, function, and regulation* (Vol. 73).
- Baeyens, L., Hindi, S., Sorenson, R. L., & German, M. S. (2016). β -Cell adaptation in pregnancy. In *Diabetes, Obesity and Metabolism* (Vol. 18, pp. 63–70). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/dom.12716>
- Carrasco-Wong, I., Moller, A., Giachini, F. R., Lima, V. v., Toledo, F., Stojanova, J., Sobrevia, L., & San Martín, S. (2020). Placental structure in gestational diabetes mellitus. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1866, Issue 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165535>
- Chen, L., Chen, R., Wang, H., & Liang, F. (2015). Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. In *International Journal of Endocrinology* (Vol. 2015). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2015/508409>

- Choudhury, A. A., & Devi Rajeswari, V. (2021). Gestational diabetes mellitus - A metabolic and reproductive disorder. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 143). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112183>
- Gauster, M., Majali-Martinez, A., Maninger, S., Gutschi, E., Greimel, P. H., Ivanisevic, M., Djelmis, J., Desoye, G., & Hiden, U. (2017). Maternal Type 1 diabetes activates stress response in early placenta. *Placenta*, *50*, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.118>
- Gołacki, J., Matuszek, M., & Matyjaszek-Matuszek, B. (2022). Link between Insulin Resistance and Obesity—From Diagnosis to Treatment. In *Diagnostics* (Vol. 12, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12071681>
- Guthrie, R. A., & Guthrie, D. W. (2004). Pathophysiology of Diabetes Mellitus. In *Crit Care Nurs Q* (Vol. 27, Issue 2).
- Hoogwerf, B. J. (2020). Type of diabetes mellitus: Does it matter to the clinician? In *Cleveland Clinic Journal of Medicine* (Vol. 87, Issue 2, pp. 100–108). Cleveland Clinic Educational Foundation. <https://doi.org/10.3949/ccjm.87a.19020>
- Huang, X., Liu, G., Guo, J., & Su, Z. Q. (2018). The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. In *International Journal of Biological Sciences* (Vol. 14, Issue 11, pp. 1483–1496). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.27173>
- Jiang, S., Teague, A. M., Tryggestad, J. B., Aston, C. E., Lyons, T., & Chernausk, S. D. (2017). Effects of maternal diabetes and fetal sex on human placenta mitochondrial biogenesis. *Placenta*, *57*, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.06.001>
- Kampmann, U., Knorr, S., Fuglsang, J., & Ovesen, P. (2019). Determinants of Maternal Insulin Resistance during Pregnancy: An Updated Overview. In *Journal of Diabetes Research* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/5320156>
- King, G. L. (2008). The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetes and Its Complications. *Journal of Periodontology*, *79*(8s), 1527–1534. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080246>

- Lain, K. Y., & Catalano, P. M. (2007). Metabolic Changes in Pregnancy. In *CLINICAL OBSTETRICS AND GYNECOLOGY* (Vol. 50, Issue 4).
- Li, A., Qiu, M., Zhou, H., Wang, T., & Guo, W. (2017). PTEN, Insulin Resistance and Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 23(25). <https://doi.org/10.2174/1381612823666170704124611>
- Lorenzo, P. I., Martín-Montalvo, A., Vuilleumier, N. C., & Gauthier, B. R. (2019). Molecular modelling of islet β -cell adaptation to inflammation in pregnancy and gestational diabetes mellitus. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 24). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20246171>
- Lu, W., & Hu, C. (2022). Molecular biomarkers for gestational diabetes mellitus and postpartum diabetes. *Chinese Medical Journal*, 135(16), 1940–1951. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002160>
- Lungkaphin, A., Arjinajarn, P., Pongchaidecha, A., Srimaroeng, C., Chatsudthipong, L., & Chatsudthipong, V. (2014). Impaired insulin signaling affects renal organic anion transporter 3 (Oat3) function in streptozotocin-induced diabetic rats. In *PLoS ONE* (Vol. 9, Issue 5). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096236>
- McElwain, C. J., McCarthy, F. P., & McCarthy, C. M. (2021). Gestational diabetes mellitus and maternal immune dysregulation: What we know so far. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/ijms22084261>
- McIntyre, H. D., Catalano, P., Zhang, C., Desoye, G., Mathiesen, E. R., & Damm, P. (2019). Gestational diabetes mellitus. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 5, Issue 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0098-8>
- Nguyen-Ngo, C., Jayabalan, N., Salomon, C., & Lappas, M. (2019). Molecular pathways disrupted by gestational diabetes mellitus. *Journal of Molecular Endocrinology*, 63(3), R51–R72. <https://doi.org/10.1530/JME-18-0274>
- Pardo, F., Subiabre, M., Fuentes, G., Toledo, F., Silva, L., Villalobos-Labra, R., & Sobrevia, L. (2019). Altered foetoplacental vascular endothelial signalling to insulin in diabetes. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 66, pp. 40–48). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.02.003>

- Pérez-Pérez, A., Vilariño-García, T., Guadix, P., Dueñas, J. L., & Sánchez-Margalet, V. (2020). Leptin and nutrition in gestational diabetes. *Nutrients*, *12*(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu12071970>
- Pretorius, M., & Huang, C. (2022). Beta-Cell Adaptation to Pregnancy – Role of Calcium Dynamics. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.853876>
- Rachdaoui, N. (2020). Insulin: The friend and the foe in the development of type 2 diabetes mellitus. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 5, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/IJMS21051770>
- Rodrigo, N., & Glastras, S. (2018). The Emerging Role of Biomarkers in the Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Medicine*, *7*(6), 120. <https://doi.org/10.3390/jcm7060120>
- Ryan, A. S. (2018). Inflammatory Markers in Older Women with a History of Gestational Diabetes and the Effects of Weight Loss. *Journal of Diabetes Research*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5172091>
- Samra, N. A., Jelinek, H. F., Alsafar, H., Asghar, F., Seoud, M., Hussein, S. M., Mubarak, H. M., Anwar, S., Memon, M., Afify, N., Manzoor, R., Al-Homedi, Z., & Osman, W. (2022). Genomics and Epigenomics of Gestational Diabetes Mellitus: Understanding the Molecular Pathways of the Disease Pathogenesis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23073514>
- Schmitz-Peiffer, C., & Whitehead, J. P. (2003). IRS-1 Regulation in Health and Disease. In *IUBMB Life* (Vol. 55, Issue 7, pp. 367–374). <https://doi.org/10.1080/1521654031000138569>
- Sharma, S., Banerjee, S., Krueger, P. M., & Blois, S. M. (2022). Immunobiology of Gestational Diabetes Mellitus in Post-Medawar Era. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.758267>
- Siddiqui, S., Waghdhare, S., Jha, S., & Dubey, S. (2019). Role of immunological markers in gestational diabetes mellitus-a brief review. In *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* (Vol. 13, Issue 5, pp. 2983–2985). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.07.018>

- Stern, C., Schwarz, S., Moser, G., Cvitic, S., Jantscher-Krenn, E., Gauster, M., & Hiden, U. (2021). Placental endocrine activity: Adaptation and disruption of maternal glucose metabolism in pregnancy and the influence of fetal sex. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222312722>
- Succurro, E., Fraticelli, F., Franzago, M., Fiorentino, T. V., Andreozzi, F., Vitacolonna, E., & Sesti, G. (2021). Hyperglycemia at 1h-OGTT in Pregnancy: A Reliable Predictor of Metabolic Outcomes? In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.612829>
- Sweeting, A., Wong, J., Murphy, H. R., & Ross, G. P. (2022). A Clinical Update on Gestational Diabetes Mellitus. *Endocrine Reviews*, 43(5), 763–793. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnac003>
- Świątkowska-Stodulska, R., Berlińska, A., Stefańska, K., Zieliński, M., Kwiatkowski, S., Połom, J., Andrysiak-Mamos, E., Wydra, P., & Sworczak, K. (2022). Endocrine Autoimmunity in Pregnancy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.907561>
- Vejrazkova, D., Vcelak, J., Vankova, M., Lukasova, P., Bradnova, O., Halkova, T., Kancheva, R., & Bendlova, B. (2014). Steroids and insulin resistance in pregnancy. In *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 139, pp. 122–129). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.11.007>
- Wu, W., Tan, Q.-Y., Xi, F.-F., Ruan, Y., Wang, J., Luo, Q., Dou, X.-B., & Hu, T.-X. (2021). NLRP3 inflammasome activation in gestational diabetes mellitus placentas is associated with hydrogen sulfide synthetase deficiency. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23(1). <https://doi.org/10.3892/etm.2021.11017>
- Xiao, J., Li, J., Cai, L., Chakrabarti, S., & Li, X. (2014). Cytokines and diabetes research. In *Journal of Diabetes Research* (Vol. 2014). <https://doi.org/10.1155/2014/920613>
- Yaribeygi, H., Sathyapalan, T., Atkin, S. L., & Sahebkar, A. (2020). Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8609213>

- Zatterale, F., Longo, M., Naderi, J., Raciti, G. A., Desiderio, A., Miele, C., & Beguinot, F. (2020). Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01607>
- Zhang, Y., Zhang, Y., Zhao, L., Shang, Y., He, D., & Chen, J. (2021). Distribution of complete blood count constituents in gestational diabetes mellitus. *Medicine*, *100*(23), e26301. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000026301>

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi

ADÜ Evrak Tarih ve Sayısı: 17.03.2021-16928



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-53043469-050.04.04-16928
Konu : Kararlar

Sayın Prof.Dr. Abdullah YALÇIN
Anabilim Dalı Başkanı

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 11.03.2021 tarihinde yapılan olağan toplantısında çalışmansızla ilgili alınan 4 nolu karar aşağıda sunulmuştur.
Bilgilerinize sunarım.

KARAR 4

Protokol No: 2021/57

Sorumlu Yürütücü: Prof. Dr. Abdullah YALÇIN
Tıbbi Biyoloji AD

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Prof. Dr. Abdullah YALÇIN'ın "**Gestasyonel Diyabette Plasenta Dokularında İnsülin Direnci ve İnflamasyonun Belirlenmesi**" konulu yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde (ADÜBAP başvuru onay belgesi ile kurum izin onay belgesinin alınıp dosyaya konulmak üzere gelmeleri şartıyla) gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Yine sorumlu araştırmacıya; Form 2'nin 14.1.'in son bölümünde tsahhüt edilen çalışma bittikten sonra nihai raporun, [Sonuç Raporu (web'te), BGOF (Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu-gönüllüler tarafından bizzat kendilerinin kendi adı-soyadını yazması ve imzalamasının sağlanması ile adreslerinin eksiksiz olarak formlara yazılmasına dikkat edilmelidir.) ve ORF (Olgu Rapor Formu/Anket)] gönderilmesi gerektiğinin hatırlatılmasına ve sorumlu yürütücülerinin bu hususa özen göstermesi gerektiğinin bir kez daha vurgulanmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Prof.Dr. Hatice ERTABAKLAR
Kurul Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : BSDKFZ6RKKU Pin Kodu :50303
Adres:ADÜ Merkez Kampüsü Aytepe Mevkii 09100 Efeler/AYDIN
Telefon:0256 225 31 66 / 4224 / 4225 Faks:0256 212 31 69
e-Posta:goetik@adu.edu.tr Web:akademik.adu.edu.tr/fakultelmedf
Kep Adresi:adunmenderesuniversitesi@hs01.kep.tr

Belge Takip Adresi : <https://obysy.adu.edu.tr/en/Visyon/Dogrula/BSDKFZ6RKKU>

Bilgi için: Necla Yıldız
Ünvanı: Memur



Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Gestasyonel Diyabette Plasenta Dokularında İnsülin Direnci ve İnflamasyonun Belirlenmesi” 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 eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

.....
Öğrencinin Adı ve Soyadı

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : BAYRAK, Elif
Uyruk . : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Sivas / 18.08.1995
Telefon : 0 544 974 35 65
E-posta : elfbyrakk@gmail.com
Yabancı dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	2022
Lisans	Çanakkale 18 Mart Üniversitesi	2019

BURSLAR VE ÖDÜLLER

Tübitak 1001 proje bursu