

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

DIYABETİK SIÇANLARIN PLASENTAL GELİŞİMİNDE ADİPONEKTİNİN ROLÜ

Zeynep AVCİL

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2014

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

DIYABETİK SIÇANLARIN PLASENTAL GELİŞİMİNDE ADİPONEKTİNİN ROLÜ

Zeynep AVCİL

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2012.02.0122.006)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2014

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.
03.01.2014

Tez Danışmanı

: Doç. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye

: Prof. Dr. Tomris ÖZBEN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye

: Prof. Dr. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye

: Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye

: Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukardaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/....../2014 tarih ve/.... Sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Plasenta gebelik süresince maternal ve fetal sirkülasyon arasında bir bariyer olarak görev yapan, fetus gelişimi ve büyümesinde önemli rol oynayan bir organdır. Sağlıklı bir gebelik, normal plasenta gelişimine bağlıdır. Gebelik esnasında fetal gelişim, plasental gelişim ve anne sağlığı için birçok fizyolojik, immünolojik ve metabolik adaptasyonlar gerekmektedir. Plasentanın gelişimi, gebeliğin devamı için önemli kriterlerden bir tanesidir. Yeterli plasental gelişimin olmadığı durumlarda diyabet, intrauterin büyüme geriliği ve preeklampsi gibi klinik komplikasyonlar gelişebilir.

Anti-diyabetik etkilere sahip olan adiponektinin plasental gelişime etkisi hakkında bilinenler sınırlıdır. Bu çalışmada, normal ve streptozocin (STZ) ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda adiponektin ve plasental gelişim arasındaki ilişki araştırıldı. Kontrol ve diyabet gruplarının plasenta ve embriyo ağırlıkları karşılaştırıldığında, diyabet grubuna ait plasentaların gebeliğin 18. gününden itibaren kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha büyük olduğu gözlemlendi. Kontrol ve diyabet grubuna ait embriyo ağırlıkları değerlendirildiğinde ise, 14, 18 ve 20. günde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlemlendi.

Adiponektin ve reseptörleri olan AdipoR1 ve AdipoR2'nin ekspresyonları protein ve gen düzeyinde değerlendirildi. Adiponektin proteininde, gebeliğin 16, 18 ve 20. günlerinde diyabet grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma tespit edildi. Maternal adiponektin serum düzeyleri de araştırıldı ve diyabet grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. AdipoR1 ekspresyonlarında önemli bir değişim gözlenmezken, AdipoR2 ekspresyonunda gebeliğin 14, 18 ve 20. gününde diyabet grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi.

Diyabette ve plasental gelişimde adiponektinin etkilerini daha ayrıntılı olarak ortaya çıkarmak için, adiponektin etki mekanizmasında rol oynayan PPAR α , PPAR γ ve RXR α 'nın protein ve mRNA düzeyleri ile PPAR sinyalizasyonunda etkili olan p38-MAPK'ın protein düzeyleri de araştırıldı.

Bulgularımıza göre, gebelik ve diyabet adiponektin ile ilişkilidir. Diyabette, gebelik günleri arttıkça adiponektin miktarında azalma saptandı. Adiponektindeki azalmaya bağlı olarak adiponektin sinyal yolağında yer alan PPAR α , PPAR γ ve RXR α 'da azalmalar belirlendi. p38 MAPK fosforilasyonunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Diyabette gözlenen plasental gelişim anormalliklerinde adiponektinin önemli bir role sahip olduğu kanısındayız.

Anahtar kelimeler: Diyabet, Plasenta, Adiponektin, AdipoR1, AdipoR2, PPAR α , PPAR γ , RXR α , p38 MAPK

ABSTRACT

Placenta is an organ which acts as a barrier between maternal and fetal circulation during pregnancy and plays an important role in fetal development and growth. A healthy pregnancy is closely associated with normal placental development. Many physiological, immunological and metabolic adaptations are necessary for healthy placental/fetal development and maternal health. Placental development is one of the important criteria during pregnancy. Inadequate placental development may cause clinical complications such as intrauterine growth retardation, preeclampsia and diabetes.

There is limited data about placental expression of adiponectin, which has anti-diabetic effects. In this study, relationship between adiponectin and placental development was studied in normal and streptozotocine (STZ) induced diabetic rats. Diabetic rat placentas were bigger than control placentas at gestational day 18 and 20 and diabetic embryos were smaller than control group at gestational day 14, 18 and 20. Results were statistically significant.

Adiponectin and its receptors AdipoR1 and AdipoR2 expression were evaluated at mRNA and protein level. Adiponectin expression was significantly decreased at gestational day 16, 18 and 20 in diabetic group placentas. Maternal serum adiponectin levels were also evaluated and a significant decrease was observed in diabetic group blood sera. AdipoR1 expression was similar between groups, on the other hand AdipoR2 expression was significantly decreased at gestational day 14, 18 and 20 in diabetic group placentas.

In order to explain the effects of Adiponectin on placental development and in diabetic conditions in detail, PPARalpha, PPARgamma, RXRalpha (play roles in Adiponectin mechanisms) and p38 MAPK expression (play roles in PPAR signalization) levels were investigated.

According to our results, pregnancy and diabetes is associated with adiponectin. A decrease in adiponectin level was determined in diabetes towards term. Depending on the decrease of adiponectin level, it was observed that PPARalpha, PPARgamma, RXRalpha (downstream molecules of adiponectin) expression levels were also decreased. Besides, a significant increase was observed in p38 MAPK phosphorylation. In conclusion, we are of opinion that adiponectin has an important role in placental development abnormalities in diabetic conditions.

Key Words: Diabetes, Placenta, Adiponectin, AdipoR1, AdipoR2, PPARalpha, PPAR γ , RXRalpha, p38 MAPK

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez projemin gerçekleştirilmesi sürecinde göstermiş oldukları tüm maddi ve manevi destek için danışman hocam sayın Doç. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN'a

Bu süreçte göstermiş oldukları yardımlar için Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

Tezimin deneysel olarak gerçekleştirilmesinde görüş ve önerileri ile yardımcı olan Gözde ÜNEK ve Aslı ÖZMEN'e

Çalışmam süresince her an yardımlarını esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm çalışanlarına,

Son olarak, bana her zaman sonsuz anlayış ve sabırla destek olan, eğitim yaşamım boyunca hep arkamda hissettiğim sevgili anneme, babama ve kardeşlerime en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	IV
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XVI
GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Plasenta	4
2.1. 1. Plasentanın Fonksiyonları	4
2.1. 2. Canlılarda Gözlenen Plasenta Çeşitleri	5
2.1. 3. Villus Ağacının Temel Yapısı	7
2.1.4. Sıçan Plasentasının Gelişimi	8
2.1.5. İnsan ve Sıçan Plasentası Arasındaki Farklar ve Benzerlikler	9
2.2.6. Plasentadan Besin Transportu	10

2.1.7.	Maternofetal Glukoz Transportu	12
2.1.8.	Maternofetal Yağ Asidi Transportu	13
2.2.	Diyabetes Mellitus	13
2.2.1.	Tip1 Diyabetes Mellitus	14
2.2.2.	Tip2 Diyabetes Mellitus	14
2.2.3.	Gestasyonal Diyabet	16
2.3.	Adiponektin ve Adipoz doku	17
2.1.1.	Adiponektin	18
2.3.2.	Adiponektinin Yapısı	18
2.3.3.	Adiponektinin Post-translasyonel Modifikasyonları	20
2.3.4.	Adiponektin Reseptörleri	21
2.3.5.	Adiponektin ve Diyabet	22
2.3.5.1.	Adiponektinin İnsülin Duyarlaştırıcı Etkisi	24
2.4.	Adiponektin Sinyalizasyonu	25
2.4.1.	MAPK (Mitojenin Aktifleştirdiği Protein Kinazlar) Yolağı	25
2.4.1. 1	p38 MAPK	27
2.4.2.	PPAR	28
2.4.2.1.	PPAR'ların Yapısı	29
2.4.2.2.	PPAR'ların Aktivasyonlarının Düzenlenmesi	30
2.4.2.3.	PPAR α	31
2.4.2.4.	PPAR γ	33
GEREÇ VE YÖNTEM		37
3.1.	Materyaller	37
3.2.	Denekler	37

3.3.	Diyabet Modelinin Oluşturulması	38
3.4.	Doku Temini ve Hazırlanması	38
3.5.	Western Blot	38
3.5.1.	Kullanılan Solüsyonlar	38
3.6.	Deneyin Yapılışı	40
3.7.	Geri ("Revers") Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	41
3.7.1	DNaz-muamelesi	41
3.7.2.	cDNA Sentezi	41
3.7.3.	PCR	42
3.7.4.	Agaroz Jel Elektroforezi	43
3.7.4.1.	Kullanılan Solüsyonlar	43
3.7.4.2.	Deneyin Yapılışı	43
3.8.	Serum Adiponektin Düzeyinin Ölçülmesi	43
3.9.	İstatistiksel Analizler	44
BULGULAR		45
4.1.	Plasenta Ağırlıkları	45
4.2.	Embriyo Ağırlıkları	46
4.3.	Western Blot Bulguları	47
4.3.1.	Adiponektin Protein Ekspresyonu	47
4.3.2.	AdipoR1 Protein Ekspresyonu	48
4.3.3.	AdipoR2 Protein Ekspresyonu	49
4.3.4.	PPAR α Protein Ekspresyonu	50
4.3.5.	PPAR γ Protein Ekspresyonu	51
4.3.6.	RXR α Protein Ekspresyonu	52
4.3.7.	p38 MAPK Fosforilasyonu	53

4.4.	PCR Bulguları	54
4.4.1.	Adiponektin mRNA ekspresyonu	54
4.4.2.	AdipoR1 mRNA ekspresyonu	56
4.4.3.	AdipoR2 mRNA ekspresyonu	57
4.4.4.	PPARα mRNA ekspresyonu	58
4.4.5.	PPARγ mRNA ekspresyonu	59
4.4.6.	RXRα mRNA ekspresyonu	60
4.5.	Serum Adiponektin ELISA Sonuçları	60
TARTIŞMA		62
SONUÇLAR		67
KAYNAKLAR		68
ÖZGEÇMİŞ		79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AF1	:	Aktivasyon Fonksiyon 1
AF2	:	Aktivasyon Fonksiyon 2
AMPK	:	AMP-aktif protein kinaz
BMI	:	Vücut Kitle İndeksi
DBD	:	DNA Bağlayıcı Bölge
DM	:	Diyabetes Mellitus
ERp44	:	Endoplazmik Retikulum Protein 44
ErO1- Lα	:	Endoplazmik Retikulum Oksidoredüktaz 1- L α
ERK1/2	:	Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz1/2
GDM	:	Gestasyonel Diyabetes Mellitus
gAD	:	Globüler Adiponektin
fAD	:	Tam Uzunluktaki Adiponektin
GLUT	:	Glukoz Taşıyıcı Protein
GSK3α	:	Glikojen Sentaz Kinaz 3 α
HDL	:	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HLA	:	İnsan Lökosit Antijeni
IDDM	:	İnsüline-Bağımlı Diyabetes Mellitus
IRS-1	:	İnsülin Reseptör Substrat-1
LBD	:	Ligand Bağlayıcı Bölge
MAPK	:	Mitojen Aktive Protein Kinaz
MEK1	:	MAP Kinaz/ERK Kinaz 1
MESCs	:	Mezenkimal Kök Hücreleri
MHC	:	Major Histokompatibilite Kompleksi
NFκB	:	Nükleer Faktör κ B
NIDDM	:	İnsülin Bağımlı Olmayan Diyabetes Mellitus
PPAR	:	Peroksizom Proliferator-Aktive Reseptör
PPARα	:	Peroksizom Proliferator-Aktive Reseptör α
PPARγ	:	Peroksizom Proliferator-Aktive Reseptör γ

PPREs	:	PPAR Yanıt Elementleri
PI3K	:	Fosfatidilinozitol-3-Kinaz
PIP2	:	Fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat
PIP3	:	Fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat
p38-MAPK	:	p38-Mitojen Aktive Protein Kinaz
RXRα	:	Retinoid X Reseptör α
STZ	:	Streptozosin
Tip 1 Diyabet :		Tip 1 Diyabetes Mellitus
Tip 2 Diyabet:		Tip 2 Diyabetes Mellitus
TG	:	Trigliserid
TNF-α	:	Tümör nekrozis faktör- α
TZD	:	Tiazolidinedion

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1. Term plasentada maternal ve fetal kısımlar	4
2. Plasentada, maternal ve fetal kan komponentleri koryonik villus yüzeyi aracılığı ile temas kurar fakat maternal ve fetal kan asla karışmaz	5
3. Maternofetal bariyere göre plasenta tiplerinin sınıflandırılması	7
4. 7. ve 28. haftada plasental villus yapısı	8
5. Sıçan plasentasının gelişimi	9
6. İnsan ve sıçan plasenta yapısının karşılaştırılması	10
7. Sinsisyotrofoblast	11
8. Plasentanın fonksiyonunu düzenleyen faktörler	12
9. Adipoz dokudan sekrete edilen ürünlerin ana fizyolojik fonksiyonları	18
10. Adiponektinin yapısı ve izoformları.	19
11. Adiponektinin sentezi, sekresyonu ve sirkülasyonunun düzenlenmesi.	20
12. Adiponektin reseptörlerinin yapısı	21
13. AdipoR1 ve AdipoR2 reseptörleri aracılığı ile adiponektin sinyal iletimi	22
14. İnsülin direnci, metabolik sendrom ve aterosklerozda adiponektinin etkisi	24
15. MAPK sinyal yolağının aktivasyonu	26
16. MAPK sinyal yolağı	27
17. PPAR'ların yapısı	29
18. PPAR-RXR heterodimeri	29
19. PPAR'ların gen transkripsiyonu	30

20.	PPAR γ 'nin tiazolidinedion (TZD) ailesindeki ligandları	33
21.	TZD'ler, PPAR γ ve adiponektin arasındaki ilişki	35
22.	Adiponektinin posttranslasyonel modifikasyonunda ERp-44 ve Ero1-L α molekülleri	36
23.	Sıçan adiponektin standart eğrisi	44
24.	Gebeliğin 14-20. Günleri arası kontrol ve diyabet grubuna ait plasenta ağırlıkları	45
25.	Gebeliğin 14-20. Günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait embriyo ağırlıkları	46
26.	Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait adiponektin protein ekspresyonları	48
27.	Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait AdipoR1 protein ekspresyonları	49
28.	Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait AdipoR2 protein ekspresyonları	50
29.	Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait PPAR α protein ekspresyonları	51
30.	Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait PPAR γ protein ekspresyonları	52
31.	Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait RXR α protein ekspresyonları	53
32.	Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait fosfo-p38 MAPK ve p38 MAPK protein ekspresyonları	54
33.	Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait adiponektin mRNA düzeyleri	55
34.	Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait AdipoR1 mRNA düzeyleri	56
35.	Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait AdipoR2 mRNA düzeyleri	57
36.	Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait PPAR α mRNA düzeyleri	58

37.	Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait PPAR γ mRNA düzeyleri	59
38.	Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait RXR α mRNA düzeyleri	60
39.	Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait serum Adiponektin düzeyi	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo	Sayfa
1. Western blotta kullanılan SDS-poliakrilamid jeller ve ayırma jeli	40
2. RT-PCR deneyi için kullanılan oligonükleotid primerler	42
3. 14-20. günler arası gruplara ait plasenta ağırlıkları (ortalama $\pm$ standart hata, p değeri)	46
4. 14-20. günler arası gruplara ait embriyo ağırlıkları (ortalama $\pm$ standart Hata, p değeri)	47
5. Gebeliğin 14-20. günler arası gruplara ait serum Adiponektin düzeyleri (Ortalama $\pm$ Standart Hata, p değerleri)	61

GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Adipoz doku enerji homeostazını düzenleyen önemli bir endokrin organdır ve serbest yağ asitleri, adipisin, leptin, resistin, TNF- α ve adiponektin gibi biyolojik olarak aktif birçok ürünün sekresyonunu gerçekleştirir [1]. Adiponektin, glukoz ve lipid metabolizmasındaki rolünden dolayı büyük ilgi görmektedir [1, 2]. Başlangıçta adiponektinin sadece adipoz dokuda üretildiği düşünülmeye rağmen yapılan son çalışmalarda adiponektinin osteoblastlar, parankim hücreleri, miyositler, epiteliyal hücreler ve plasenta gibi diğer dokularda da mRNA ve protein düzeyinde eksprese edildiği gösterilmiştir [3, 4]. Adiponektin, yapısında 247 amino asit ve dört bölge içeren bir proteindir. Bunlar; aminoterminal sinyal sekansı, değişken bölge, kollajen bölge ve karboksil terminal globüler bölgedir [1, 5]. Adiponektin yapısal olarak kompleman 1q ailesine benzerdir [1, 5-7] ve plazmada LMW (düşük moleküler ağırlıklı), MMW (orta moleküler ağırlıklı) ve HMW (yüksek moleküler ağırlıklı) olmak üzere üç oligomerik formda bulunur [5, 8, 9].

Yapılan çalışmalar HMW formunun adiponektinin en aktif formu olduğunu ve insülin duyarlılığında önemli rolü olduğunu göstermektedir [10]. Plazma adiponektin seviyesinin obez/diyabetik fareler ve insanlarda azaldığı rapor edilmektedir [2, 11]. Birçok çalışma adiponektin konsantrasyonu ve insülin duyarlılığı arasında bir ilişkinin olduğunu ortaya koymaktadır [1, 5, 7, 12, 13]. Genom analizleri, 3q27 kromozomal bölgenin tip 2 diyabet ile bağlantılı olduğunu ve bu bölgenin aynı zamanda adiponektin genini de içerdiğini göstermektedir. Bundan dolayı adiponektinin tip 2 diyabet patolojisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir [2, 14].

Gebelik, anne ve fetus arasında fonksiyonel ve anatomik etkileşimlerin gerçekleştiği kompleks bir süreçtir. Plasantanın gelişimi, gebeliğin devamı için önemli kriterlerden bir tanesidir. Yeterli plasental gelişimin olmadığı durumlarda diyabet, intrauterin büyüme geriliği ve preeklampsi gibi klinik komplikasyonlar gelişebilir [15]. Gebelikte görülen diyabet ilerleyen zamanda hem annede hem de çocukta Tip 2 diyabet oluşma riskini artırır [16].

Normal gebelik sürecinde pankreasın beta hücreleri vücudun ihtiyacı olan insülini kompanse ederek insülin direncini önleyebilir. Diyabetik durumda ise meydana gelen insülin direncine, maternal adipositlerin artması ve plasentadan insülin duyarlılığını azaltan hormonların salgılanması neden olabilir [17]. Diyabette

temel olarak hiperglisemi, hiperlipidemi, hiperinsülinemi ve fetoplasental endotelial disfonksiyon durumları gözlenmektedir [18].

Adiponektinin anti-diyabetik, anti-aterosklerotik ve anti-inflamatuar etkilerini adenozin monofosfat-aktif protein kinaz (AMPK), p38-mitojen aktif protein kinaz (MAPK), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve peroksizom proliferator-aktif reseptör (PPAR) gibi çok sayıda sinyal molekülünü aktive ederek gerçekleştirir. Bu sinyallerin aktivasyonu da, adiponektin reseptörleri aracılığı ile meydana gelir. Adiponektinin, adiponektin reseptör (AdipoR) 1 ve 2 olarak bilinen yapısal olarak ilişkili iki adet transmembran reseptörü bulunmaktadır [3, 5, 19].

PPAR'lar nükleer reseptör ailesine ait ligandla aktive olan transkripsiyon faktörleridirler [20-22]. PPAR α , PPAR δ ve PPAR γ olmak üzere üç PPAR izotipi mevcuttur. Bu üç izotip yüksek derecede homolojiye sahip olmalarına rağmen, doku dağılımı ve ligand spesifikliğı açısından farklılık gösterirler. Nükleusta PPAR'lar RXR α ile heterodimer oluşturarak birçok genin transkripsiyonunu regüle eder [23].

PPAR α özellikle yağ asidi metabolizması ve inflamasyonda rol oynamaktadır [23]. Beslenme (yağlı diyetler), genetik faktörler ya da lipotrofik nedenlerden dolayı oluşan insülin direnci durumlarında PPAR α 'nın aktive olması insülin duyarlılığının artması ile sonuçlanmaktadır [24, 25]. Yapılan çalışmalarda adiponektinin ekspresyonunun artmasının PPAR α 'nın CD36, açıl-koenzim A oksidaz gibi hedef genlerinin transkripsiyonunun artması ile sonuçlandığı rapor edilmektedir. Bundan dolayı adiponektinin PPAR α aracılığı ile trigliserid miktarını azalttığı düşünülmektedir [2]. PPAR γ temel olarak adiposit farklılaşması ve glukoz metabolizmasında yer alır. PPAR γ lipid sentezi ve lipid depolanmasını içeren adiposite özgü genlerin, insülin sinyalizasyonunda yer alan genlerin ve adipokin sekresyonunda rol alan birçok genin transkripsiyonal aktivatörü olarak davranmaktadır [22, 26]. Ayrıca PPAR γ genel enerji metabolizmasında ve insülin fonksiyonunda etkilidir ve bundan dolayı PPAR γ insülin duyarlılığı, glukoz ve yağ asidi alımı ile ilişkilendirilmektedir. Bu amaçla PPAR γ agonisti olan tiazolidinedion (TZD) tip 2 diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [23]. TZD, tip 2 diyabet ile ilişkili olan insülin direnci tedavisinde kullanılmaktadır. PPAR γ insülin duyarlaştırıcı etkisi olan tiazolidinedion'lerin hedefleri olarak tanımlanmaktadır [26, 27].

Özet olarak; son zamanlarda yapılan çalışmalar leptin, resistin ve adiponektin gibi yeni potansiyel insülin medyatörleri üzerinde durmaktadır. Fakat bunların gestasyonel dokulardaki ekspresyonları ve diyabet ile ilişkileri üzerine yapılan çalışmalar çok az olduğu için bu konuda bilgilerimiz kısıtlıdır. Bu çalışmada diyabetik sıçanların plasentalarında adiponektin ve reseptörlerinin protein ve gen düzeyinde ekspresyonları değerlendirildi. Adiponektin antidiyabetik, antiaterojenik ve anti-inflamatuar fonksiyonlarını adiponektin sinyal yolağında bulunan

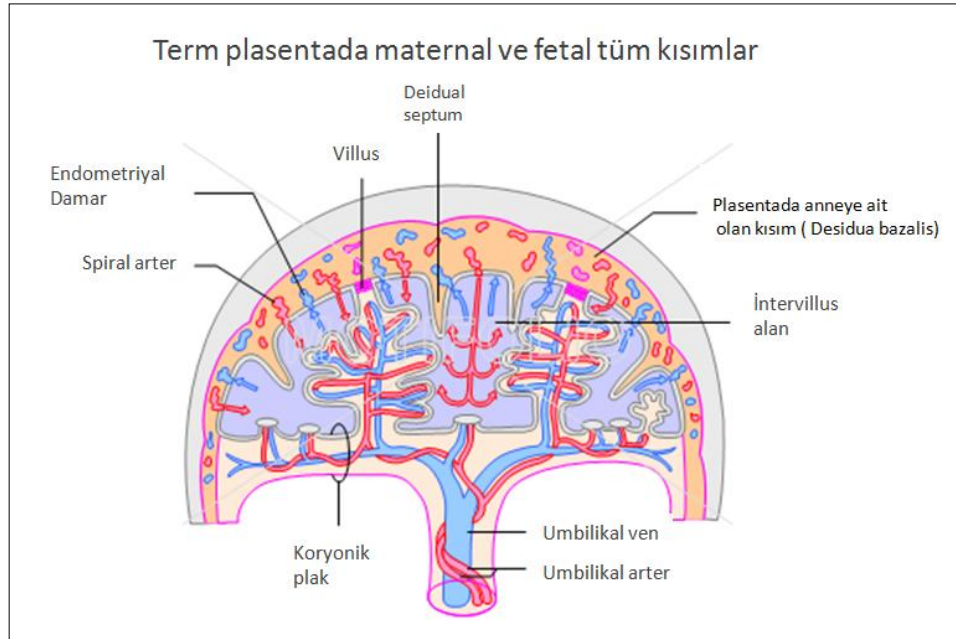
molekülleri etkileyerek gerçekleştirmektedir. PPAR   ve p38 MAPK bu sinyal yolağında adiponektin fonksiyonuna eşlik etmektedir. Bundan dolayı çalışmamızda diyabette önemli biomarkerlar olarak kullanılabileceğini ve adiponektinin biyolojik fonksiyonunu daha iyi anlayabilmemize yardımcı olacağını d    nd  ğ  m  z için PPAR  , PPAR  , RXR   ve p38 MAPK ekspresyonlarını değ  rlendirip tüm bu parametrelerin diyabette plasental gelişim ile ilişkisini araştırdık.

GENEL BİLGİLER

2.1. Plasenta

Plasenta blastosist implantasyonu ile gelişmeye başlayan, gebelik süresince maternal ve fetal sirkülasyonu arasında bir bariyer olarak etki eden, fetus gelişimi ve büyümesinde önemli rol oynayan ve doğum ile birlikte görevini tamamlayan materno-fetal bir organdır [28].

Plasenta koryon kesesinden gelişen fetal kısım ve endometriyumdan köken alan maternal kısımlardan oluşur (Şekil 1). Fetal kısım koryonik plak ve bu plağa bağlı villuslardan meydana gelmektedir. Maternal kısım ise bazal plak ve plasental septumdan oluşur. Maternal kısım; ekstravillöz trofoblast, desidual stromal hücreler, doğal öldürücü (NK) hücreler gibi maternal immün hücreler ve yoğun olarak ekstrasellüler matriks ve fibrinoid içermektedir [29].



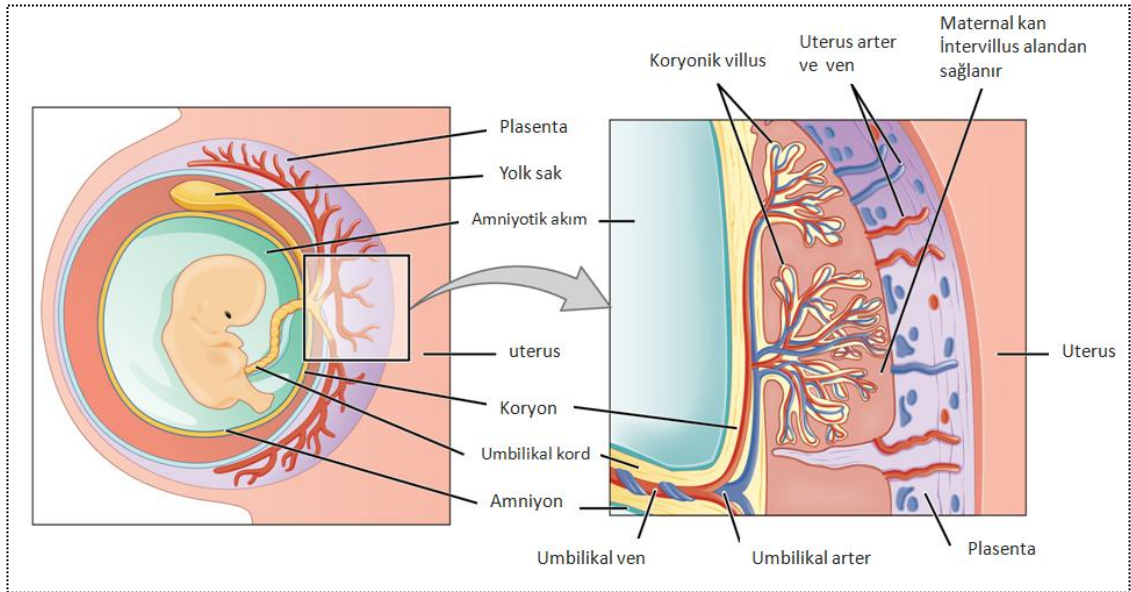
Şekil 1. Term plasentada maternal ve fetal kısımlar [30]

2.1.1. Plasentanın Fonksiyonları

Plasenta fetüsün yaşamı ve gelişimi için vazgeçilmez fonksiyonlara sahiptir. Plasenta çeşitli hormonları sentezlemenin yanı sıra maternal besin ve oksijenin anneye ulaşmasında ve metabolik atıkların uzaklaştırılmasında rol oynamaktadır [31, 32]. Plasentanın başlıca fonksiyonları şu şekilde özetlenebilir;

- I. Gelişim süresince fetüse oksijen sağlamak ve karbondioksidi uzaklaştırarak fetal solunumda görev almak.
- II. Maternal glukoz (fetüsün temel enerji kaynağı, kolaylaştırılmış difüzyon ile transportu gerçekleşir), aminoasit, yağ asidi, mineral ve vitaminlerin difüzyonuna aracılık etmek.
- III. Gebeliğin devamı için gerekli endokrin elemanları salgılamak (Plasentadan sentezlenen hormonlar: insan koryonik gonadotropin (hCG), insan plasental laktojen (hPL), insan koryonik tirotropin (hCT), insan koryonik somatomammotropin (hCS), insan koryonik adreno-kortikotropin (hCACTH), progesteron ve östrojen.
- IV. Birçok immünolojik görevi gerçekleştirmek (NK hücreleri ve diğer lökositler aracılığıyla).
- V. Fetüsün gelişimi için uygun ortam koşullarını sağlamak.

Gebeliğin devamı ve normal fetus gelişiminin olabilmesi bu işlevlerin gerçekleştirilmesine bağlıdır [33, 34]. Plasentanın en önemli fonksiyonlarından bir tanesi fetus ve anne arasında besin transferini ve atıkların uzaklaştırılmasını sağlamaktır. Bu işlem esnasında anne ve fetus kanı karışmaz sadece yakın temasta bulunur (Şekil 2).



Şekil 2. Plasentada, maternal ve fetal kan komponentleri koryonik villus yüzeyi aracılığı ile temas kurar fakat maternal ve fetal kan asla karışmaz [35].

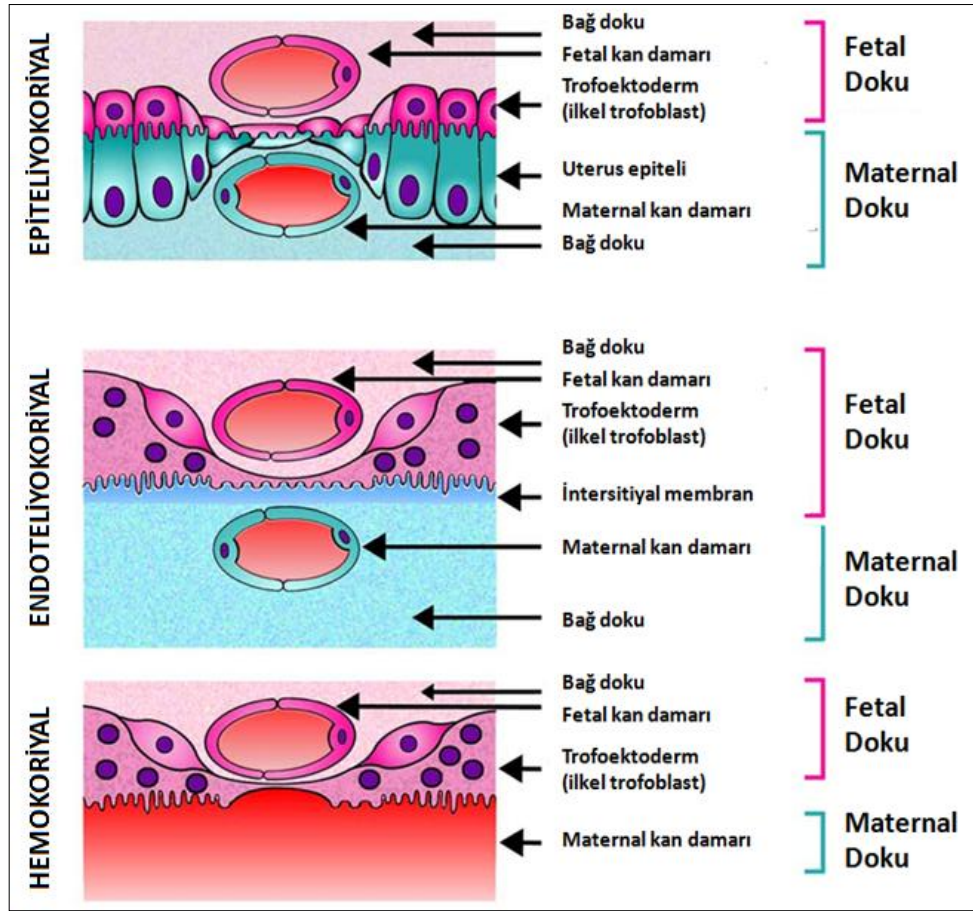
2.1.2. Canlılarda Gözlenen Placenta Çeşitleri

Gebelik sürecinde birçok görevi üstlenen placenta, türler arasında farklılıklar göstermektedir. Maternal ve fetal dolaşımları birbirinden ayıran materno-

fetal/plasental bariyeri oluşturan hücelere göre plasenta 3 sınıfa ayrılabilir I.Epiteliyokoryal, II. Endoteliyokoryal ve III. Hemokoryal [36].

- I. Epiteliyokoryal tip plasentada, endometriyum blastosist tarafından işgal edilmez. Blastosist sadece endometriyuma tutunur, trofoblast hücreleri uterus epiteli ile direkt etkişime geçer. Koyun ve keçilerde bu tip plasenta görülür.
- II. Daha derin invazyonda blastosist uterus epitelinin ve endometriyumu aşındırır. Fetal ve maternal endotel hücreleri sadece trofoblast hücreleri ile birbirinden ayrılır. Bu durumda endoteliyokoryal tip plasenta gelişir. Endoteliyokoryal plasenta tüm karnivorlarda ve bazı insektivorlarda gözlenir.
- III. Hemokoryal plasenta tipinde koryon kanla temastadır. Maternal kan duvarları invaziv trofoblastlar tarafından tahrip edilmiştir. Trofoblastik yüzeyler direkt olarak anne kanı ile temastadır. İnsan ve Sıçan plasentasını örnek verilebilir. Primatlarda ve kemirgenlerde görülen hemokoryal tip plasentadır (Şekil 3) [36-38].

Endometriyuma tutunup invaziv olan trofoblastlar, daha sonra maternal dokuya bakan komşu trofoblastlarla birlikte füzyona uğrayarak sinsisyotrofoblastlara dönüşür. Bu füzyon sırasında sinsisyotrofoblastlar bölünme özelliğini kaybeder. Sinsisyotrofoblastların altında kalan ve maternal doku ile temas edemeyen kısım ise sitotrofoblastlar olarak adlandırılır [36].



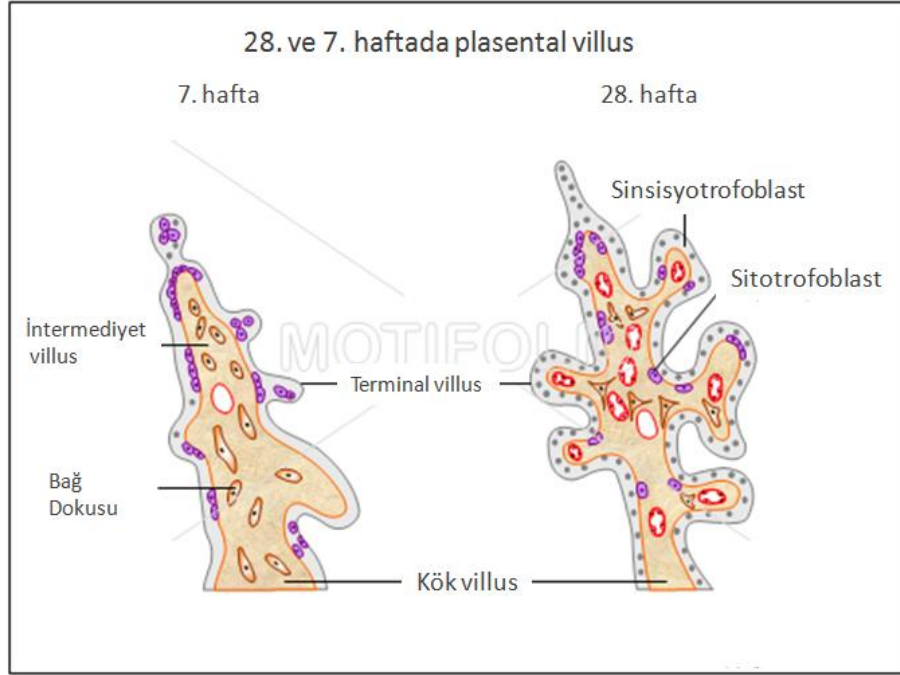
Şekil 3. Maternofetal bariyere göre plasenta tiplerinin sınıflandırılması. Plasenta invaziv olma ve maternal kan akımına ulaşım özelliklerine göre türler arasında çeşitlilik gösterir. Epiteliyokoriyal plasentalar en az invaziv olan plasenta türüdür ve üç tane maternal doku tabakası ile fetus anne kanından ayrılır. Endoteliyokoriyal plasentalar kısmen invaziv olma özelliğine sahiptirler. Sadece anne kan damarına ait endotel ve bazı intersitiyal dokular fetusu maternal kandan ayırır. Hemokoriyal plasentalar en invaziv olan plasenta çeşididir. Fetal dokular direk olarak anne kanına temas eder [38].

2.1.3. Villus Ağacının Temel Yapısı

Plasentalın birçok metabolik ve endokrin aktivitesi plasenta villuslarında gerçekleşir. Plasental gelişim süresince yapısal ve fonksiyonel olarak özelleşmiş farklı tipte villuslar oluşur. Bütün bu farklılıklarına rağmen tüm villuslar bazı benzer özellikleri içerirler. Villusların benzer yapıları aşağıda özetlenmiştir.

- I. Villus içeriğini maternal kan damarından ayıran ve villus yüzeyini kaplayan sinsisyotrofoblastlar,
- II. Sinsisyotrofoblastların altında yer alan sitotrofoblastlar (bunlar tek ve ya yığılmış hücrelerden oluşur)
- III. Sinsisyotrofoblastları ve sitotrofoblastları villus stromasından ayıran trofoblastik membran

- IV. Villus stromasında çeşitli bağ doku hücreleri, bağ doku lifleri ve fetal kan damarları bulunur (Şekil 4) [29, 36, 39, 40].

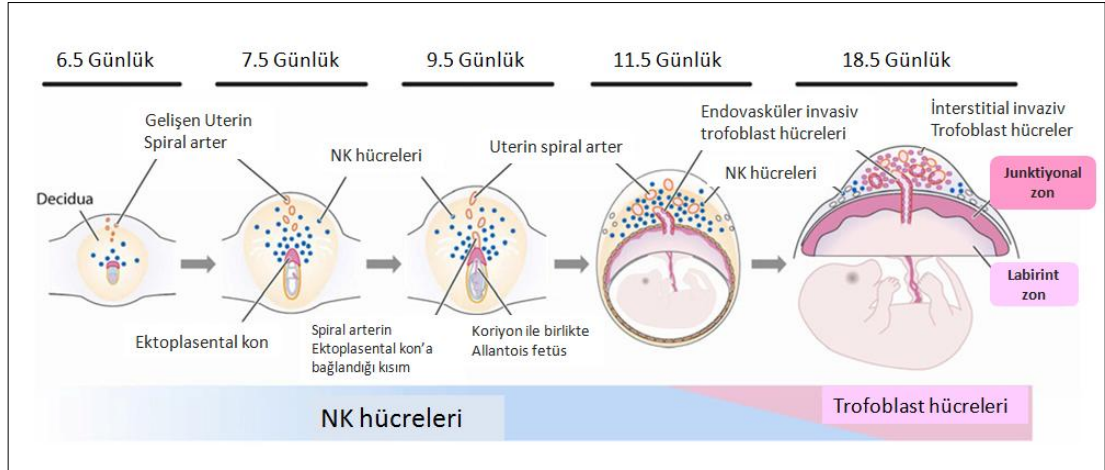


Şekil 4. 7. ve 28. Haftada plasental villus yapısı [30]

2.1.4. Sıçan Plasentasının Gelişimi

Fertilizasyondan sonra ilk bölünme 23-24 saat sonra gerçekleşir. 6. Günde blastosist büyüklüğü artar ve uzar. Bu esnada implantasyon alanındaki epitalyal büyüme tüp benzeri bir yapı kazanır. İmplantasyon alanındaki stromal hücrelerde desidualizasyon gözlenir. Embriyonun 7-8. günlerinde, ekstraembriyonik ektoderm ve ektoplasental kon oluşur.

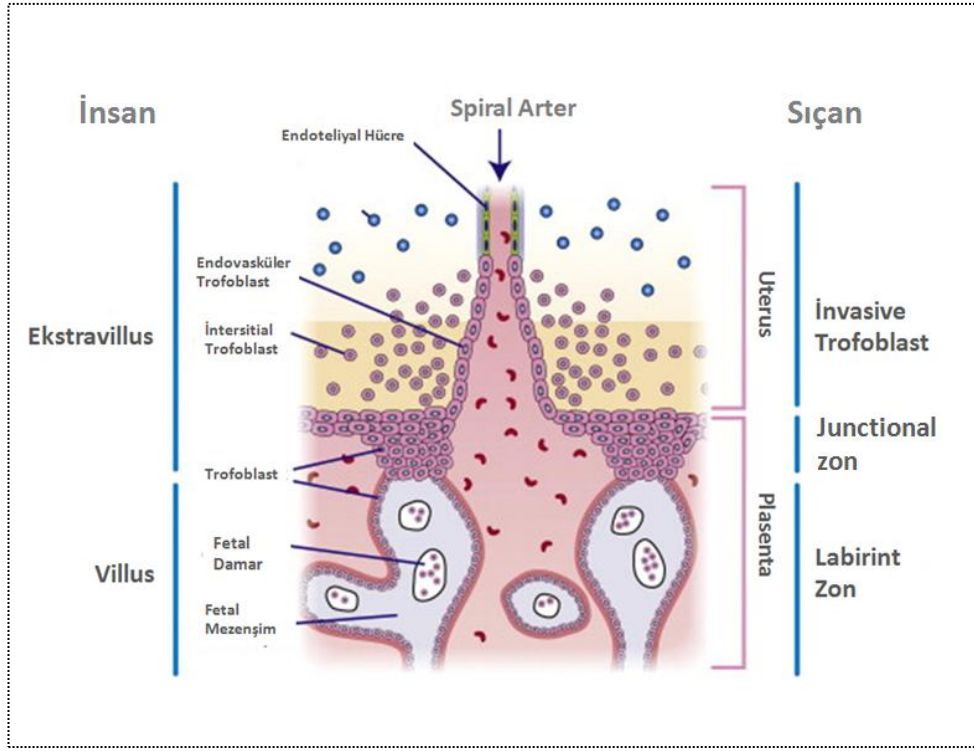
Gelişim ilerledikçe, ekstraembriyonik ektoderm genişleyerek koryonik epitelyumu oluşturur. Embriyonun posterior kısmında mezodermden allantois gelişir ve gebeliğin 9-10. gününde koryon ile temas kurar. Bu olay koryoallontoik temas olarak adlandırılır. Labirint gelişiminde ilk adım koryoallontoik temastır. Trofoblastlar ilişkili oldukları kan damarları ile birlikte yoğun bir villöz dallanmaya giderek labirint olarak isimlendirilen sıkıca paketlenmiş yapıyı oluştururlar (Şekil 5).



Şekil 5. Sıçan plasentasının gelişimi [41].

2.1.5. İnsan ve Sıçan Plasenta Arasındaki Farklar ve Benzerlikler

Rattus norvegicus türü sıçanların ağırlıkları ortalama 250 g'dır. Sıçanlarda gebelik süreleri 21 gün ve ortalama yavru sayısı 7 iken insanda gebelik süresi yaklaşık olarak 9 aydır ve bir veya iki yavru meydana gelmektedir. İnsanda plasenta ile fetüs arasında villus trofoblast tabakası bulunurken sıçanlarda labirint zon bulunur. Ayrıca, insanda uterus-plasenta ara yüzünde ekstravillus trofoblast hücreleri bulunurken sıçanlarda uterus-plasenta ara yüzünde junctional zon ve invaziv trofoblast hücreleri mevcuttur. Sıçan ve insan plasenta arasında bazı farklılıklar olsa da benzerlikler mevcuttur. Her ikisi de hemokoriyal plasenta tipindedir [41].



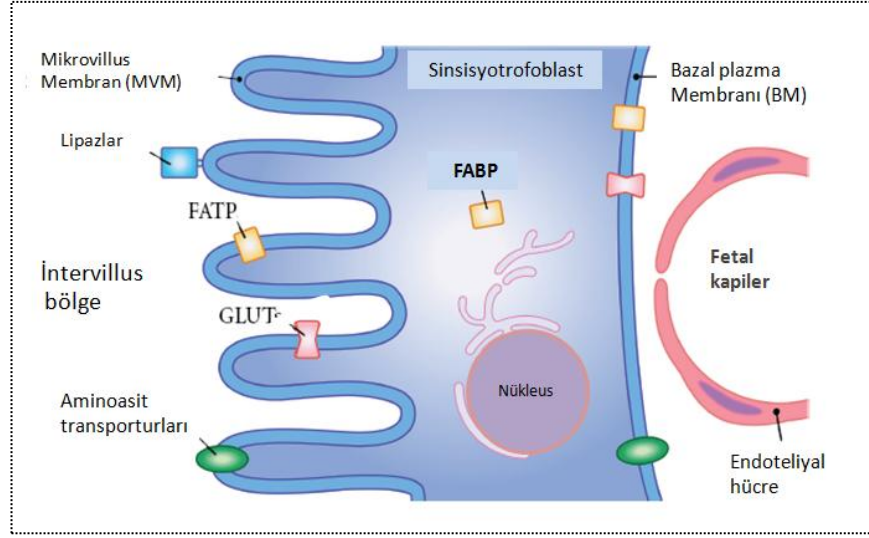
Şekil 6. İnsan ve Sıçan plasenta yapısının karşılaştırılması [41].

2.1.6. Plasentadan Besin Transportu

Plasental besin transportundaki değişimler fetal büyüme ile ilişkilidir [42]. Plasental bariyerde bulunan spesifik transport proteinlerin aktivitesi/ekspresyonu, besin varlığı, uteroplental ve umbilikal kan akımı, plasenta metabolizması gibi birçok faktör, plasentadan transportu etkilemektedir [43, 44].

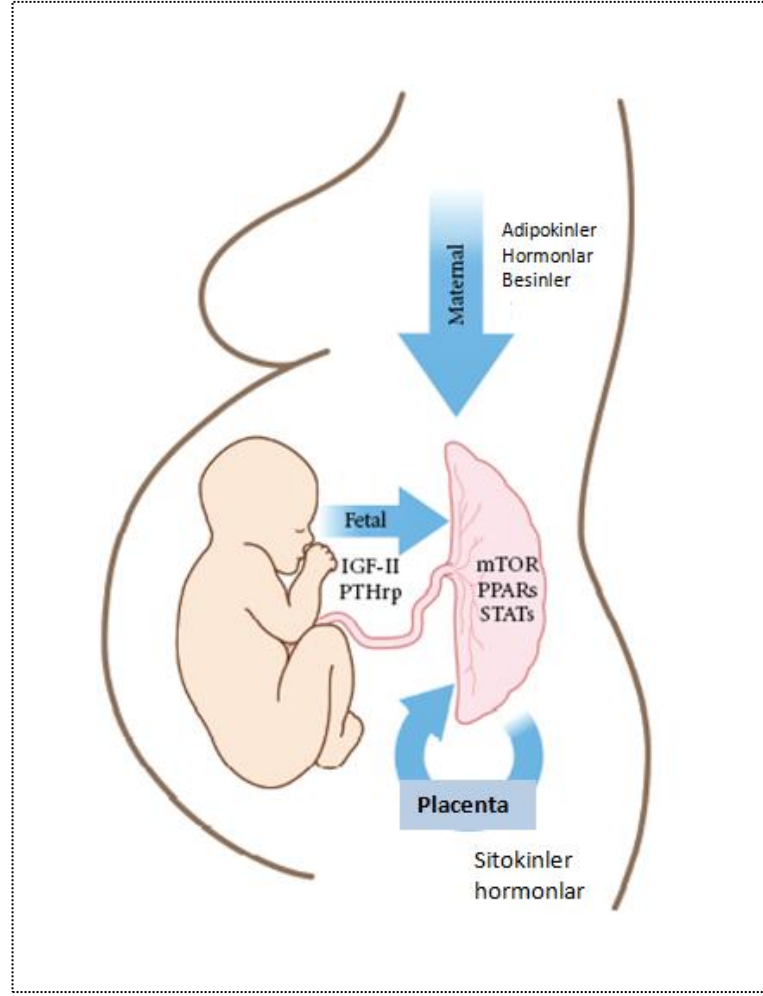
Oksijen ve karbondioksit gibi yüksek geçirgenliğe sahip moleküllerin transportu kan akımındaki azalmadan kolaylıkla etkilenmektedir [43]. Daha az geçirgen maddeler hem pasif hem de aktif taşıma ile transport edilmektedir. Glukoz transportu plasentadan kolaylaştırılmış difüzyon ile gerçekleşir. Net glukoz transferi fetal-maternal konsantrasyon gradiyentine bağlıdır [45].

İnsan plasentasından besin geçişini sınırlayan öncelikli bariyer sinsisyotrofoblastlardır [43, 45, 46]. Sinsisyotrofoblastlar iki polarize membran içermektedir; anneye bakan taraf mikrovillüs plazma membranı (MPM) ve fetal tarafında bazal membran (BM) [43]. Sinsisyotrofoblastların membranında besin transportunu sağlayan birçok taşıyıcı protein mevcuttur. Ayrıca sinsisyotrofoblastın MPM’ında insülin reseptörünü de içeren sayısız hormon reseptörü mevcuttur.



Şekil 7. Sinsisyotrofoblast. Sinsisyotrofoblastın bazal plazma membranı (BM) fetal sirkülasyona bakar. Anne kanı intervillus bölgede toplanır ve mikrovillüs membranı (MPM) ile temas eder. Maternal kandan amino asitler, glukoz ve yağ asidi taşıyıcı proteinler (FATP ve GLUTs) ile taşınır. Bu taşıyıcılar sinsisyotrofoblastın her iki membranında eksprese olmaktadır. Lipid transferi için ekstrasellüler lipaz maternal lipoproteinlerden, yağ asitlerini salar. İntrasellüler yağ asidi bağlayıcı proteinler (FABP) yağ asitlerinin sinsisyotrofoblast sitozoline girmesini sağlar [43].

Sinsisyotrofoblast membranları; fetal, maternal ve plasental sinyaller tarafından regüle edilen birçok besin transporturunu içermektedir. Plasentayı etkileyen fetal sinyaller IGF-II ve PTHrp (paratiroid hormon benzeri ilişkili protein)'dir. Maternal etkiler ise adipokinler, hormonlar ve besinleri içermektedir. Plasenta birçok molekülü eksprese eder ve maternal ya da fetal sirkülasyona salar. "Mammalian target of rapamycin" (mTOR), "Signal Transducer and Activator of Transcription" (STAT) ve PPAR gibi çeşitli hücre içi sinyallerde plasental besin transportunu etkilemektedir [43].



Şekil 8. Plasentanın fonksiyonunu düzenleyen faktörler. Placenta fonksiyonunu etkileyen fetal sinyaller IGF-II ve PTHrp'dir. Maternal faktörler; adipokinler, hormonlar ve besin seviyeleridir. Ayrıca plasenta kendisinde maternal ve fetal sirkülasyona katılan birçok molekül eksprese etmektedir [43].

2.1.7. Maternofetal Glukoz Transportu

Glukoz, hem plasenta hem de fetus için başlıca enerji kaynağıdır. Fetal glukoz sentezi minimal düzeydedir. Bundan dolayı fetüs tamamen maternal dolaşımdan gelen glukozla bağlıdır [43]. Plasentaya glukoz transportu kolaylaştırılmış difüzyon ile sağlanmaktadır. Maternofetal glukoz transportunun öncelikli regülatörleri plasentadaki glukoz taşıyıcı proteinlerin yoğunluğudur. Bu taşıyıcı proteinler kolaylaştırılmış-difüzyon taşıyıcı ailesinin üyesi olan GLUT genleridir. GLUTlar sinsisyotrofoblastların mikrovillüs membranı ve bazal membranında bulunmaktadır. GLUT'lar BM'de MPM'ye göre daha az eksprese olmaktadır [43, 45].

Plasenta dokusunda GLUT1, GLUT3, GLUT8, GLUT9 ve GLUT10 eksprese olmaktadır. Ayrıca birinci trimester sinsisyotrofoblast hücreleri insüline duyarlı

glukoz taşıyıcısı olan GLUT4'ü de eksprese etmektedir [43]. İnsülinin glukoz transportu üzerindeki etkisi üzerine çelişkili ifadeler mevcuttur. Bazı çalışmalar insülinin term plasentasında glukoz alımını etkilemediğini, bazılarında ise term plasentada glukozun alımını stimüle ettiği rapor edilmiştir. Ericsson ve ekibi ise birinci trimester plasentada insülinin glukoz alımını stimüle ettiğini rapor etmişlerdir. Bunun nedeni insüline duyarlı glukoz taşıyıcı proteini olan GLUT1 ve 12'nin birinci trimesterde eksprese olması olabilir [47].

2.1.8. Maternofetal Yağ Asidi Transportu

Yağ asidi spesifik doku ve organların gelişimi için önemlidir. Örneğin gebeliğin üçüncü trimesterinde yağ asitleri adipoz doku ve beyinde hızlı bir şekilde birikmeye başlar. Özellikle uzun zincirli doymamış yağ asitleri beyin gelişimi için önemlidir [43, 48].

Plasentaya alınan ve fetusa transport edilen yağ asitleri maternal dolaşımdaki iki orjinden gelmektedir: esterleşmemiş yağ asitleri (NEFAs) ve esterleşmiş yağ asitleri (trigliseridler) [46]. Anneden fetusa yağ asidi transportu maternalden fetale oluşan konsantrasyon gradiyenti ile olmaktadır. Esterleşmemiş yağ asitleri basit difüzyon ile lipid tabakasını geçer. Çok fazla yağ asidine ihtiyaç duymayan dokularda basit difüzyon ile yağ asitlerinin transportu yeterli olabilir [46]. Uzun zincirli yağ asitlerinin transportunda ise integral membran proteinleri olan FATPs etkilidir [43]. FATP'leri integral membran proteinleridir ve özellikle uzun zincirli yağ asitlerinin hücre içine transportunda etkilidirler. Sinsisyotrofoblastların sitozolünde bulunan FATP'leri ise hücre içinde yağ asitlerinin esterleşme, β -oksidasyon ve fetüse transfer olaylarının trafiğini kontrol etmektedir. Diyabetik plasentalarda FATP1 ekspresyonu artmakta böylece fetal yağ birikimine katkıda bulunmaktadır. FATP1 ekspresyonu PPAR γ tarafından düzenlenmektedir [49, 50].

Maternal lipoproteinlerle taşınan trigliseridler, MPM ile etkileşim halinde olan lipazlarla hidrolizlenip esterleşmemiş yağ asitlerine dönüştürülür. Gebelik komplikasyonları, plasental lipoprotein lipazı etkilemektedir. Maternal insülin kaynaklanan aşırı fetal büyüme gibi gebelik komplikasyonlarında MPM'deki LPL (lipoprotein lipaz) aktivitesi azalmaktadır [43].

2.2. Diyabetes Mellitus

Diyabetes mellitus (DM) insülin sekresyonundaki defektler, insülin etkisi veya her ikisinden kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize olan metabolik bir hastalıktır [51, 52]. Diyabet gelişiminde genetik ve çevresel faktörlerle birlikte rol almaktadır.

Dünya sağlık örgütü (WHO) insüline bağımlı diyabetes mellitus (IDDM, tip1 diyabet) ve insüline bağımlı olmayan diyabetes mellitus (NIDDM, Tip 2 diyabetes)

mellitus) olmak üzere 2 temel klinik form tanımlamıştır [51, 52]. Bunun dışında gebelikte görülen diyabet formunda mevcuttur bu gestasyonel diyabet olarak tanımlanmaktadır.

2.2.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM)

Tip 1 diyabetes mellitus pankreasın insülin salgılayan adacık beta hücrelerinin selektif olarak harap olması sonucunda ortaya çıkan ve β -hücrelerinden insülin üretiminin kaybı ile karakterize edilen immün-aracılı kronik bir hastalıktır. Bunun sonucunda da hiperglisemi gözlenir [52-54].

Tip1 diyabetes mellitus görülme sıklığı dünya genelinde her geçen gün artmaktadır [51, 55]. Yapılan çalışmalar genetik faktörler, çevresel faktörler ve otoimmünite gibi birçok faktörün tip 1 diyabet etiyolojisinde yer aldığını göstermektedir [56, 57].

Tip 1 diyabet gelişmesinde etkili olan faktörlerden biri de çevresel faktörlerdir. Viral enfeksiyonlar, diyet (inek sütü, nitrozaminler), toksinler ve stres tip 1 diyabet gelişiminde etkili olan çevresel faktörlerdir [52].

Genetik ve çevresel faktörlerin indüklenmesi ile birlikte oluşan otoimmün süreç ile birlikte pankreas adacık hücrelerinde devam eden ve yavaş yavaş ilerleyen yıkımla birlikte insülin salgılanması azalır. Pankreastaki adacık hücrelerinin %80-90'nının harabiyeti sonucunda diyabetin klinik bulguları ortaya çıkar [58].

2.2.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM)

Tip 2 diyabet en yüksek prevalansa sahip olan diyabet türüdür. Dünya üzerinde yaklaşık olarak 366 milyon insan tip 2 diyabet hastalığına sahiptir [59]. Bu rakamın 2030 yılında 400 milyon bireyi bulacağı tahmin edilmektedir [60].

Tip 2 diyabetin gelişiminde pankreas beta hücrelerinden insülin salınımının yetersiz olması ya da salınan insüline periferik dokularda direnç gelişmesi rol oynamaktadır [52, 59, 61]. İnsülin direnci, dokuların insüline yanıt vermemesi ya da pankreatik beta hücrelerinden yeterli insülin salgılanmadığı durumlarda ortaya çıkmaktadır. Tip 2 diyabette glukoz toleransı, glukoz metabolizması ve insülin direnci bozulmaktadır [62].

Tip 2 diyabet açlık ve tokluk hiperglisemi ile karakterize edilir;

- I. Açlık plazma glukozu 126 mg/dL (0,7 mmol/L)'den büyük ya da eşit ise
- II. Açlık durumuna bakılmaksızın plazma glukozu 200 mg/dL (11,1 mmol/L)'den yüksek ya da eşit ise Tip 2 diyabet tanısı konulur [63].

III. Son zamanlarda Hemogloblin A1c ölçümünde Tip 2 diyabet tanısında kullanılmaktadır [63].

Tip 2 diyabet gelişiminde çevresel (vitamin D eksikliği, glisemik indeksi yüksek besinler, doymuş yağlar, trans yağlar v.b.) [59, 64-66] ve genetik faktörler birlikte rol almaktadır. Çevresel ve genetik faktörler üç mekanizma ile Tip 2 diyabet oluşturmaktadır; 1) Pankreastan insülin salınmasındaki aksaklıklar 2) Karaciğerde glukoz üretiminin artması ve 3) Periferik dokularda insülin direncinin oluşması.

Tip 2 diyabet ile yapılan çalışmalarda hastalığın insülin eksikliğinden çok insülin direncinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Tip 2 diyabet hastalığı için geçerli olan bir diğer gerçek ise zamanla beta hücrelerinin artık insülin üretemeyecek şekilde tükenmesidir. Bunun nedeni ise kronik hipergliseminin beta hücrelerinde ölüme yol açmasıdır. Bir diğer açıklama ise beta hücrelerinin sağlıklı bir bireyde ömür boyu yetecek olan bölünerek çoğalma kapasitesinin aşırı uyarı gelmesi ve aşırı üretim yapması sonucunda erkenden kullanıp tüketmesidir [52].

Diyabetli bireylerde karaciğerde glukoz üretimi sürekli olarak yüksek kalır ve kan glukozunun yükselmesine neden olur. Kanda glukoz oranının sürekli yüksek olması periferde glukozu alacak olan dokuların insülin reseptörleri üzerinde toksik etki yaparak reseptörlerin insülin hassasiyetini azaltır. Bu olaya 'glukoz toksisitesi' denilmektedir. Aynı toksite pankreasın beta hücreleri üzerinde de etkili olarak insülin salınımını etkiler ve durumu daha da kötüleştirir. Tip 2 diyabet hastalarında plazma glukagon seviyesi yüksektir ve hiperglisemiye rağmen baskılanamaz. Yüksek glukagon da hepatik glukoz üretimini artırarak diyabet gelişimine katkıda bulunur.

İnsülin direnci tip 2 diyabetin esas özelliğidir. İnsülin duyarlılığını etkileyen temel faktörlerden bir tanesi de obezitedir. Özellikle abdominal obezite, tip 2 diyabet oluşmasında etkilidir [60]. Omental yağ dokusundan salgılanan serbest yağ asitleri dolaşıma katılıp karaciğere gelir ve karaciğerde glukoneogenezi artırarak insülin etkisini azaltır. İnsülin direnci bulunduğu yere göre preresseptör, reseptör ve postreseptör şeklinde sınıflandırılabilir.

- I. Preresseptör; pankreas beta hücrelerinde defektif insülin salınımı, glukoz ve insülinin hedef doku ve organlarında kan akımının yeterli ve uygun olmaması durumunda ortaya çıkar.
- II. Reseptör düzeyinde; insülin reseptör sayısında azalma, otofosforilasyonda ve tirozin kinaz aktivitesinde bozukluk, insülin genindeki farklı mutasyonlar neden olur.

- III. Postreseptör düzeyinde; GLUT4'ün insülin ile aktivasyonundaki azalma, glukozun oksidatif ve oksidatif olmayan metabolik yollarında rol alan enzimlerin aktivitelerindeki bozukluklar. Ayrıca obezitede adipoz dokudan büyük miktarda salgılanan adiposit kaynaklı TNF- α insülin reseptörlerinin otofosforilasyonunu azaltarak postreseptör düzeyde insülin direnci oluşmasına neden olur.

Tip 2 diyabet ya da insülin direnci olan bireylerin kardiyovasküler mortalite oranı beş kat artmaktadır [67]. Tip 2 diyabet tedavisinde yaygın olarak metformin kullanılır. Metformin sadece diyabet ile ilgili komplikasyonları ve mortaliteyi azaltmamakta aynı zamanda aşırı kilolu bireylerde kilo kaybı sağlanmaktadır [68].

2.2.3. Gestasyonel Diyabet

Gebelik esnasında görülen diyabete gestasyonel diyabet denir. Gestasyonel diyabet bozulmuş glukoz toleransı olarak tanımlanır ve hastaların %2-%8'inde görülür [69]. Birçok faktör gestasyonel diyabette etkili olabilmektedir.

Gestasyonel diyabet yaygın bir patolojik durumdur ve hem annenin hem de fetüsün komplikasyonlara duyarlı hale gelmesine neden olur. Diyabet ile bağlantılı gebelikler; anormal fetal büyümesi, fetal malformasyonu, plasental disfonksiyon ve hasar görmüş utero-plasental kan akımı ile sonuçlanmaktadır [31]. Anne, gebeliğin erken dönemlerinde diyabete maruz kaldığı zaman fetal kayıp, perinatal mortalite ve doğum defektleri gözlenmiştir. Anne gebeliğin ilerleyen dönemlerinde diyabete maruz kaldığı zaman ise artan yenidoğan ağırlığı, makrozomi gözlenmiştir [70, 71]. Ayrıca diyabet, plasental gelişimde, defektlerin oluşmasına neden olmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalar, diyabetik plasentaların, hasar görmüş trofoblast farklılaşmasını da içeren birçok yapısal ve kimyasal anormallikleri içerdiğini göstermiştir. Bu plasentalar plasentomegali ve dismaturasyon ile karakterize edilmektedir. Ayrıca, gestasyonel diyabet ve gebelikte kan glukozunun disregülasyonu annenin ileriki yaşamında tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalık oluşturma riskini artırmaktadır [62, 70].

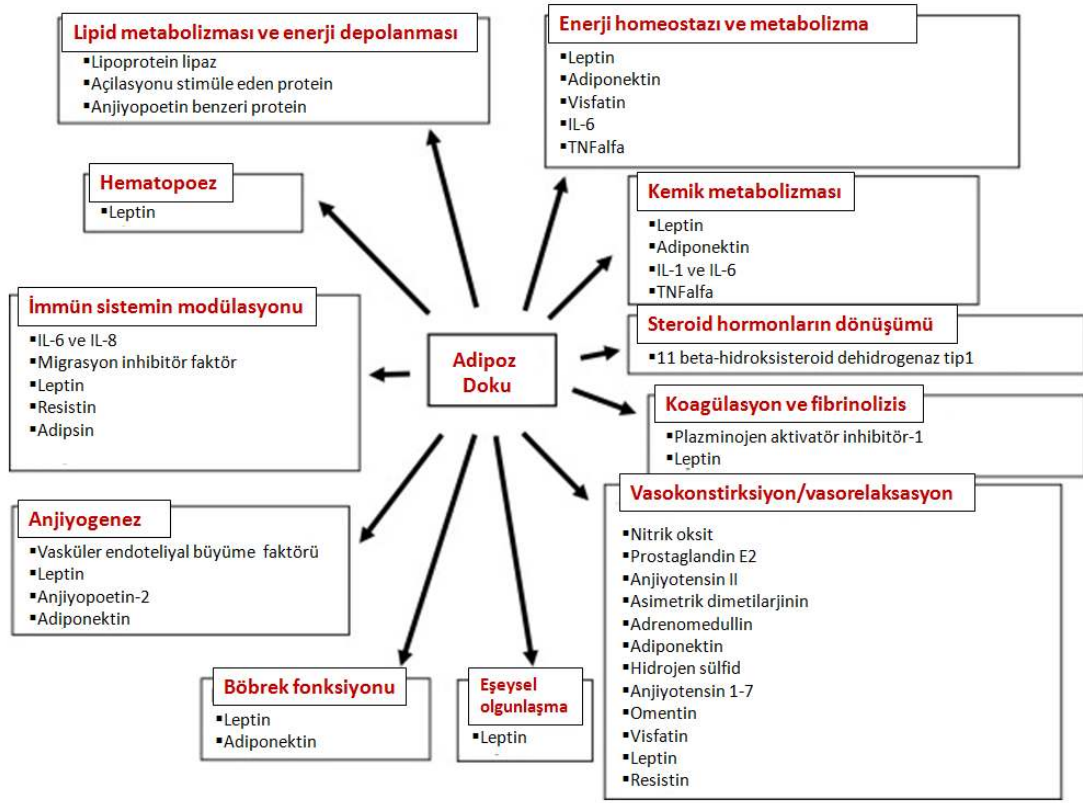
Hem anne yaşının hem de gebelik öncesi vücut kitle indeksinin artması, gebelik diyabeti için güçlü risk faktörleri oluşturmaktadır [70, 72]. Maternal yağ kütlesinin artması ve plasentadan salgılanan hormonlar gestasyonel diyabet oluşumunda temel rol oynamaktadır. Ayrıca insülin direnci ile ilgili TNF- α , resistin, visfatin, adiponektin ve apelin gibi adipokinler de gestasyonel diyabet oluşumunda etkilidir. Gestasyonel diyabette, adiponektin dışındaki adipokinlerin seviyesi artmaktadır [62]. Adiponektinin, insülin duyarlaştırıcı etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Adiponektin, AMPK aracılığı ile hepatik glukoz üretimini azaltır ve iskelet kasına glukoz alımını stimüle eder [62]. Vitamin D'nin de kötü gebelik sonuçları ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Yüksek plazma vitamin D; diyabet

riski yüksek olan bireylerin diyabet geliştirme riskini düşürmektedir. Dahası, vitamin D glukoz homeostazını da etkilemektedir. Gestasyonal diyabetes mellitusta glukozillenmiş hemoglobin düzeyleri ve vitamin D arasında ters bir bağlantının olduğu tespit edilmiştir [66]. Buna ek olarak, vitamin D eksikliği; gestasyonal diyabetes mellitus'un oluşma riskinin artması ile ilişkili olduğu rapor edilmektedir [66].

2.3. Adiponektin ve Adipoz doku

İnsanda, beyaz adipoz doku ve kahverengi adipoz doku olmak üzere iki çeşit adipoz doku vardır [73]. Kahverengi yağ dokusunun temel fizyolojik fonksiyonu termogenezi ve vücut ısını ayarlamaktır [73]. Beyaz adipoz doku tüm vücuda yayılmış ve kolayca çoğalabilme kapasitesine sahiptir. Beyaz adipoz doku heterojendir; birçok hücre tipi ve büyük miktarda beyaz adiposit içerir. Beyaz adipoz dokuda beyaz adipositler; fibroblastlar, endotelial hücreler, immün hücreler ve sinirlerle çevrilmiştir [74]. Beyaz adipoz doku oluşumu mezenkimal kök hücrelerinin; anjiyogenez oluşurken farklı bölgelerde yığılmaları sonucu meydana gelir [74]. Adipogenez; kök hücreden preadipositlerin oluşması ve daha sonra bunların olgun adipositlere farklılaşmasını içeren kompleks bir süreçtir.

Adipoz doku, memelilerde birçok fizyolojik fonksiyonların gerçekleştiği ve hayatın devamı için gerekli olduğu kabul edilen bir doku olarak kabul edilmektedir. Buna ek olarak, soğuğa adaptasyonu regüle etmekte ve ATP üreten bir enerji kaynağı olarak fonksiyon göstermektedir [4]. Son yıllarda; adipoz dokunun fizyolojik ve patolojik durumlar altında immünolojik ve inflamatuvar süreçleri regüle eden metabolik olarak aktif bir organ olarak fonksiyon gösterdiği kabul edilmektedir [4]. Özellikle obezite ve obezite ile ilgili hipertansiyon, diyabet gibi durumların adipoz doku üzerinde çalışılması sonucunda adipoz dokunun endokrin bir organ olarak fonksiyon gösterdiğine dair kanıtlar artmıştır. Adipoz doku adipokinler olarak isimlendirilen birçok hormon ve sitokinlerin salgılandığı endokrin olarak aktif bir organdır (Şekil 9) [4, 5, 73].



Şekil 9. Adipoz dokudan sekrete edilen ürünlerin ana fizyolojik fonksiyonları [73].

2.3.1. Adiponektin

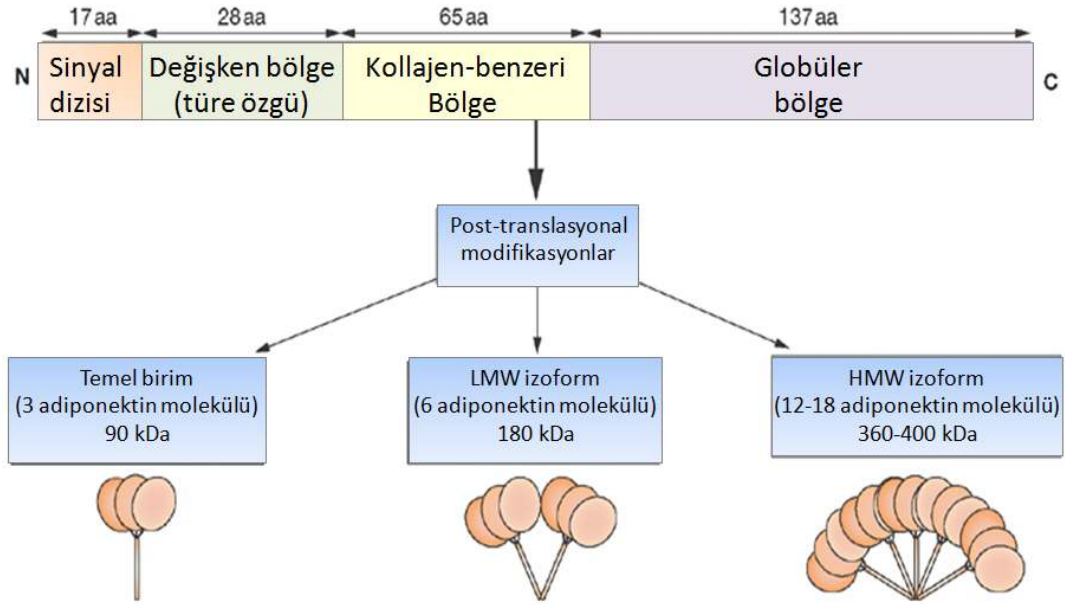
Adipositlerden salgılanan en önemli hormonlardan biri de adiponektin'dir. Adiponektin ilk defa 1995 yılında 3T3-L1 adipositlerde Scherer ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir [75]. Adiponektin ilk zamanlarda esas olarak adipositlerden sekrete edildiği düşünülmüştür. Ancak son yapılan çalışmalarda adiponektinin hem protein hem de mRNA düzeylerinin osteoblastlar, karaciğer parankim hücreleri, miyositler, epitel hücreleri, plasenta dokusu gibi diğer dokularda da ekspresyona olduğu gösterilmiştir [4, 76].

Adiponektin aynı zamanda Acrp30 (adiposit komplement-iliskili protein 30 kDa), AdipoQ, apM1 veya GBP28 (jelatin-bağlayıcı protein 28 kDa), olarak da bilinmektedir [5, 76, 77]. Adiponektin kollajen-benzeri adipokindir ve antiaterojenik, anti-diyabetik ve insülin duyarlaştırıcı etkilere sahiptir [78].

2.3.2. Adiponektinin Yapısı

Adiponektin apM1 geni tarafından kodlanır [73]. İnsan adiponektini 28-30 kDa ağırlığında 244 amino asit içeren bir proteindir [4, 73]. Adiponektin yapısal olarak kompleman 1q'a benzerlik göstermektedir [5, 79, 80].

Adiponektin, N-terminal ucunda sinyalizasyon peptit bölgesi ve türe özgü değişken bölge içerirken ve C-terminal ucunda kollajen-benzeri bölge ile globüler bölge içermektedir (Şekil 10) [4, 5, 81, 82].



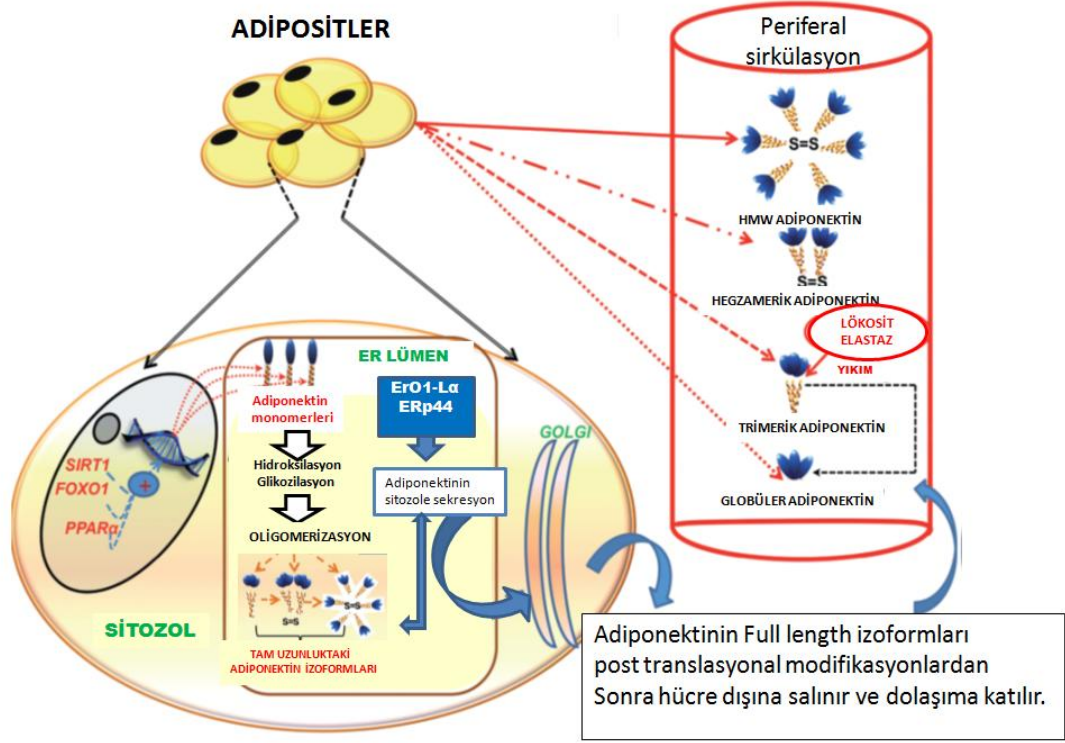
Şekil 10. Adiponektinin yapısı ve izoformları. Adiponektin hidroksilasyon ve glukozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlara uğrar. Adiponektin molekülleri adipositlerden trimer (~90 kDa; temel birim), düşük moleküler ağırlıklı hekzamer (~180 kDa, LMW) ve yüksek moleküler ağırlıklı izoformlar (12–18-mer; >400 kDa HMW) olarak sekrete edilirler [81].

N-terminal bölgesi diğer herhangi bir protein ile benzerlik göstermemektedir ve türler arasında değişiklik gösterir. Bunun aksine C-terminal bölge kompleman 1q ile benzer aminoasit sekansına sahiptir. Ayrıca C-terminal bölgesi; kollajenVIII ve X, mannoz-bağlanma proteini, TNF- α (Tümör nekrozis faktör α) gibi diğer proteinlerin globüler bölgelerine benzerlik göstermektedir [83].

Adiponektinin üç büyük oligomerik formu bulunmaktadır; düşük moleküler ağırlıklı (LMW) trimer, orta moleküler ağırlıklı (MMW) hekzamer ve yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) 12-18-mer adiponektin [4, 8, 9, 73, 81, 84]. Adiponektinin ayrıca globüler formu da mevcuttur. Globüler adiponektin, adiponektin monomerinin proteolitik yıkımı sonucunda oluşmaktadır [4]. Globüler adiponektin trimerler şeklinde bulunur.

Trimerik form, adiponektinin dolaşımdaki temel formudur. Trimerik form daha sonra hekzamer ve daha geniş komplekslere oligomerize olmak için; sistein

kalıntısından (insanda Cys36 ve farede Cys39) disülfid bağı oluşturur ayrıca hidroksilasyon ve glukozilasyon (kollajen bölgesindeki prolin ve lizinden) gibi posttranslasyonel modifikasyonlarada uğrar (Şekil 11) [4]. Buna ek olarak adiponektinin trimerik formu lökosit elastaz tarafından proteolitik yıkıma uğratarak globüler adiponektine dönüştürölüp dolaşıma salınır (Şekil 3).



Şekil 11. Adiponektinin sentezi, sekresyonu ve sirkülasyonunun düzenlenmesi [4].

2.3.3. Adiponektinin Post-translasyonel Modifikasyonları

Adiponektin dolaşımda farklı formlarda bulunan kompleks bir proteindir. Adiponektinin her bir oligomerik formu farklı hedef dokularda farklı biyolojik fonksiyonları gerçekleştirmektedir. Adiponektinin merkezi rolünü gerçekleştiren öncelikli formları hekzamerik ve trimerik oligomerleridir. HMW oligomer, adiponektinin insülin duyarlaştırıcı etkisine aracılık eden major aktif formudur [73, 76]. Tip 2 diyabetli hastalarda adipositlerden oligomer sekresyonu hasar gördüğünden, HMW adiponektinin dolaşımdaki seviyesi düşer.

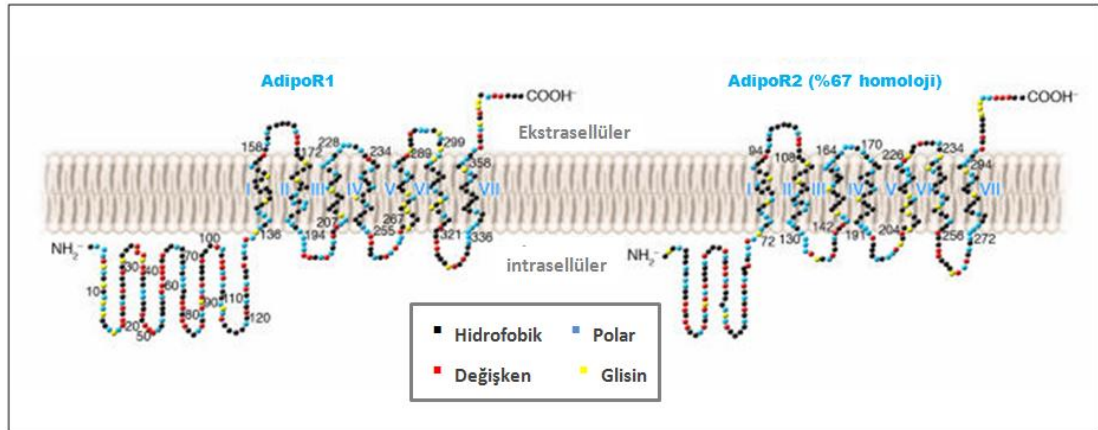
Adiponektin oligomerlerinin sentezi post-translasyonel modifikasyonları içeren kompleks bir süreçtir (Şekil 11). Hücre içinde oligomerik yapıları stabil edebilmek için adiponektinin kollajen bölgesinde yüksek oranda korunmuş olan lizin kalıntılarından hidroksilasyonu ve glikolizilasyonu gerekmektedir [84]. Ayrıca adiponektin oligomerlerinin sekresyonu, endoplazmik retikulumda bulunan 44 kDa endoplazmik retikulum proteini (ERp44) ve endoplazmik retikulum oksidoredüktaz

1-L α (Ero1-L α) şaperonları tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. ERp44, tiyol aracılı bir mekanizma ile adiponektin sekresyonunu inhibe ederek hücre içinde alıkoymaktadır. Bunun aksine Ero1-L α , ERp44 tarafından tutulan HMW adiponektinin salınmasını sağlar [84, 85]. *İn vivo* ve *in vitro* çalışmalar adiponektin sekresyonunun ve ekspresyonunun PPAR γ ve TZD'ler tarafından arttırıldığını göstermektedir [76, 86, 87]. PPAR γ agonisti olan TZD 'ler Ero1-L α 'yı up-regüle ederek HMW adiponektin sekresyonunu artırır [84, 88, 89].

2.3.4. Adiponektin Reseptörleri

Adiponektin glukoz metabolizmasını ve insülin duyarlılığını etkiler. Ayrıca, antiinflamatuvar ve antiaterojenik özellik gösterir [76]. Adiponektin bu etkisini p38 MAPK, AMPK, PPAR α ve PPAR γ gibi birçok sinyal molekülünü aktive ederek gerçekleştirmektedir. Bu sinyalizasyon adiponektinin, adiponektin reseptör 1 (AdipoR1) ve adiponektin reseptör 2 (AdipoR2) olarak isimlendirilen reseptörleri üzerinden ilerlemektedir [4, 90].

AdipoR1 ve AdipoR2 amino asid içeriği bakımından %67 homoloji göstermektedir. Her iki reseptör de integral membran proteinleridir. N-terminal bölgesi hücre içinde C-terminal bölgesi ise hücre dışındadır (Şekil 12) [5, 91].

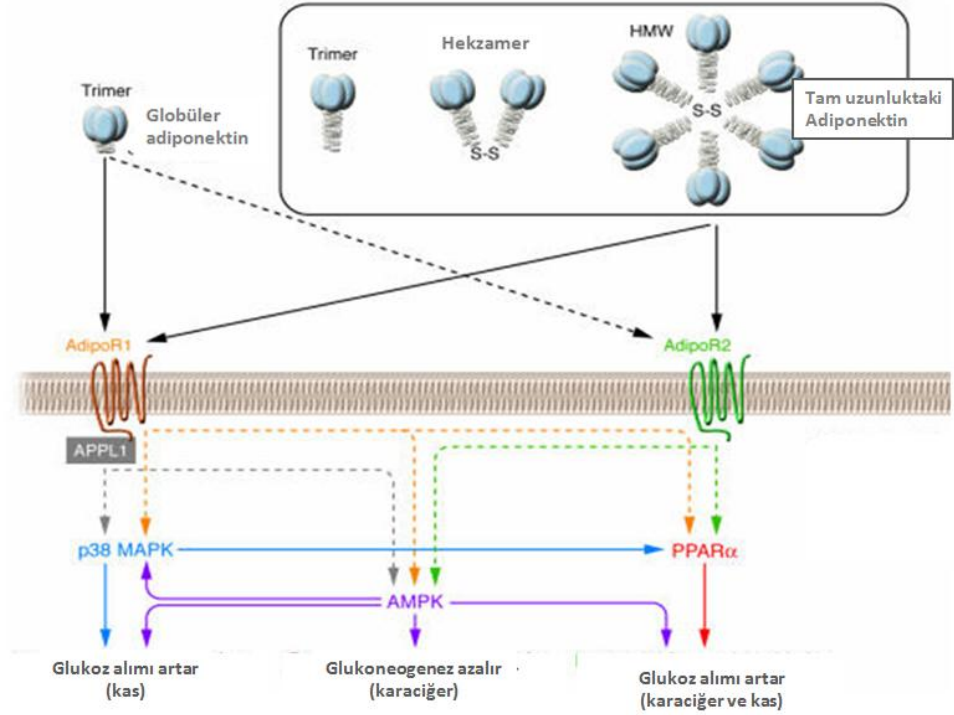


Şekil 12. Adiponektin reseptörlerinin yapısı. AdipoR1 ve R2 reseptörlerinin her ikisi de 7 trans membran domaini içermekte ve %67 homoloji göstermektedir [5].

AdipoR1 geni 375 amino asitlik bir protein kodlar ve moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 42,4 kDa'dur. Adipo R2 geni ise 311 amino asitlik bir protein kodlar ve moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 35,4 kDa'dur [77]. Adiponektin reseptörleri farklı adiponektin multimerlerine karşı farklı afinitelere sahiptir. AdipoR1 gAd'ne yüksek afinite ile bağlanırken, AdipoR2 ise gAd ve tam uzunluktaki adiponektin (full-length adiponektin, fAd) orta düzeyde bir afineteye sahiptir [4, 5, 90, 92].

Adiponektin reseptörleri aracılığı ile PPAR α , AMPK ve p38 MAPK aktivitesini stimüle ederek glukoz alımını ve yağ asidi oksidasyonunu arttırır [91, 93,

94]. PPAR α ve AMPK'nın baskılanması adiponektin uyarımlı yağ asidi oksidasyonunun azalmasına neden olmaktadır. AMPK veya p38 MAPK'in baskılanması ise adiponektin uyarımlı glukoz alımının azalması ile sonuçlanmaktadır (Şekil 13). Adiponektin ile tedavi sonrasında plazma glukoz seviyesi ve glukoneogenezde yer alan moleküller azalır. Bu durum ise insülin duyarlılığının geliştirir. STZ indüklü diyabetik farelerin iskelet kasında AdipoR1 mRNA düzeyleri artmıştır ve insülin alındıktan sonra normal AdipoR1 düzeyine gelmiştir [95].



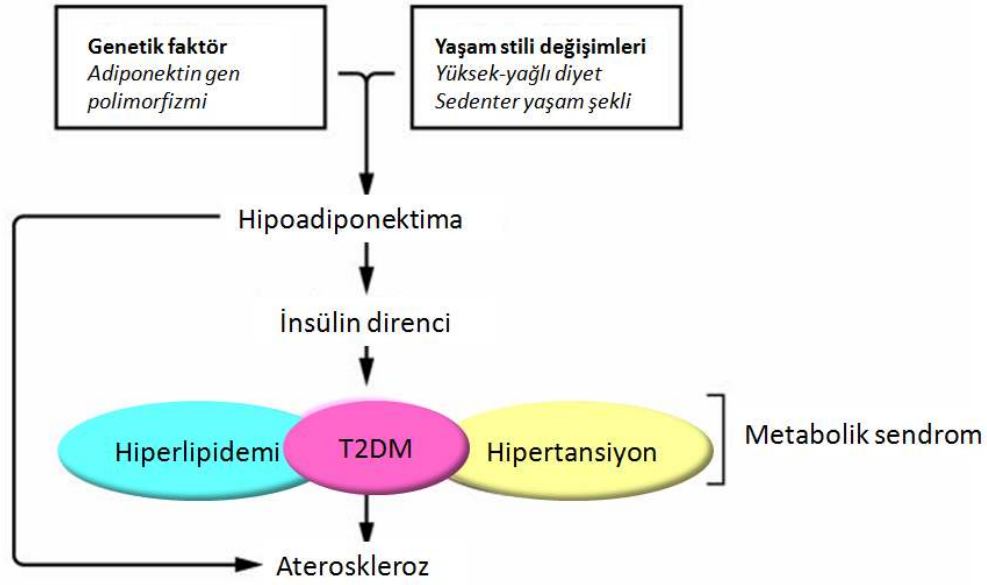
Şekil 13. AdipoR1 ve AdipoR2 reseptörleri aracılığı ile adiponektin sinyal iletimi. AdipoR1 ve AdipoR2, globüler ve oligomerik adiponektin formları için reseptör fonksiyonu göstermektedir. Adiponektin bu reseptörleri aracılığı ile AMPK, PPAR α ve p38 MAPK aktivitesini uyarır ve biyolojik fonksiyonlarını gerçekleştirir [5].

2.3.5. Adiponektin ve Diyabet

Adiponektin antidiyabetik ve antiaterojenik özelliğinden dolayı büyük ilgi gören adipokinlerden biridir [81]. Adiponektin geni tip 2 diyabet ve metabolik sendrom ile bağlantılı olan 3q27 kromozom üzerinde lokalize olmaktadır [5, 76]. Tip 2 diyabette hastalığın ilerleyen aşamasında yükselen kan glukozuna yanıt olarak pankreatik beta hücrelerinden sekrete edilen insülin miktarı azalır ve insülin direnci oluşur [96]. İnsülin direncinde iskelet kası ve adipoz doku tarafından glukoz alımı azalır. Adiponektin; kas, karaciğer ve adipoz dokunun insüline duyarlı hücrelerinde AdipoR1 ve AdipoR2 aracılığı ile lipid ve glukoz metabolizmasını düzenler [96].

Normal plazma adiponektin konsantrasyonu 5 ve 30 µg/mL arasında değişmektedir. Adiponektinin plazmadaki konsantrasyonu, leptin (insülin direnci ve tip 2 diyabet ile ters orantılı) konsantrasyonunun 1000 katıdır [76]. Adiponektinin plazma konsantrasyonu vücut kitle indeksi ile negatif koreledir. Obez, insülin dirençli rodent modellerinde TNF-α ve resistin ekspresyonu yükselirken, adiponektin ekspresyonun düştüğü gösterilmiştir [97]. Adiponektin konsantrasyonundaki düşüş, insülin direnci ve diyabet riskini arttırmaktadır [76, 98-100]. Düşük plazma adiponektin seviyesi, insülin direnci ile ilişkili kardiyovasküler hastalıklar ve hipertansiyon gibi durumlarda gözlenmiştir [5]. Tip 2 diyabet geliştirilen maymun modellerinde de plazma adiponektin seviyelerinin düştüğü gözlenmiştir [101]. Visseral obeziteli insanlarda plazma adiponektin seviyelerinde insülin direnci ile korele kısmi düşüş kaydedilmiştir [102-104].

Plazma adiponektin seviyesi cinsiyete göre de değişmektedir. Bayanların dolaşımdaki adiponektin seviyesi erkeklerden daha yüksektir. Bu österojen ve androjen konsantrasyon farkından dolayı olabilir [76, 105-107]. Soya proteini [108], balık yağı [109] ve linoleik asid [110] gibi bazı diyetel faktörler de dolaşımdaki adiponektin düzeylerini artırmaktadır. Bu yiyecekler aynı zamanda diyabet oluşumuna karşı da bireyleri korumaktadır. Karbohidrat ağırlıklı yiyecekler ise plazma adiponektin düzeylerini düşürmektedir [111]. Oksidatif stres, adiponektin ekspresyonunu inhibe etmektedir [112]. Sonuç olarak; plazma adiponektin düzeyleri yaş, cinsiyet ve yaşam tarzını da içeren birçok faktörden etkilenmektedir (Şekil 14) [5].



Şekil 14. İnsülin direnci, metabolik sendrom ve aterosklerozda adiponektinin etkisi. Genetik (adiponektin geninde SNP 276) veya çevresel faktörlerden (sedenter yaşam, beslenme sitali vb.) dolayı adiponektin seviyesinde azalma meydana gelebilir. Adiponektin seviyesindeki bu azalma tip2 diyabet, insülin direnci ve metabolik hastalıkların oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Dahası adiponektin seviyesindeki azalma direkt olarak ateroskleroz gelişmesinde önemli rol oynamaktadır [5].

2.3.5.1. Adiponektinin İnsülin Duyarlastırıcı Etkisi

Genetik veya çevresel etkilerden dolayı dolaşımdaki adiponektin seviyesinde meydana gelen düşüş, diyabet ve metabolik sendromun gelişmesine neden olmaktadır [5, 81]. Adiponektinin, insülin duyarlastırıcı etkisinin moleküler mekanizmalarının altında AMPK ve PPAR'lar bulunmaktadır. Adiponektin, kasta AMPK'yı aktive ederek ve asetil-koA karboksilazı inhibe ederek glukoz transportunu ve yağ asidi oksidasyonunu artırır. Adiponektin aynı zamanda PPAR α 'yı aktive ederek karaciğer ve iskelet kasında yağ asidi ve enerji tüketimini artırır. Böylece karaciğer ve kasta trigliserid miktarı azalır ve insülin duyarlılığı artar [5, 96].

Çok sayıda çalışmada adiponektinin insülin duyarlastırıcı rolünün özellikle HMW formu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir [76]. Hem diyabetik farelerde hem de insanlarda TZD gibi insülin duyarlastırıcı ilaçlarla tedavi sırasında HMW adiponektinin total adiponektin miktarına oranı insülin duyarlılığı ile pozitif bir korelasyon göstermiştir [5]. Bundan dolayı; HMW adiponektinin insülin direnci, metabolik sendrom ve tip2 diyabet için önemli bir biyomarker olabileceği düşünülmektedir [5].

Tip 2 diyabet teavisinde yaygın olarak kullanılan TZD'lerin plazma adiponektin seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir [113]. İnsülin direncinin TZD'ler

tarafından düzeltilmesinin altında yatan adiponektine bağımlı ve bağımsız yollar şeklinde 2 mekanizmanın bulunduğu ileri sürülmüştür. TZD'ler adiposit farklılaşmasını değiştirmeden Adiponektin gen transkripsiyonunun aktivasyonunu sağlayarak adiponektin seviyelerini yükseltmektedir [114]. Böylece adiponektin sinyalizasyonunda bulunan AMPK aktivasyonu artar. Aktif AMPK karaciğerde glukoneojenezi düşürerek insülin direncini ve tip 2 diyabeti düzeltmektedir. Diğer taraftan adiponektinden bağımsız olarak TZD'ler adiposit farklılaşmasını indükleyerek, küçük adipositlerin sayısını artırarak [115, 116] ve TNF- α ve resistin ekspresyonunu düşürerek, iskelet kasında insülin direncini düzeltmektedir [117].

2. 4. Adiponektin Sinyalizasyonu

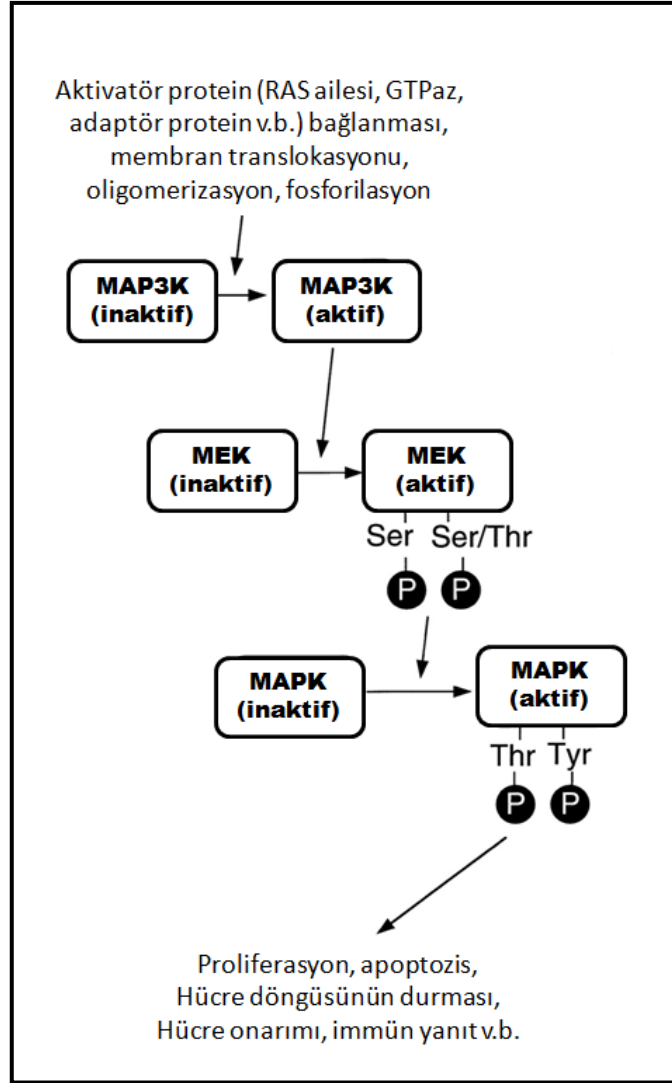
Adiponektin etkilerini sinyal yolağında bulunan p38 MAPK ve PPAR α üzerinden gösterir [91, 119, 120].

Adiponektinin yağ asidi oksidasyonu stimüle etmesi PPAR α üzerinden gerçekleştirilir. PPAR α peroksizomal ve mitokondriyal β -oksidasyon da rol alan genlerin ekspresyonunu regüle eder [121, 122]. p38 MAPK inflamatuvar sitokinler tarafından uyarılır ve immün yanıtın aktivasyonunda önemli rol oynar. p38 MAPK aktivitesinin artması PPAR α 'nın lipid oksidasyonundaki rolüne pozitif olarak etki eder.

2.4.1. MAPK (Mitojen-Aktive Protein Kinaz) Yolağı

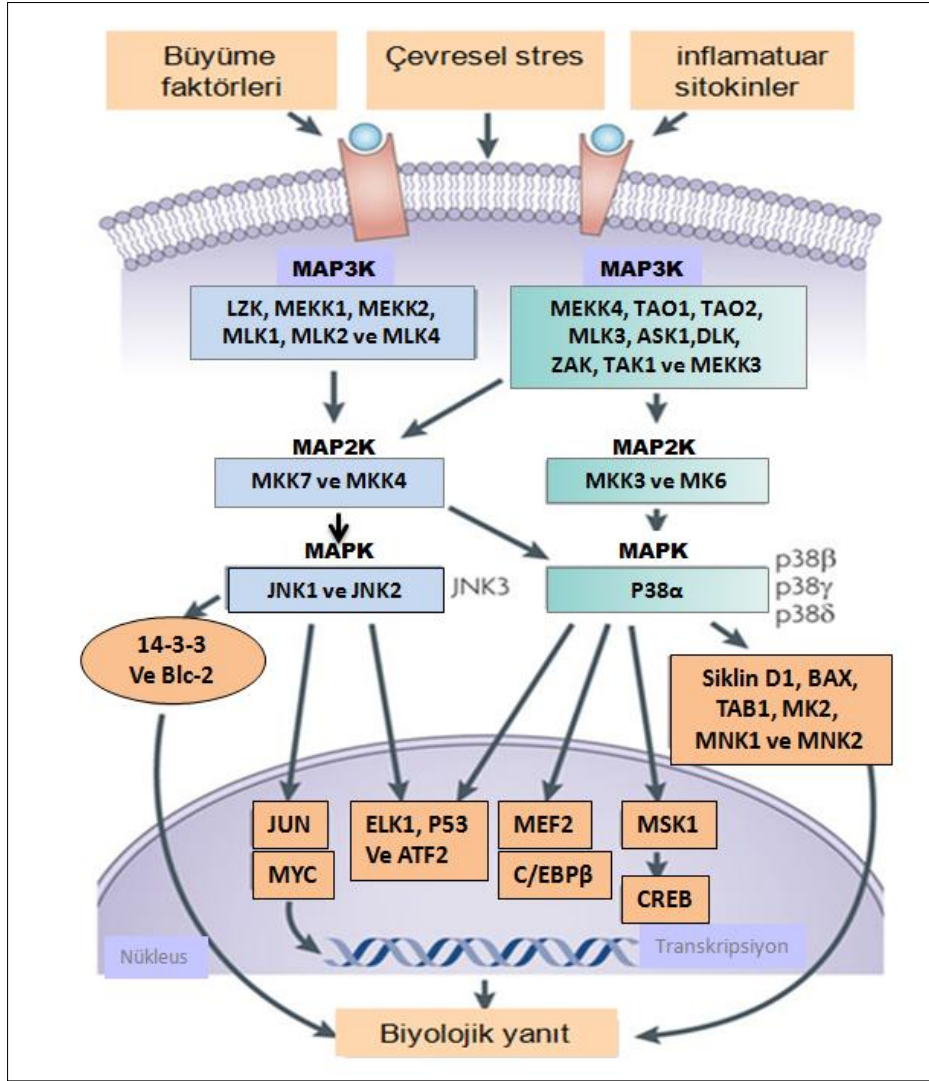
MAP kinazlar en çok çalışılan sinyal yollarından biridir. Hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve hücre bölünmesi gibi birçok biyolojik süreçte rol oynarlar [67, 123]. Ayrıca MAPK'lar inflamatuvar sinyalleri hücre yüzeyinden nükleusa taşıyarak, immün aracılı inflamatuvar yanıtta önemli görevler üstlenirler [123].

MAP kinazlar serin/treonin kinaz ailesine aittir [124]. Bu sitoplazmik proteinler özellikle metabolizmayı, büyümeyi, apoptozisi kontrol eden diğer intrasellüler proteinleri serin ve treoninden fosforilasyonunda kilit rol oynarlar [67]. Aynı zamanda MAP kinazların kendilerinin aktiviteleri için de treonin ve tirozin kısımlarının fosforlanmaları gerekmektedir [67, 123]. Bu sinyal yolağı üç tane kinaz içerir. MAP-kinaz kinaz kinaz (MAPKKK), MAP kinaz kinaz (MAPKK) ve MAPK. [67]. Bu sinyal kaskatlarından, sinyalin geçmesi sırasıyla MAPKKK, MAPKK ve MAPK aktivasyonu gerektirir [125, 126]. MAPK aktivitesi, MAPKK tarafından aktivasyon lobundan bulunan Thr-X-Tyr dual fosforilasyonu ile stimüle edilir. MAPKK aktivitesi ise serin/treonin MAPKKK tarafından regüle edilir (Şekil 15) [67].



Şekil 15. MAPK sinyal yolağının aktivasyonu. Tüm MAPK'lar üç kademeli sinyal iletim mekanizmasına sahiptir. Bu sinyal yolağında MAPK'lar kinaz bölgesinin aktivasyon alt bölgesinde yer alan korunmuş Thr-X-Tyr motiften serin ve treonin fosforilasyonu ile aktive olurlar. MAPK fosforilasyonu ve aktivasyonu; MAPK/ekstrasellüler sinyal düzenleyici (ERK)- kinazlar (MEK ya da MKK) tarafından katalizlenir. MEK'ler ise birçok protein kinaz ailesi (bunlar toplu olarak MAP3K'lar olarak adlandırılır) tarafından sırayla serin/treoninden fosforlanır [127].

MAP kinazlar ilk olarak memeli hücrelerinde ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinazlar (ERKs) ailesinin üyesi tanımlanmıştır [124, 127]. MAPK ailesi temel olarak üç grup içerir: ERK, c-Jun amino-terminal kinazlar (JNKs) ve p38MAPK [125]. Bu serin/treonin kinazlar fosforilasyon kaskadı ile regüle olup ve birçok uyarıcı tarafından aktive olurlar. ERK, mitojenler tarafından regüle edilir ve bu yolağı özellikle hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü için önemlidir. p38MAPK ve JNK MAPK, UV'den sitokinlere kadar çeşitli stres uyaranları tarafından stimüle edilir ve apoptoziste rol alırlar (Şekil 16) [128].



Şekil 16. MAPK sinyal yolağı. MAPK’lar çevresel stres (UV, osmotik şok v.b.) , büyüme faktörleri ve inflammatuar sitokinler tarafından aktive edilir. JNK ve p38 MAPK’ın bu sinyal yolağında birçok aktivatörü (MAP2K ve MAP3K ailesinin üyeleri) tanımlanmıştır. Bu sinyal yolağının hedefleri arasında hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında yer alan efektörler ve transkripsiyon faktörleri bulunur [129].

2.4.1.1. p38 MAPK

p38 MAPK; inflamasyon, hücre büyümesi, hücre farklılaşması, hücre ölümü ve immün yanıtta regülatör olarak fonksiyon gösterir [61, 123, 125, 128, 130]. p38 MAP kinazın; p38 α , β , γ ve δ olmak üzere dört tane izoformu mevcuttur [61, 123, 126].

p38 MAPK stres sinyalleri, büyüme faktörleri, inflammatuar sitokinler, UV, ısı ve osmatik şok gibi etkenlere yanıt olarak aktive olur [61, 125, 131]. p38 MAPK stresle indüklendikten sonra sırasıyla MAPKKK, MAPKK ve son olarak da MAPK’a doğru ilerleyen bir fosforilasyon kaskadı başlar [126]. MKK3 ve MKK6, p38 MAPK’a spesifik MEK’lerdir. Aktive olan p38 birçok transkripsiyon faktörünü

aktive eder ve fosforlar. p38 MAPK hedefleri arasında protein kinazlar ve transkripsiyon faktörleri bulunur [127].

p38 MAPK'in aktivasyonu çoğu zaman hücre ölümüne yol açmaktadır. Buna ek olarak hücre bölünmesi sırasında; hücre kontrol noktalarında (checkpoint) fonksiyon gösterdiğine dair yeni çalışmalar mevcuttur [125].

p38 MAPK, metabolik homeostazın devamı için hayati öneme sahip bir enzimdir. Anormal p38 MAPK aktivasyonu, kronik inflamasyon uyarımlı insülin direncine neden olabilir. Çünkü p38 MAPK aktivasyonu insülin, egzersiz ve adiponektin uyarımlı glukoz ve lipid kullanımı için gereklidir [94, 132]

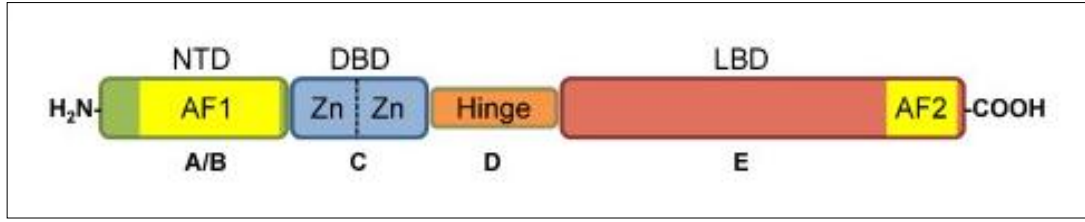
Ayrıca p38 MAPK, PPAR γ 'yı inhibe ederek adipogenezde negatif rol oynar [91, 93].

2.4.2. PPAR

PPAR'lar ligandla aktive olan ve nükleer reseptör süper ailesine ait transkripsiyon faktörleridir [24, 133-136]. Nükleer reseptörler; gelişme, çoğalma, büyüme, kanser, inflamasyon, immün fonksiyon, metabolizma ve apoptozis gibi birçok biyolojik süreçte rol oynamaktadır [133]. PPAR ailesi PPAR α , PPAR β /delta, PPAR γ 1 ve PPAR γ 2 izoformlarını içermektedir [137]. PPAR'lar ilk defa 1990 yılında keşfedilmiştir [138]. PPAR ismi, ilk bulunan PPAR üyesi olan PPAR α 'nın rodent hepatositlerinde peroksizomların proliferasyonunu indüklediği için verilmiştir. Fakat bu fonksiyon diğer PPAR izoformlarında (PPAR γ ve PPAR δ) gözlenmemiştir. PPAR izoformları daha çok yağ asidi sentezi, oksidasyonu ve depolanmasında, ayrıca karbohidrat metabolizmasında başlıca regülatörler olarak fonksiyon göstermektedirler [24, 134, 137, 139].

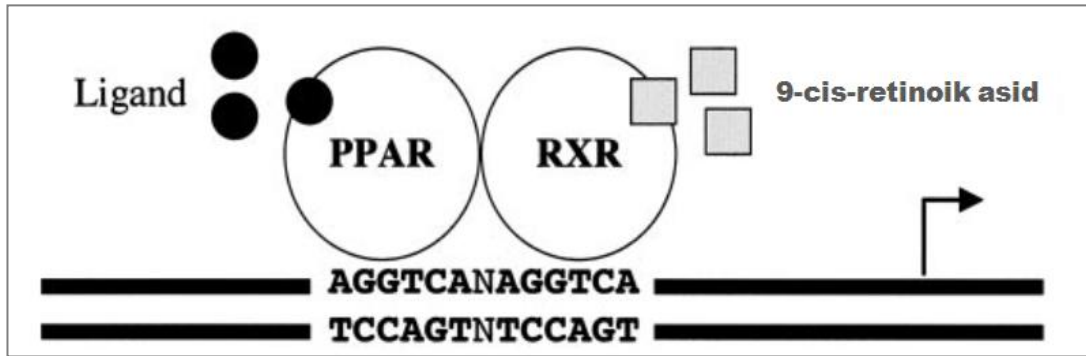
2.4.2.1. PPAR'ların Yapısı

PPAR'lar steroid ve tiroid hormon reseptörleri gibi diğer nükleer reseptörle benzer yapısal özellikleri içerir [24, 133, 134]. PPAR'lar DBD (DNA bağlanma bölgesi)'de bulunan iki çinko parmak sayesinde DNA ya bağlanır ve LBD (ligand bağlanma bölgesi)'de bulunan ligand bağlayıcı cepler ile ligandına bağlanır (Şekil 17) [133, 140].



Şekil 17. PPAR'ların yapısı. N-terminal bölge (NTD, A/B bölgesi) ligand bağımsız aktivasyon fonksiyonu (AF1) içerir. DNA-bağlanma bölgesi (DBD, C bölgesi) iki çinko parmak içermektedir bu DNA'ya bağlanmayı sağlar. D bölgesi (Hinge region) yüksek derecede esnektir. Ligand bağlanma bölgesi (LBD, E bölge) ligand bağımlı aktivasyon fonksiyonunu (AF2) içermektedir [133].

PPAR'ların DNA'ya bağlanabilmesi için retinoid X reseptör (RXR) ailesinin üyeleri ile dimerizasyona uğraması gerekmektedir [133, 134, 137, 141]. PPARlar DNA'da PPREs (PPAR yanıt elementleri) olarak isimlendirilen spesifik DNA yanıt elementlerine bağlanır (Şekil 18) [24, 134, 141].



Şekil 18. PPAR-RXR heterodimeri [24].

PPRE'ler AGGTCANAGGTCA sekansını içerir [24, 140]. PPAR'ların transaktivasyonu, ligand bağımlı transaktivasyon fonksiyonu C-terminal bölgede aktivasyon fonksiyon 2 (AF2) aracılığı ile olurken ligand bağımsız transaktivasyonu N-terminal bölgede aktivasyon fonksiyon 1 (AF1) tarafından gerçekleştirilmektedir [133, 134].

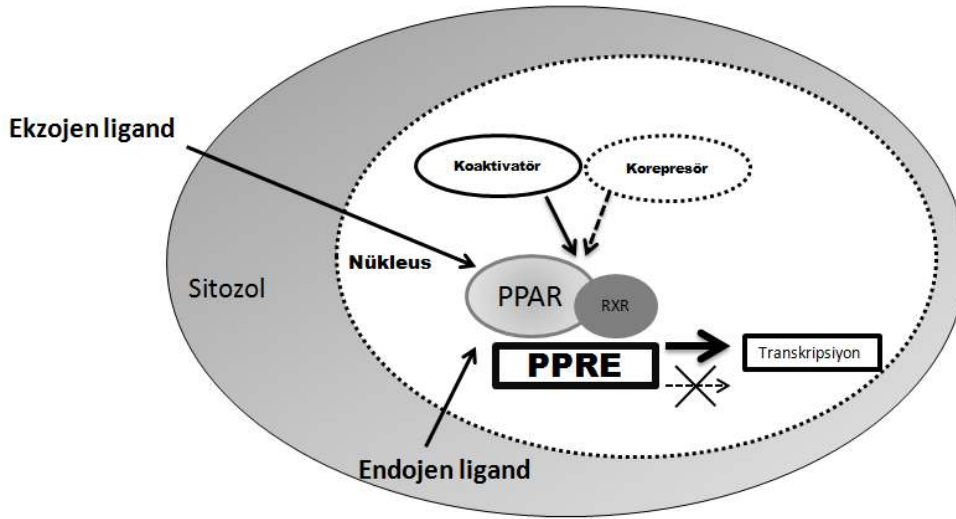
C-terminal bölgesi aynı zamanda RXRα ile dimerizasyondan ve ko-aktivatör proteinlerinin bağlanmasından sorumludur [24, 134]. PPAR'ların ligand bağlayıcı cebine ligand bağlandığı zaman; LBD'nin C-terminal heliks (heliks 12) açık pozisyonda kilitlenir ve hidrofobik bir kavite oluşur. Bu hidrofobik kavite birçok ko-aktivatörde bulunan LXXLL motif ile etkileşime geçer. Böylece bu hidrofobik kavite aracılığı ile histon asetiltransferaz (HAT), histon metiltransferaz (HMT) gibi birçok ko-aktivatör ile LBD direk etkileşime geçer [133]. Agonist yokluğunda ko-aktivatör ve ko-represörler LBD ile etkileşime geçer ve dengeli bir değişim söz konusudur.

Agonist varlığında ise; heliks12 pozisyonundaki değişim ko-aktivatör-LBD arasındaki etkileşimi sabitleştirir ve böylece AF2'deki transaktivasyon artar [133]. Ko-aktivatör ve ko-represör arasındaki değişim TBL1 (transdusin β -like 1) ve TBL1-ilişkili protein1 (TBLR1) aracılığı ile olmaktadır [133]. Transkripsiyonal aktivatörler olarak etki etmelerinin yanı sıra PPAR'lar aynı zamanda bazı hedef genlerin ekspresyonunu baskılamaktadırlar [133, 134].

Çok sayıda endojen PPAR agonistleri tanımlanmaktadır. Bunlar birçok doymamış yağ asitleri [134], dallı zincirli yağ asitleri, okside olmuş yağ asitleri, nitro-yag asitleri, eikozanoidler, fosfolipidler ve serotonin metabolitleridir [133, 134, 142]. PPAR'lar geniş Y şeklindeki ligand bağlayıcı cepleri sayesinde çok sayıda ligand ile etkileşime geçebilir [143]. Bundan dolayı doğal ve sentetik birçok ligandları mevcuttur.

2.4.2.2. PPAR'ların Aktivasyonlarının Düzenlenmesi

PPAR'ların aktivasyonu sadece ligand ile düzenlenmemektedir. Bunun dışında RXR, PPRE'ler ve koaktivatörlerde PPAR'ların transkripsiyonal aktivitesini düzenlemektedir (Şekil 19) [140].



Şekil 19. PPAR'ların gen transkripsiyonu. PPARlar ligand bağlayıcı bölgeinden RXR ile heterodimerizasyona uğrar ve ardından DNAdaki spesifik bölgeye (PPREs) bağlanır. Bu durum koaktivatörün olmasını gerektirmektedir. Sonuç olarak da genlerin transkripsiyonu artar [140].

Birçok protein, koaktivatör veya korepresör olarak davranarak nükleer reseptörlerin transkripsiyon süreçlerini baskılar veya başlatır. Bunlar nükleer reseptörlerin ligand bağlayıcı bölgesi ile etkileşime geçer. Ligand ile bağlanmamış ve

heterodimerizasyona uğramış olan nükleer reseptör histon deasetilaz, nükleer reseptör ko-represör (NCoR) ve retinoid ve tiroid hormon reseptörleri için gen suretücü mediyatör (SMRT) ile etkileşime geçer [140]. Histonlar deasetilasyona uğradıkları zaman transkripsiyon inhibe olur.

PPAR'ların transkripsiyonal aktiviteleri fosforilasyon [69], übikütinasyon ve sumolasyon (SUMO 'Small ubiquitin like motif') mekanizmaları ile de regüle edilmektedir [27].

- PPAR γ 2'nin AF2 bölgesinde 112 pozisyonda bulunan serin amino asidinden büyüme faktörleri ya da stres uyarımlı (p38/jun NH2-terminal kinaz1/2) fosforilasyonu PPAR γ 'nın transkripsiyonal aktivitesini baskılamaktadır [134].
- PPAR γ , AF1 bölgesinde 107. pozisyonda bulunan ve AF2 bölgesinde 395. pozisyonda bulunan lizin amino asidinden sumolasyona uğrar ve transkripsiyonal aktivitesi düzenlenir. PPAR γ 'nın 107. pozisyondaki amino asitten sumolasyonu transkripsiyonal aktivitesini baskılar [134].
- Ayrıca PPAR γ poli-übikütinasyona uğrayabilir. Übikütinasyondan sonra PPAR γ proteozomal degradasyona maruz kalır [134].

2.4.2.3. PPAR α

PPAR α 'nın Dokulardaki Dağılımı:

PPAR α temel olarak yağ asidi oksidasyonunun yüksek olduğu iskelet kası, hepatositler, kardiyomiyositler ve böbrek korteksinde eksprese olurlar [24, 135, 137, 144].

PPAR α Ligandları:

PPAR α üç izoform içinde doymamış yağ asitlerine en yüksek afiniteyle bağlanan PPAR izoformudur. Doymuş yağ asitleri doymamış yağ asitlerine göre PPAR α için daha düşük bir affiniteye sahiptir [24].

PPAR α doğal ligandlarına ek olarak sentetik ligandlarıyla da etkileşime geçebilir. Bu sentetik ligandlarının arasında klofibrate, fenofibrate ve bezafibrate bulunmaktadır.

PPAR α 'nın Lipid Katabolizmasındaki Rolü:

Yağ asitlerinin, PPAR'lar için endojen ligandlar oldukları saptandıktan sonra, lipid homeostazının moleküler düzeyde çalışılabileceğine dair yeni yaklaşımlar ortaya atılmaya başlandı [135]. Diyetle alınan lipidler, PPARların

ligandları olarak fonksiyon gösterip tüm vücudun lipid homeostazını etkilemektedir [135]. Hepatik yağ asidi oksidasyonunda, peroksizomal oksidasyonda ve mitokondriyal oksidasyonda yer alan genlerin birçoğu PPAR α 'nın hedefleridir.

Karaciğer vücudun ihtiyacına göre enerji kaynaklarının kullanıldığı veya depo edildiği, metabolik etkileşimlerin gerçekleştiği bir organdır. Açlık esnasında enerji kaynakları karbohidrattan yağa doğru kayar. Daha önce adipositlerde depo edilmiş olan yağ asitleri açlık durumunda karaciğer tarafından alınır. Burada ya tekrardan esterleşip trigliserid formuna dönüştürülüp VLDL yapısında toplanır ya da β -oksidasyon ile yıkılıp keton cisimciklerinin oluşumunda kullanılır [135]. Karaciğerde PPAR α 'nın aktivasyonu, FATP ve uzun zincirli açıl-koA sentaz ekspresyonunu indüklemektedir [24].

Açıl-KoA oksidaz gibi birçok kilit enzim peroksizomal β -oksidasyon da rol oynar. Bu enzim aynı zamanda PPAR α 'nın direk hedeflerinden biridir [24]. Peroksizomal β -oksidasyon her zaman direk enerji sağlamaz fakat uzun zincirli yağ asitlerinin kısalmasını sağlar. Böylece; mitokondriyal β -oksidasyon a girebilmeleri mümkün olur. PPAR α 'nın aktivasyonu, mitokondriyal β -oksidasyon da önemli bir adım olan açıl-KoA dehidrogenazın ekspresyonunu ve keton sentezinde yer alan hidroksimetilglutaril KoA sentaz ekspresyonunu stimüle eder [24].

İnsan ve rodentlerin iskelet kasında PPAR α , pirüvat dehidrogenaz kinaz 4 (PDK4) gen ekspresyonunu ve aktivitesini stimüle ettiği daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. PDK4, pirüvat dehidrogenazı fosforileyerek inaktif hale getiren bir kinazdır. Aktif pirüvat dehidrogenaz, pirüvatı asetil-KoA ya dönüştürerek, glukoz karbonlarının oksidasyonunu desteklemektedir. Böylece laktat oluşmaz ve glukoz karbonlarından hepatik glukoz üretilebilir. İskelet kasında, diyabet ve açlık yağ asidi miktarının artmasına neden olur ve bu durum PPAR α 'nın aktivitesini indükler. Aktive olan PPAR α PDK4 ekspresyonunu artırır. Sonuç olarak PDK4, pirüvat dehidrogenazı inaktive eder ve glukoz karbonları bölünmeye devam eder [24].

Özellikle kalpte ve karaciğerde artmış olan yağ asidi oksidasyonu ve direk olarak PDK4 ekspresyonunu artırarak ya da indirekt olarak keton cisimciklerinin sentezini artırarak glukoz bölünmesinin sağlanması; PPARların ligandlarının (fibrateler) lipid düşürücü etkisini ve bazı durumlarda dokularda lipid birikimini önleyerek (lipid oksidasyonunu aktive ederek) insülin duyarlılığını geliştirebileceğini göstermektedir [24].

2.4.2.4. PPAR γ

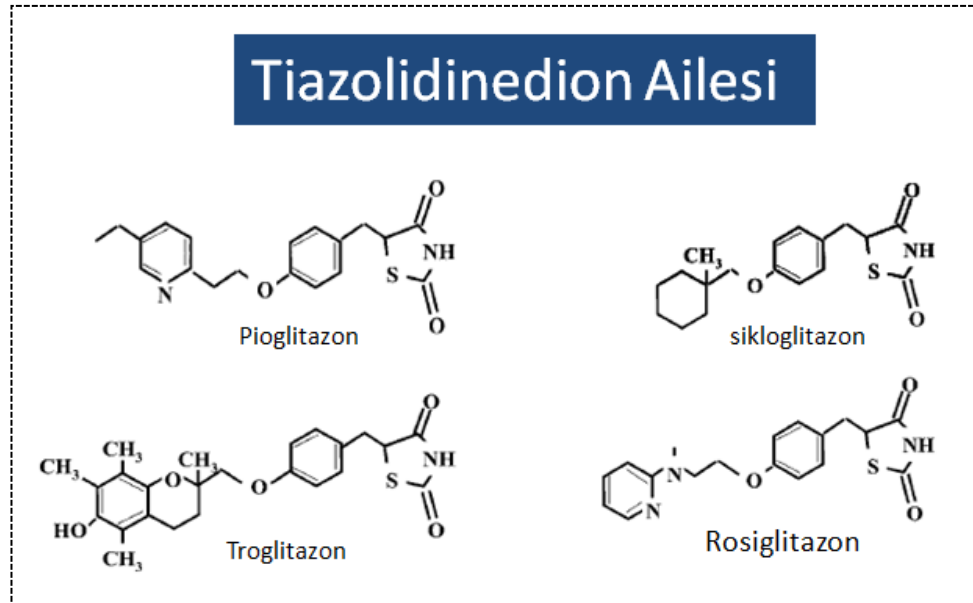
Dokulardaki Dağılımı:

PPAR γ temel olarak kahverengi ve beyaz yağ dokusunda eksprese olur [135, 141]. PPAR γ , aynı zamanda immün hücrelerinde (monosit, makrofaj), kolon mukozasında ve plasentada da bulunur [24]. İskelet kasında ise yok denecek kadar az miktardadır.

PPAR γ Ligandları:

Linoleik asit, araşidonik asit ve eikosapentatenoik asit PPAR γ 'nın endojen ligandlarıdır. Ayrıca 15-deoksi-delta12-14-PGJ2 (15d-PGJ2) gibi prostoglandinle ilgili komponentler ve 9-HODE, 13-HODE, 15-HETE gibi okside olmuş lipid türleri de PPAR γ 'nın etkili aktivatörleridir [140].

TZD'ler, tip 2 diyabette kan glukoz seviyesini düşüren ve insülin duyarlılığını geliştiren sentetik PPAR γ ligandlarıdır [69, 136]. TZD'ler tip 2 diyabet ile ilişkili insülin direnci olan hastalara verilir [145, 146]. TZD'ler insülin duyarlılığını geliştirerek kan glukoz düzeyini ayarlar [69]. Bunlar troglitazon, siglitazon, pioglitazon ve rosiglitazon'dur (Şekil 20) [136, 140].



Şekil 20. PPAR γ 'nin tiazolidinedion (TZD) ailesindeki ligandları. Pioglitazon ve rosiglitazon oral antidiabetik ilaçlar olarak tip2 diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [24].

TZD'ler temel olarak adipoz dokuda, PPAR γ aktivitesini artırarak insülin duyarlılığını geliştirir. Adipoz dokuda PPAR γ 'nın aktive olması dolaşımdaki serbest yağ asidi miktarının düşmesini, lipidin yağ dokuda birikmesini sağlar. Böylece karaciğer ve kasta lipid birikimi azalır ve adiponektin miktarı artar [74].

PPAR γ 'nın Hedef Genleri:

PPAR γ 'nın hedef genleri arasında esterleşmemiş yağ asidi oluşturan LPL, gliserolun adipositlere transportunu sağlayan akuaporin 7 bulunmaktadır [147].

Fonksiyonel Plasenta ve Embriyo Gelişiminde PPAR γ 'nın Rolü:

PPAR γ plasentanın sinsisyotrofoblast ve sitotrofoblast hücrelerinde eksprese olmaktadır. PPAR γ aktivasyonu gebelik ve fetal gelişim esnasında gerekli olan hormon ve ürünlerin sekresyonu ve üretimini stimüle etmektedir [149]. Ayrıca PPAR γ , embriyonun endometriyuma tutunmasında/gelişmesinde ve plasental fonksiyonda önemli görevler üstlenir [149]. Bundan dolayı; PPAR γ fonksiyonel plasentanın olgunlaşması için esansiyeldir [150]. PPAR γ 'nın inaktivasyonu plasental damarlanmanın zarar görmesine neden olur [149]. Bu durum embriyo ölümü ile sonuçlanır. Gebelik kaybı plasenta hücresinde PPAR γ eksikliği giderildiği zaman önlenabilmektedir. Plasental gelişimdeki benzer anormallikler RXR γ farelerde gözlenmiştir. Bu durum plasentasyon için PPAR γ -RXR α heterodimerinin gerekli olduğunu göstermektedir [31, 149].

PPAR γ ve Adiposit Biyolojisi:

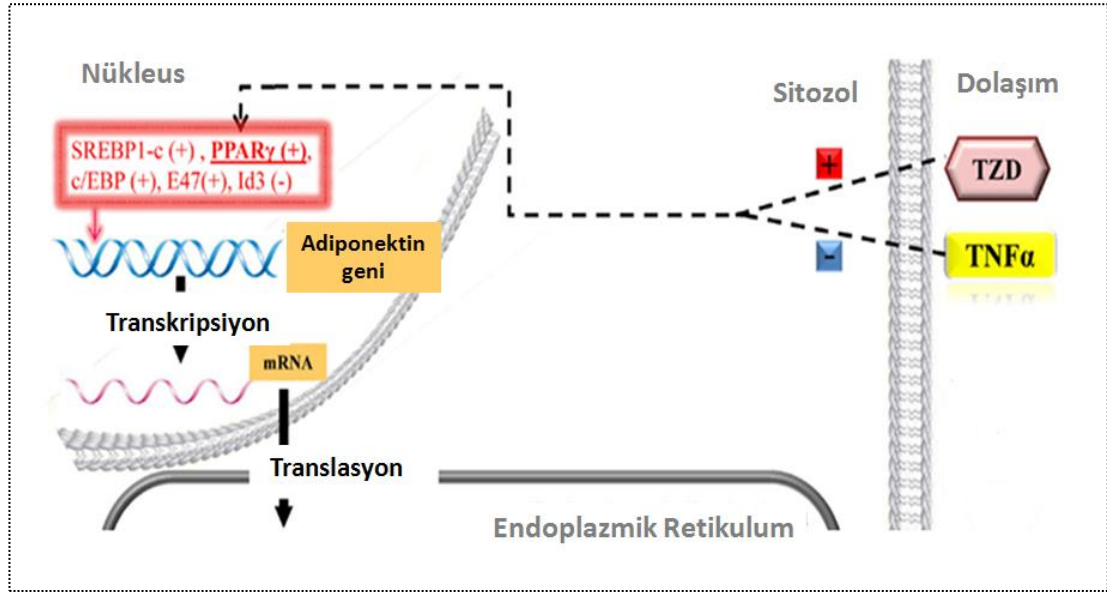
Adiposit; hormonal sinyallere yanıt olarak, kan lipid düzeyinin düzenlendiği ve lipidin depo edildiği ana bölgedir. PPAR γ lipid sentezi, depolanması ve transportunda yer alan birçok genin ekspresyonunu kontrol eder [27]. PPAR γ adipogenezin major regülatörlerindendir. PPAR γ bu dokularda yüksek miktarda eksprese olmakta ve fibroblastların adipositlere farklılaşmasında rol oynamaktadır [135]. Olgun adipositlerdeki PPAR γ , tüm vücudun insülin duyarlılığını etkileyebilir [145, 148].

PPAR γ ve Adiponektin Seviyesi Arasındaki İlişki:

Adipositlerden, adiponektin sekresyonunu regüle eden major regülatörlerden biri de PPAR γ 'dır. Hayvan modellerinde, hastalarda ve hücre kültüründe yapılan çalışmalarda PPAR γ aktivitesindeki değişimin, adiponektin hormon seviyesindeki değişim ile bağlantılı olduğu bulunmuştur [141, 153].

I. Farmakolojik Kanıtlar:

Adiponektinin multimerizasyonunu, sekresyonunu ve ekspresyonunu düzenleyen major regülatör TZD gibi PPAR γ agonistleridir [89]. Diyabetik hastalar TZD ile tedavi edildikten sonra dolaşımdaki adiponektin seviyesinin arttığı rapor edilmiştir. TZD'ler bilindiği gibi PPAR γ için yüksek afiniteye sahip ligandlardır [79, 153]. Bundan dolayı, TZD'lerin metabolik etkilerinin çoğunu PPAR γ 'yı aktive ederek gerçekleştirdikleri kabul edilmektedir. PPAR γ sentetik ya da doğal ligandlarına bağlandığı zaman transkripsiyonel aktivitesi stimüle edilir (şekil 21) [88, 134].



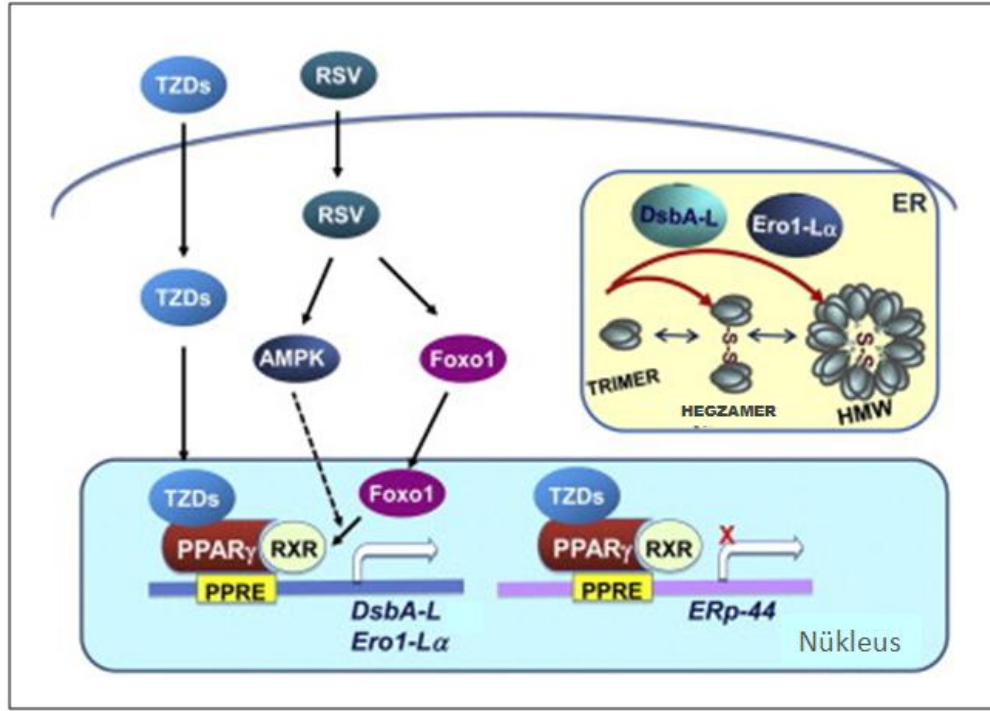
Şekil 21. TZD'ler, PPAR γ ve adiponektin arasındaki ilişki [88].

II. Şaperonlar:

PPAR γ , endoplazmik retikulumda bulunan Ero1-L α ve ERp44 şaperonlarını etkileyerek post-translasyonel modifikasyonlarla adiponektin seviyesini ve sekresyonunu up-regüle eder.

PPAR γ adiponektinin post-translasyonunda rol alan endoplazmik retikulum proteinlerinin ekspresyonunu artırır. PPAR γ agonistleri, özellikle ER oksidoredüktaz, Ero1-L α 'nın hücresel düzeyini önemli derecede artırır [89]. Ekspresyonu artmış olan Ero1-L α adiponektinin yapısındaki disülfid bağlarının oluşmasını sağlayarak, HMW adiponektin sekresyona hazır hale getirir. Böylelikle; Ero1-L α HMW adiponektinin sekresyonunu artırır (Şekil 22).

PPAR'lar ayrıca ERp44 şaperonunun ekspresyonunu etkileyerek adiponektin sekresyonunu etkiler. Adiponektinin 39. pozisyonda bulunan sistein amino asidinin tiyol grubu ile ERp44 arasında oluşan kovalent bağ adiponektini endoplazmik retikulumda alıkoyar [88, 154]. PPAR γ , ERp44'ün promotor bölgesinde PPRE'ye bağlanarak transkripsiyonunu direkt olarak baskılar. Böylece hücreden daha fazla adiponektin salınımı gerçekleşir (Şekil 22) [153].



Şekil 22. Adiponektinin posttranslasyonel modifikasyonunda ERp-44 ve Ero1-Lα molekülleri [89].

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

Bu çalışmada yapılan tüm deneyler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Deneylerde kullanılan sıçanlar, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilmiştir.

- Trizol, SuperScript™ III First-Strand Synthesis System, Platinum Taq DNA polymerase, Lizis tamponu, DNase I, Agaroza, 100 bp DNA standardı, DNase/RNase free distile su ve Jel yükleme tamponu Invitrogen'den
- Adiponektin Sıçan ELİSA kit'i Abcam'dan
- Glisin Sigma'dan
- Yağsız süt tozu, sekonder antikorlar Bio-Rad'dan
- Poliklonal RXR α antikor, PPAR α antikor, PPAR γ antikor, AdipoR2 antikor ve Santa Cruz'dan
- Monoklonal Adiponektin antikor, AdipoR1 antikor, fosfo-p38 MAPK antikor ve p-38 MAPK antikor Cell Signaling'den
- Nitroselüloz membran, kemilüminesans reaktifi, CL-XPosure Film ve protein marker Thermo'dan
- Developer ve Fiksatif Illfor'dan sağlandı.
- Primerler MWG Biotech firması tarafından sentez edildi.

3.2. Denekler

Bu araştırmada Akdeniz Üniversitesi 'Deney Hayvanları Ünitesi'nde yetiştirilen 6-8 haftalık, daha önce hiç deneye girmemiş ve ortalama ağırlıkları 250-300 g olan Rattus norvegicus ırkı 48 dişi ve 4 adet erkek ergin sıçan kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden, Akdeniz Üniversitesi, Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınarak (23.01.2012, Karar No:5) temin edildi. Erkek sıçanlar deney sonrasında deney hayvanları ünitesine geri iade edildi. Denekler standart diyet ve musluk suyu ile beslenerek, iki dişiye bir erkek olacak şekilde kafeste bir gece bırakıldıktan sonra ertesi sabah dişilerin vajinalarından vajinal sıvılar alınıp lamplara vajinal sıvı yaymaları (vajinal smear) yapıldı. Mikroskopta bakılan smear preparasyonları ile sperm taşıyan sıçanlar belirlendi ve bu hayvanların gebeliğin birinci gününde oldukları kabul edildi. Denekler plasental gelişimin gözlemlendiği gebeliğin farklı günlerinde (14, 16, 18 ve 20. günler) kullanıldı. Deney modelimiz kontrol (24 dişi) ve deney (24 dişi, diyabetik) grupları olmak üzere iki çalışma grubundan

oluşmaktadır. Gebe dişiler gebeliklerinin 14, 16, 18 ve 20. günlerinde eter anestezisi altında sakrifiye edildiler.

3.3. Diyabet Modelinin Oluşturulması

Diyabet grubunu oluşturacak olan dişi sıçanlar gebeliklerinin 7. gününde tek doz 50 mg/kg STZ intraperitoneal olarak enjekte edildi. Kan glukoz ölçüm cihazı kullanılarak 48 saat sonra kuyruk veninden kan şekerleri ölçüldü. Kan şekeri değeri 200 mg/dL'nin üzerinde çıkan dişiler diyabetik kabul edilerek deneye dahil edildi. Kontrol gruplarına STZ ile aynı miktarda serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı.

3.4. Doku Temini ve Hazırlanması

Gebeliklerinin 14, 16, 18 ve 20. günlerindeki kontrol ve diyabetik sıçanlar eter anestezisi altında bayıltılıp diseke edildikten sonra, embriyo ve plasentalar ayrı ayrı alındı. Embriyo ve plasenta ağırlıkları ayrı ayrı ölçüldü. Alınan plasenta örneklerinin bir kısmı PCR deneyleri için bir kısmı ise Western Blot çalışmalarında kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırıldı.

3.5. Western Blot

Western blot, kompleks bir karışım içerisindeki spesifik bir proteinin moleküler ağırlığına göre saptanması metodudur.

3.5.1. Kullanılan Solüsyonlar

Lizis tamponu:

50 mM Tris-HCl, pH7.4
150 mM NaCl
%0.3 Sodyum deoksikolat
1 mM EGTA
1 mM PMSF
1 mM Na₃VO₄
1 mM NaF
1 µg/mL Aprotinin
1 µg/mL Leupeptin
1 µg/mL Pepstatin

Yükleme tamponu:

%20 (v/v) Gliserol
%5 (w/v) SDS
%0.15 (w/v) Bromfenol mavisi
%3 2-Merkaptoetanol
63 mM Tris-HCl, pH 6.8

10 x Elektroforez tamponu:

30.29 g Tris-HCl, pH 8.7

150.14 g Glisin

10 g SDS

1 L'ye distile su ile tamamlandı.

10 x Transfer tamponu:

60 g Glisin

24.22 g Tris-HCl

1 mg/mL EDTA

2 L'ye distile su ile tamamlandı. Kullanım için 100 mL 10X transfer tamponu ve 100 mL metanol karıştırılıp 1 L'ye tamamlandı.

Yıkama tamponu (TBS-T):

Önce stok 10X TBS (tris-buffered saline) hazırlandı. Bunun için 60,55 g Tris ve 87,66 g NaCl 800 mL distile suda çözüldü. pH 7,4'e ayarlandıktan sonra son hacmi 1000 mL'ye tamamlandı. Kullanmadan önce 10X TBS'den 10 mL alınıp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 1mL %0.05 Tween 20 eklenerek TBS-T hazırlandı.

Bloklama solusyonu:

%5 (w/v) yağsız süt tozu yıkama solusyonu içerisinde çözüldü.

Tablo 1. Western blotta kullanılan SDS-poliakrilamid jeller

AYIRMA JELİ	%7.5 SDS-poliakrilamid jel	%12.5 SDS-poliakrilamid jel
Steril su	2000 µL	1320 µL
Ayırma Solüsyonu	1000 µL	1000 µL
Poliakrilamid (bis-akrilamid)	1000 µL	1650 µL
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	5 µL	5 µL
%10 Amonyum persülfat (APS)	30 µL	30 µL

TOPLAMA JELİ	% 5 SDS-poliakrilamid jel
Steril su	1155 µL
Toplama Solüsyonu	500 µL
Poliakrilamid (bis-akrilamid)	330 µL
TEMED	2,5 µL
%10 APS	15 µL

3.6. Deneyin Yapılışı

Doku temini esnasında kriyotüpler içine alınan ve sıvı nitrojende (-196°C) muhafaza edilen plasentalardan western blot deneyinde kullanılmak üzere lizatlar hazırlandı. Placenta örnekleri, içerisinde sıvı nitrojen bulunan havanda dövülerek dokuların tamamen parçalanması sağlandı. Toz haline gelen plasentalar mikrosantrifüj tüplerine alınarak ağırlıkları tartıldı. 0,2 g doku başına 600 mikrolitre lizis tamponu ve 10 mikrolitre proteaz inhibitör kokteyli olacak şekilde hesaplama yapılarak tüplere lizis tamponu ve proteaz inhibitör kokteyli konuldu. Tüplerin içindeki dokular homojenize edildi ve 15.000 rpm'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar alınıp pelet kısmı atılarak lizatlar hazırlandı. Hazırlanan lizatlar -20°C de muhafaza edildi.

Elde edilen süpernatantların protein konsantrasyonları, standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılarak Lowry yöntemi ile ölçüldü [155]. Eşit miktarlarda doku lizatı yükleme tamponu (Laemli tamponu) ile karıştırılıp 95°C’de 10 dakika kaynatıldı ve çalışılacak proteininin molekül ağırlığına uygun konsantrasyondaki SDS-poliakrilamid jellere (tablo 1) yüklenip elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonrası jel, plakalardan uzaklaştırıldı ve transfer sistemine alınarak nitrosellüloz membrana transfer edildi. Transferden sonra membran, bloklama solüsyonu (%5 lik yağsız süt tozu) içerisinde 1 saat oda ısısında bekletildi. Bloklama aşamasını takiben membran, primer antikor ile gece boyu 4°C’de bekletildi. Aynı ayrı kullanılan antikorların dilüsyonları: Adiponektin (1:500 dilüsyon), AdipoR1 (1:1000 dilüsyon), AdipoR2 (1:1000 dilüsyon), p38 MAPK (1:1000 dilüsyon), fosfo-p38 MAPK (1:1000 dilüsyon), PPAR α (1:1000 dilüsyon), PPAR γ (1:1000 dilüsyon) ve RXR α (1:1000 dilüsyon). Primer antikor aşamasını takiben membran üç defa 20 dakika TBS-T ile oda ısısında yıkandı. Böylece ortamdaki zayıf bağlanan veya bağlanmamış antikorlar uzaklaştırıldı. Yıkama aşamalarından sonra membran, bloklama solüsyonu içerisinde hazırlanan primer antikor türüne göre belirlenmiş sekonder antikor ile oda ısısında 2 saat inkübe edildi ve bu inkübasyonu takiben TBS-T ile üç defa 20 dakika yıkandı. Yıkama işleminden sonra, membran kemiluminesans reaktifi (Thermo) ile geliştirildi. Geliştirme işlemini takiben membran hiperfilme aktırılıp film, developer solusyonu ile geliştirilip fiksatif solusyonu ile fiksasyon işlemine tabi tutularak spesifik proteinler görüntülendi. Eşit protein konsantrasyonunun tespiti için nitrosellölüz membran strip solüsyonu (Thermo) ile muamele edilerek strip (western blot membranından primer ve sekonder antikorları soyma) edildi. Daha sonra β -aktin antikoruna ile muamele edildi.

3.7. Geri ("Revers") Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR, RNA’dan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi (geri transkripsiyon) ve cDNA’nın da standart PCR yoluyla çoğaltılmasıdır. PCR reaksiyonu, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir.

3.7.1 DNaz-muamelesi

RNA (3 μ g) 1U RQ1 RNaz-içermeyen DNaz I ile 37°C’de 15 dakika muamele edildi ve cDNA sentezi için kullanıldı.

3.7.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, Invitrogen’in Superscript III First Strand Synthesis System kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

DNaz ile muamele edilmiş olan 2 μ g RNA örneği, 1 μ L 50 ng/ μ L random hekzamer primerleri, 1 μ L 10 mM dNTP karışımı ile karıştırıldı. Toplam hacim

DEPC-ile muamele edilmiş su ile 10 µL'ye tamamlandı. Bu karışım 65°C'de 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda RNA/primer karışımına, 10XRT (revers transkripsiyon) tamponu, 25 mM MgCl₂, 0.1 M DTT, RNaseOUT (40 U/µL) ve Superscript III RT (200 U/µL)'den oluşan toplam 10 µL'lik cDNA sentez karışımı ilave edilip yavaşça karıştırıldı. Bu karışım, 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 50 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 85°C'de 5 dakika inkübe edilerek sonlandırıldı. Son olarak da bu karışımın üzerine 1 µL RNase H ilave edildi ve 37°C'de 20 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA'lar PCR için kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.7.3. PCR

Reaksiyon karışımı:

1 x PCR tamponu
0.2 mM dNTP
1.5 mM MgCl₂
10 µM Forward primer
10 µM Reverse primer
1 U Taq-polimeraz
2.5 µL cDNA
Steril distile su

Primerler:

Oligonükleotid primerler sıçan Adiponektin, AdipoR1, AdipoR2, PPAR α , PPAR γ ; RXR α ve β -aktin sekansı temel alınarak gen bankasından seçildi. İnternal kontrol olarak β -aktin kullanıldı. Kullanılan primerlerin sekansları, gen numaraları ve PCR sonucu açığa çıkan ürünün fragment büyüklüğü aşağıdaki tabloda belirtilmektedir (Tablo 2).

Tablo 2. RT-PCR deneyi için kullanılan oligonükleotid primerler

Gen	Forward primer	Reverse primer	Ürün (bp)
Adiponektin (GI: 326633221)	5'-ATGGCAGAGATGGCACTCCT-3'	5'-GGTGAAGAGAACGGCCTTGT-3'	389
AdipoR1 (GI: 46485455)	5'-CTACCTGCTACATGGCCACA-3'	5'-TGGAGAGGTAGATGAGCCGT-3'	398
AdipoR2 (GI: 83816890)	5'-TGTATTCTTCCTGTGCCTGG-3'	5'-TGAGAGACGATAATGGCTGC-3'	327
PPAR α (GI: 6981381)	5'-GCAATGCACTGAACATCGAG-3'	5'-GGCCTTGACCTTGTTTCATGT-3'	392
PPAR γ (GI: 223941861)	5'-CGTGGAAGCTGTGCAAGAGA-3'	5'-GCAGCAGGTTGTCTTGGATG-3'	377
RXR α (GI: 148747359)	5'-GGAACGAGAATGAGGTGGAG-3'	5'-GAGAAGGAGGCAATCAGCAG-3'	298
β -aktin (GI: 42475962)	5'-CATGAAGATCCTGACCGAGC-3'	5'-CAGACAGCACTGTGTTGGCA-3'	335

PCR reaksiyonu 50 µL'lik reaksiyon karışımında ve “thermal cycler”da (Bio-Rad) her bir gen için özgül olarak hazırlanan PCR programında gerçekleştirildi.

3.7.4. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA moleküllerinin agaroz jel üzerinde ayrılmasını sağlayarak analiz edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Ultraviyole (UV) ışık altında floresan etki gösteren etidyum bromür boyasının kullanımı ile DNA'nın jel üzerindeki yeri belirlenir.

3.7.4.1. Kullanılan Solüsyonlar

1X Tris Asetat EDTA (TAE) tamponu:

40 mM Tris, pH 7,2

20 mM Na-asetat

1 mM EDTA

%1.5 Agaroz solüsyonu: 1,5 g agaroz 100 mL 1 X TAE içerisinde çözüldükten sonra, mikrodalgada kaynatıldı. Jel oda ısısında yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine son konsantrasyonu 0,5 µg/mL olacak şekilde etidiyum bromür (10 mg/mL) ilave edildi.

Jel-yükleme tamponu:

%50 Gliserol

1 x TAE tamponu

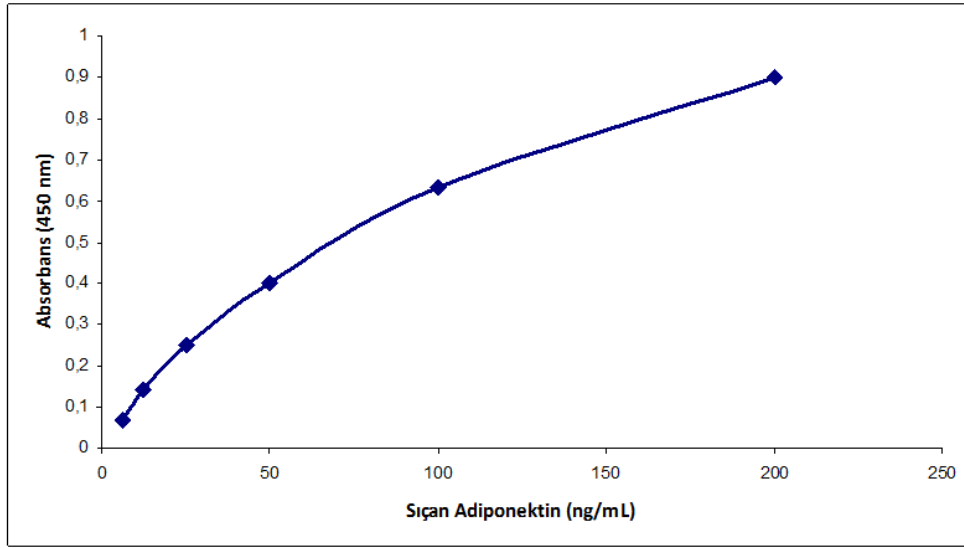
%1 Bromfenol mavisi

3.7.4.2. Deneyin Yapılışı

Jele yüklemeden önce örnekler jel-yükleme tamponu ile karıştırıldı. 5 µl 100 bp DNA standartı bir kuyucuğa yüklendi. Elektroforez sonrası elde edilen DNA bantları Bio-Rad Gel-Doc XR cihazında UV ışığı altında görüntülendi.

3.8. Serum Adiponektin Düzeyinin Ölçülmesi

Kontrol ve deney gruplarından kan örnekleri alındıktan sonra serumlar ayrıldı. Serum Adiponektin düzeyini ölçmek için Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemine dayalı "Rat Adiponektin ölçüm kiti" kullanıldı. 6,25-200 ng/mL arasında standart konsantrasyon aralığı kullanıldı ve sıçan adiponektin standart eğrisi oluşturuldu (Şekil 23).



Şekil 23. Sıçan adiponektin standart eğrisi.

3.9. İstatistiksel Analizler

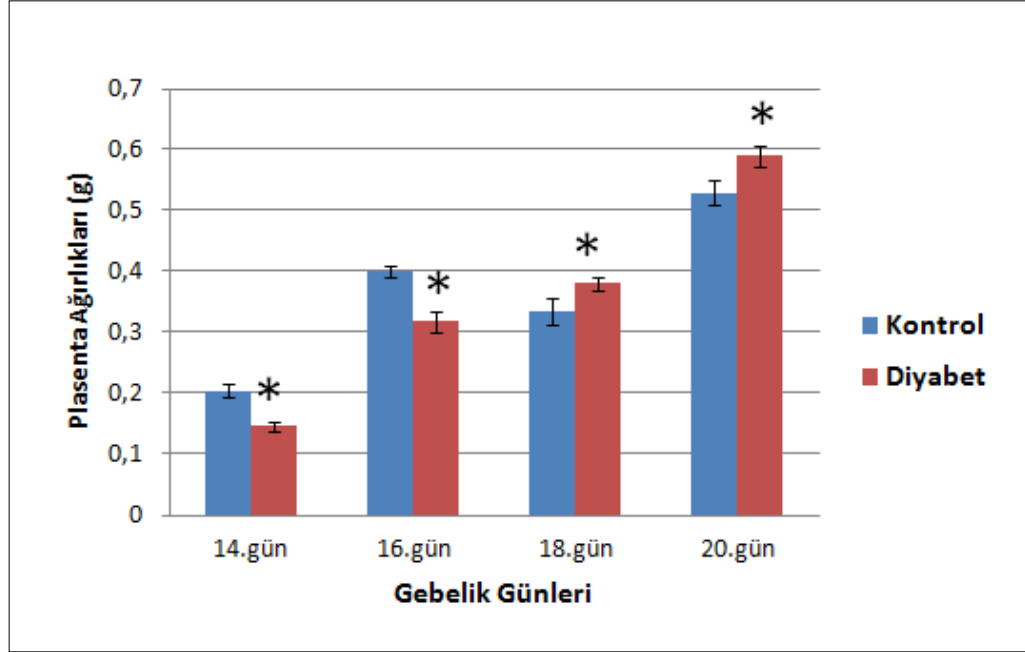
Kontrol ve deney gruplarına ait plasenta ve embriyo ağırlıkları hassas terazi ile ölçüldükten sonra gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek için SigmaStat 3.5 programı kullanılarak Student t-test uygulandı. $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Western blot ve RT-PCR deneyleri sonucunda kontrol ve deney gruplarına ait bantların yoğunlukları Alpha Digi Doc 1000 (Alpha Innotech Corporation, CA, USA) programı kullanılarak yapıldı. Elde edilen verilere, SigmaStat 3.5 programı ile Student t-test uygulandı ve gruplar arasındaki farklar değerlendirildi. $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Spektrofotometrik analiz sonucunda elde edilen ELİSA verilerine, SigmaStat 3.5 programı ile Student t-test uygulandı. Gruplar arasındaki farklar değerlendirildi. $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

4.1. Plasenta Ağırlıkları



Şekil 24. Gebeliğin 14-20. Günleri arası kontrol ve diyabet grubuna ait plasenta ağırlıkları

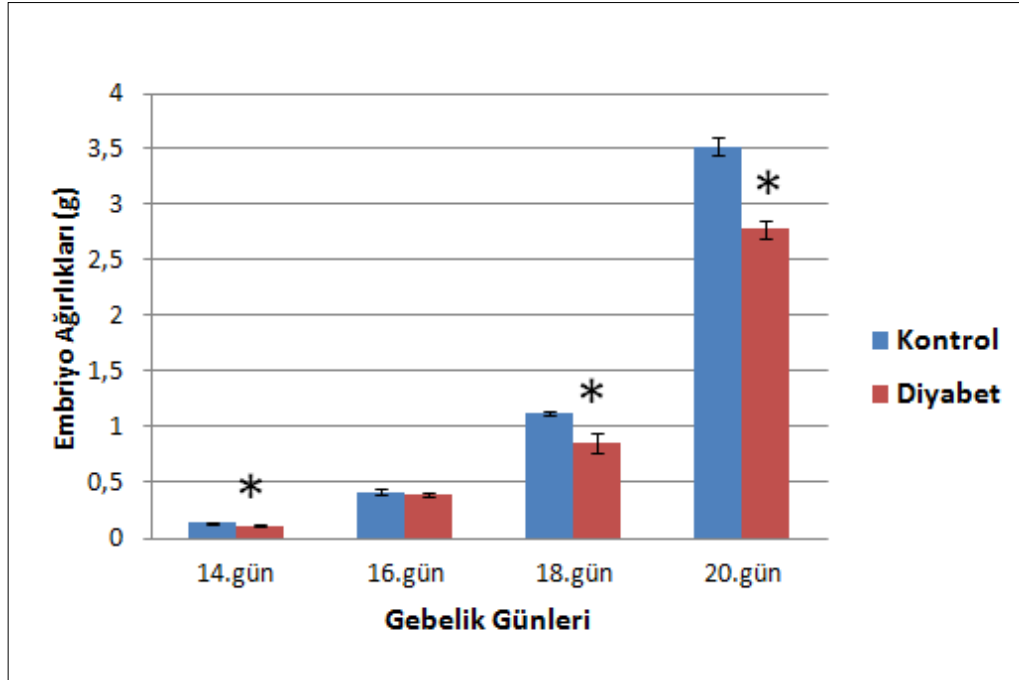
Kontrol ve diyabet grubuna ait plasentaların ağırlıkları ölçüldü ve gerekli istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Diyabet grubuna ait plasentaların gebeliğin 14. ve 16. günlerinde kontrol grubuna kıyasla daha küçük olduğu ve 18. gününden itibaren ise kontrol grubundan daha büyük olduğu gözlemlendi ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Plasental ağırlıklarda gözlenen bu farklar tüm günlerde istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 24, Tablo 3, * $p \leq 0,05$).

Tablo 3. 14-20. Günlr arası gruplara ait plasenta ağırlıkları (ortalama $\pm$ standart hata, p değeri)

Plasenta Ağırlıkları (g)		
Gebelik Günlri	Kontrol grubu	Diyabet Grubu
14	0,205 $\pm$ 0,0119 (n= 44)	0,147 $\pm$ 0,00777 (p $\leq$ 0,001)* (n= 45)
16	0,400 $\pm$ 0,0104 (n= 46)	0,319 $\pm$ 0,0180 (p $\leq$ 0,001)* (n= 42)
18	0,335 $\pm$ 0,0218 (n= 42)	0,383 $\pm$ 0,0105 (p = 0,034)* (n= 48)
20	0,530 $\pm$ 0,0198 (n= 48)	0,589 $\pm$ 0,0173 (p = 0,034)* (n= 40)

(Ortalama $\pm$ Standart Hata, p değeri)

4.2. Embriyo Ağırlıkları



Şekil 25. Gebeliğin 14-20. Günlri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait embriyo ağırlıkları (*p $\leq$ 0,05).

Kontrol ve diyabet grubuna ait embriyo ağırlıkları değerlendirildiğinde 14, 18 ve 20. günde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlemlendi.

Benzer şekilde 16. günde kontrol grubu ile kıyaslandığında bir azalma gözlemlendi fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 25, Tablo 4 * $p \leq 0,05$).

Tablo 4. 14-20. Günler arası gruplara ait embriyo ağırlıkları (ortalama $\pm$ standart hata, p değeri)

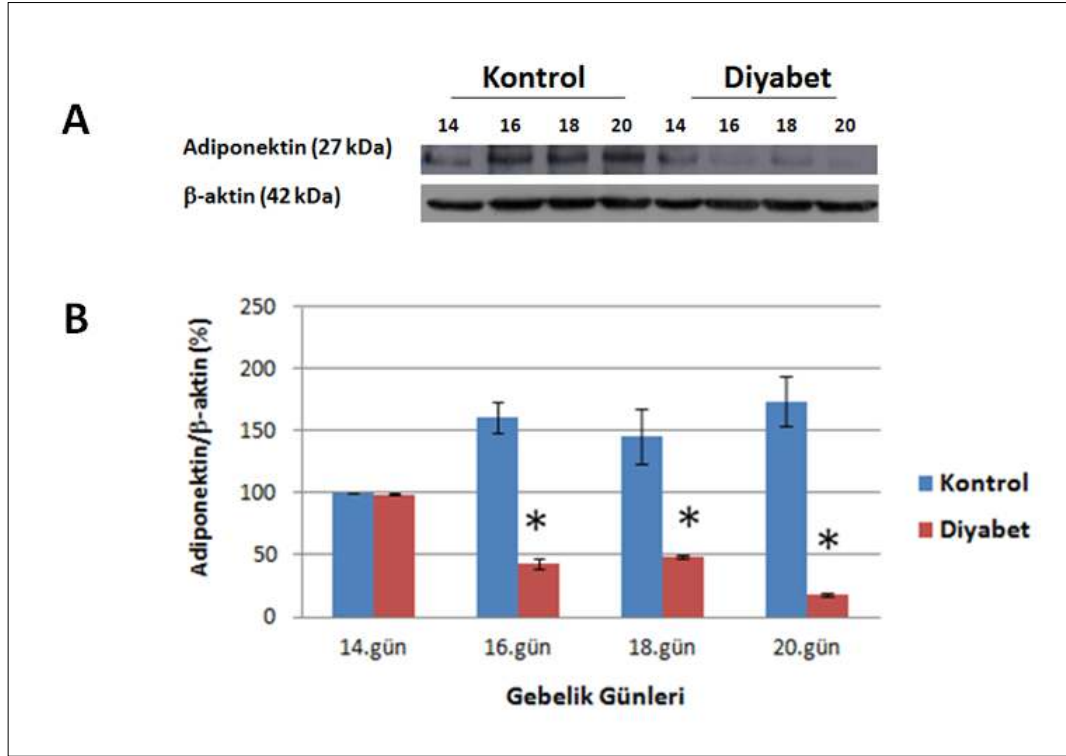
Embriyo Ağırlıkları (g)				
Gebelik Günleri	Kontrol grubu	Diyabet Grubu		
14	0,137 $\pm$ 0,0099 (n=44)	0,113 $\pm$ 0,00560	(p = 0,039)*	(n=45)
16	0,410 $\pm$ 0,0264 (n=46)	0,401 $\pm$ 0,0187	(p = 0,647)	(n=42)
18	1,130 $\pm$ 0,0208 (n=42)	0,852 $\pm$ 0,0894	(p $\leq$ 0,001)*	(n=48)
20	3,520 $\pm$ 0,0769 (n=48)	2,781 $\pm$ 0,0830	(p $\leq$ 0,001)*	(n=40)

(Ortalama $\pm$ Standart Hata, p değeri)

4.3. Western Blot Bulguları

4.3.1. Adiponektin Protein Ekspresyonu

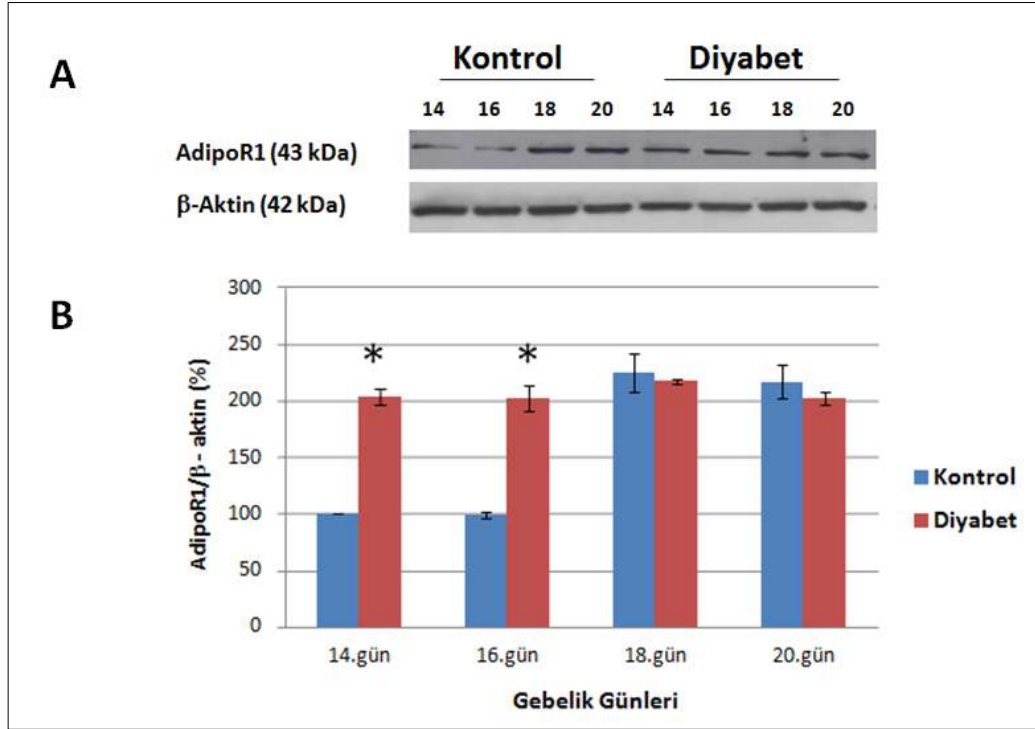
Diyabet grubunda gebeliğin artmasıyla birlikte adiponektin ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi. Diyabet ve kontrol grubuna ait adiponektin ekspresyonları karşılaştırıldığında 16 ($p \leq 0,001$), 18 ($p = 0,012$) ve 20. ($p = 0,002$) günlerde diyabet grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi. Gebeliğin 14. ($p = 0,374$) günündeki diyabet grubuna ait plasentalar, kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman, adiponektin ekspresyonunda gözlenen azalma, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 26).



Şekil 26. Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait adiponektin protein ekspresyonları. **A.** Kontrol ve diyabet gruplarında 14-20. günlerdeki adiponektin ve internal kontrol olarak β-aktin proteinlerinin western blot sonucuna ait bantlar gösterilmektedir. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. **B.** Western blot sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması sonucu elde edilen veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Sonuçlar ortalama ± Standart Hata değerleridir. *, Günlere göre kontrol ve diyabet grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$, $n=3$).

4.3.2. AdipoR1 Protein Ekspresyonu

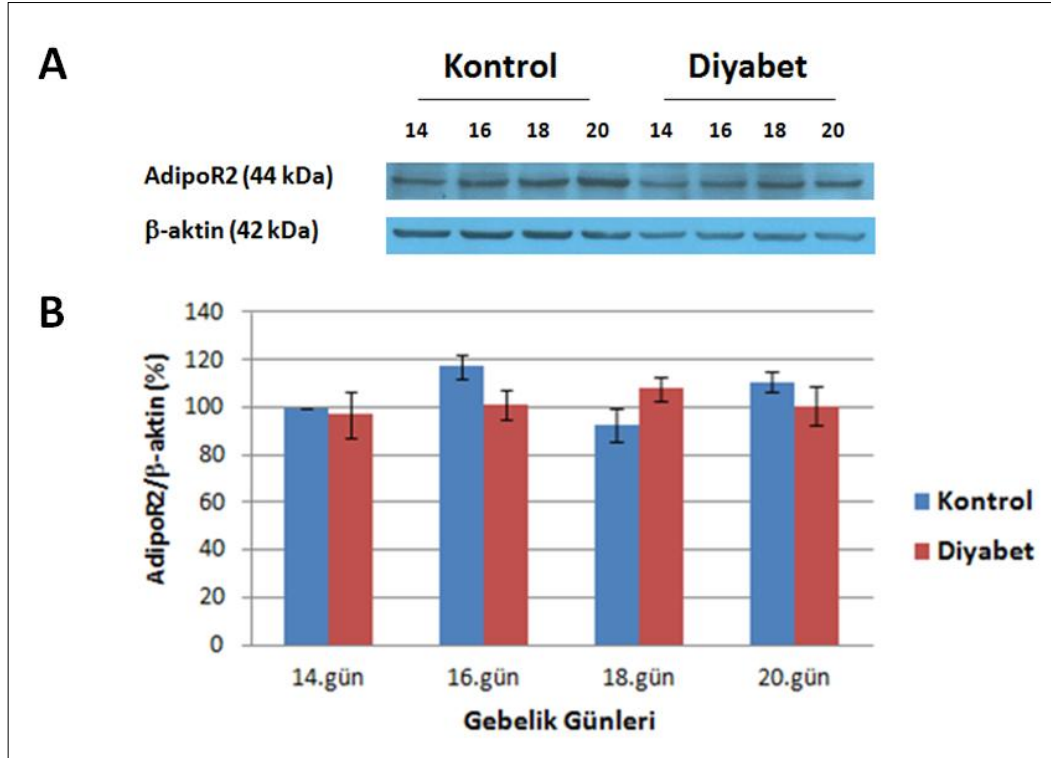
AdipoR1 protein miktarları değerlendirildiğinde gebeliğin 14. ($p \leq 0,001$) ve 16. ($p \leq 0,001$) günlerinde, diyabet grubunda kontrol grubu plasentalarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi. 18. ($p = 0,684$) ve 20. ($p = 0,420$) günlerde kontrol ve diyabet grubu arasındaki farklar anlamlı bir değişim göstermedi (Şekil 27).



Şekil 27. Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait AdipoR1 protein ekspresyonları. **A.** Kontrol ve diyabet gruplarında 14-20. günlerdeki AdipoR1 ve internal kontrol olarak β -aktin proteinlerinin western blot sonucuna ait bantlar gösterilmektedir. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. **B.** Western blot sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması sonucu elde edilen veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Hata değerleridir. *, Günlere göre kontrol ve diyabet grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$, $n=3$).

4.3.3. AdipoR2 Protein Ekspresyonu

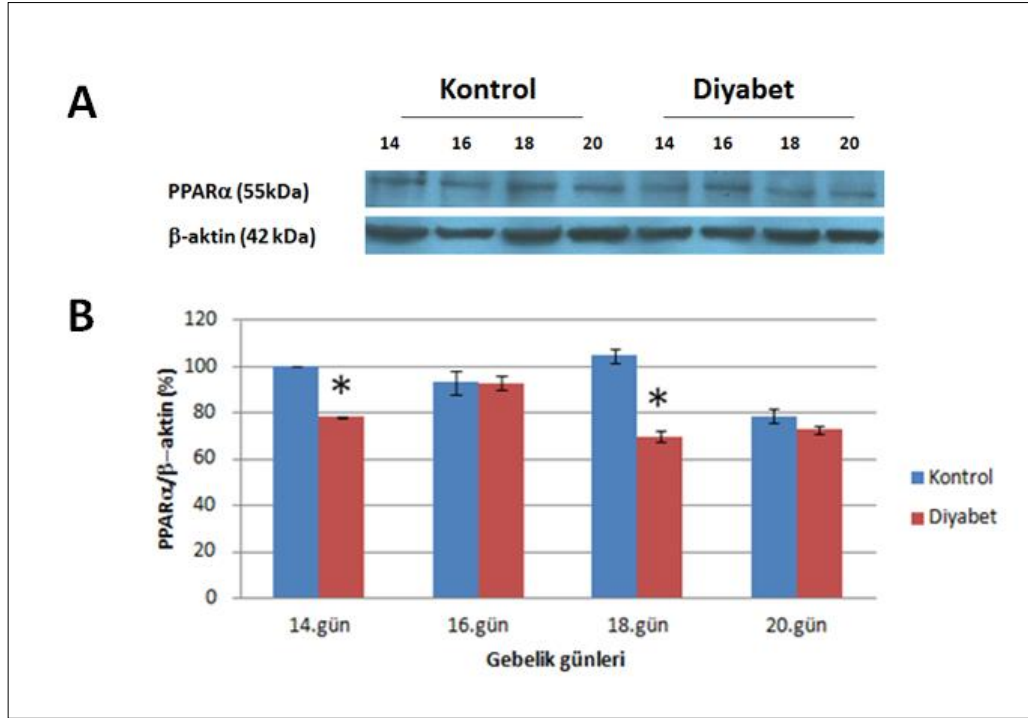
Diyabet grubunda gebeliğin ilerlemesi ile birlikte plasentadaki adiponektin ekspresyonunda meydana gelen değişimler, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermedi. Gebeliğin 14, 16 ve 20. günlerinde diyabet grubunda adiponektin ekspresyonları kontrol grubundan düşük bulundu fakat bu farklar anlamlı değildi (Şekil 28).



Şekil 28. Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait AdipoR2 protein ekspresyonları. **A.** Kontrol ve diyabet gruplarında 14-20. günlerdeki AdipoR2 ve internal kontrol olarak β -aktin proteinlerinin western blot sonucuna ait bantlar gösterilmektedir. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. **B.** Western blot sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması sonucu elde edilen veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Hata değerleridir. *, Günlere göre kontrol ve diyabet grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$, $n=3$).

4.3.4. PPAR α Protein Ekspresyonu

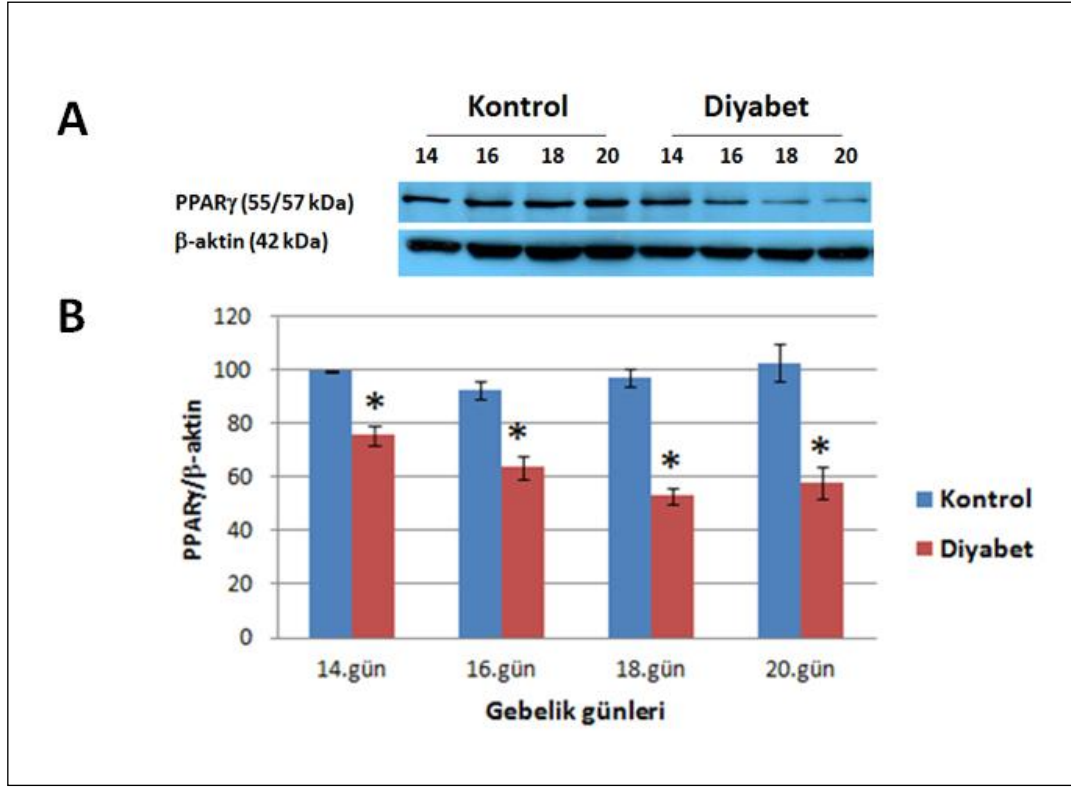
Kontrol ve diyabet grubuna ait plasentalardaki PPAR α ekspresyonu değerlendirildiğinde; gebeliğin 14 ($p \leq 0,001$) ve 18. ($p \leq 0,001$) günlerinde diyabet grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlendi. Gebeliğin 16. ve 20. gününde kontrol ve diyabet grubundaki PPAR α ekspresyonu arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 29).



Şekil 29. Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait PPARα protein ekspresyonları. **A.** Kontrol ve diyabet gruplarında 14-20. günlerdeki PPARα ve internal kontrol olarak β-aktin proteinlerinin western blot sonucuna ait bantlar gösterilmektedir. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. **B.** Western blot sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması sonucu elde edilen veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Sonuçlar Ortalama ± Standart Hata değerleridir. *, Günlere göre kontrol ve diyabet grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p<0.05$, $n=3$).

4.3.5. PPARγ Protein Ekspresyonu

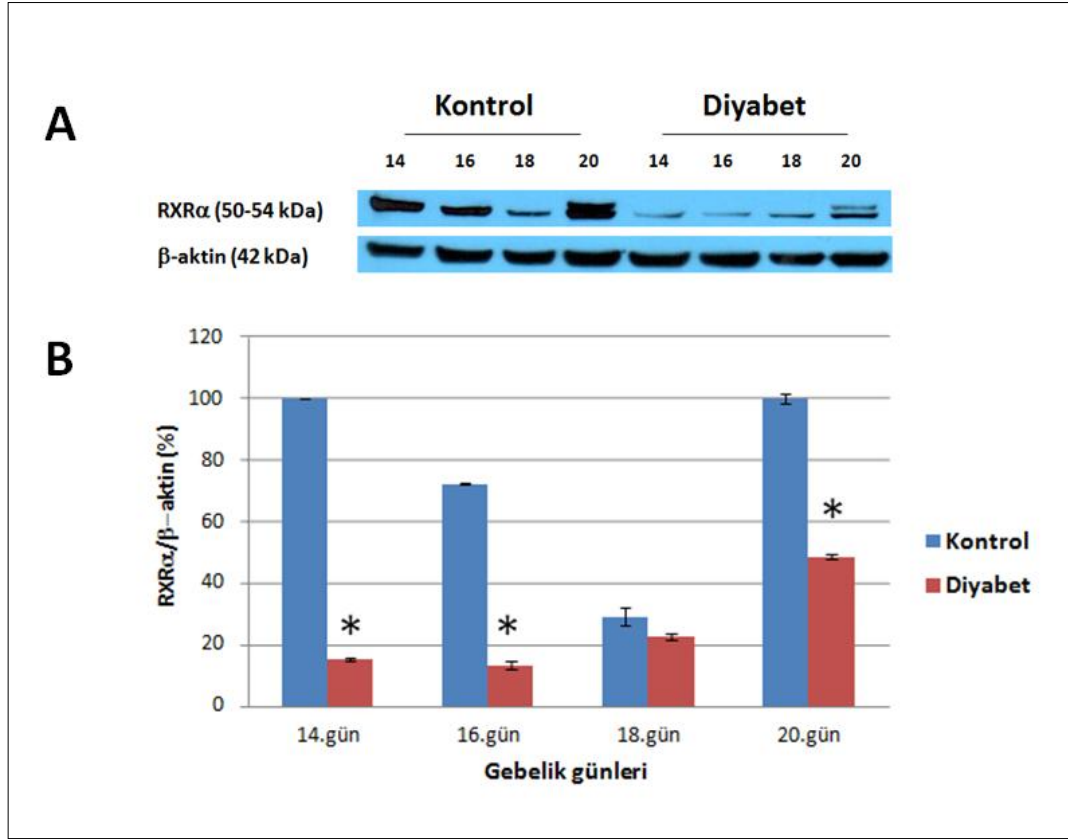
Diyabet grubunda gebeliğin ilerlemesi ile birlikte PPARγ protein ekspresyonunda azalma olduğu gözlemlendi. Gebeliğin 14, 16, 18 ve 20. günlerinde PPARγ ekspresyonunda kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p\leq 0,001$) (Şekil 30).



Şekil 30. Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait PPAR γ protein ekspresyonları. **A.** Kontrol ve diyabet gruplarında 14-20. günlerdeki PPAR γ ve internal kontrol olarak β -aktin proteinlerinin western blot sonucuna ait bantlar gösterilmektedir. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. **B.** Western blot sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması sonucu elde edilen veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Hata değerleridir. *, Günlere göre kontrol ve diyabet grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$, $n = 3$).

4.3.6. RXR α Protein Ekspresyonu

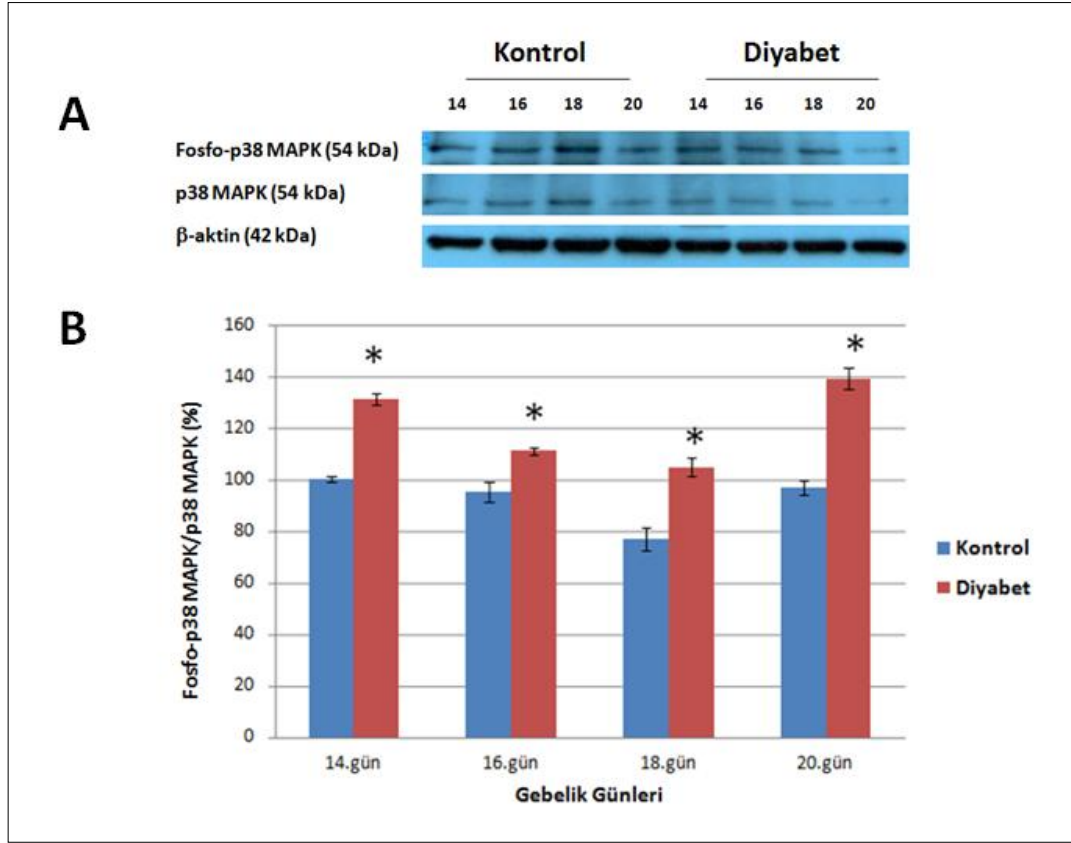
Gebelik günleri ilerledikçe RXR α ekspresyonunun diyabetik plasentalarda protein düzeyinde azaldığı gözlemlendi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında bu azalma gebeliğin 14, 16 ve 20. ($p \leq 0,001$) günlerde istatistiksel olarak anlamlı iken 18. ($p = 0,164$) günde meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 31).



Şekil 31. Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait RXRα protein ekspresyonları. **A.** Kontrol ve diyabet gruplarında 14-20. günlerdeki RXRα ve internal kontrol olarak β-aktin proteinlerinin western blot sonucuna ait bantlar gösterilmektedir. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. **B.** Western blot sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması sonucu elde edilen veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Sonuçlar Ortalama ± Standart Hata değerleridir. *, Günlere göre kontrol ve diyabet grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$, $n=3$).

4.3.7. p38 MAPK Fosforilasyonu

Kontrol ve diyabet grubu karşılaştırıldığında, diyabet grubunda p38 MAPK fosforilasyonunun arttığı gözlemlendi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında gebeliğin 14-20. ($p \leq 0,001$) günleri arasında diyabetik grupta p38 MAPK fosforilasyonunda meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 32).

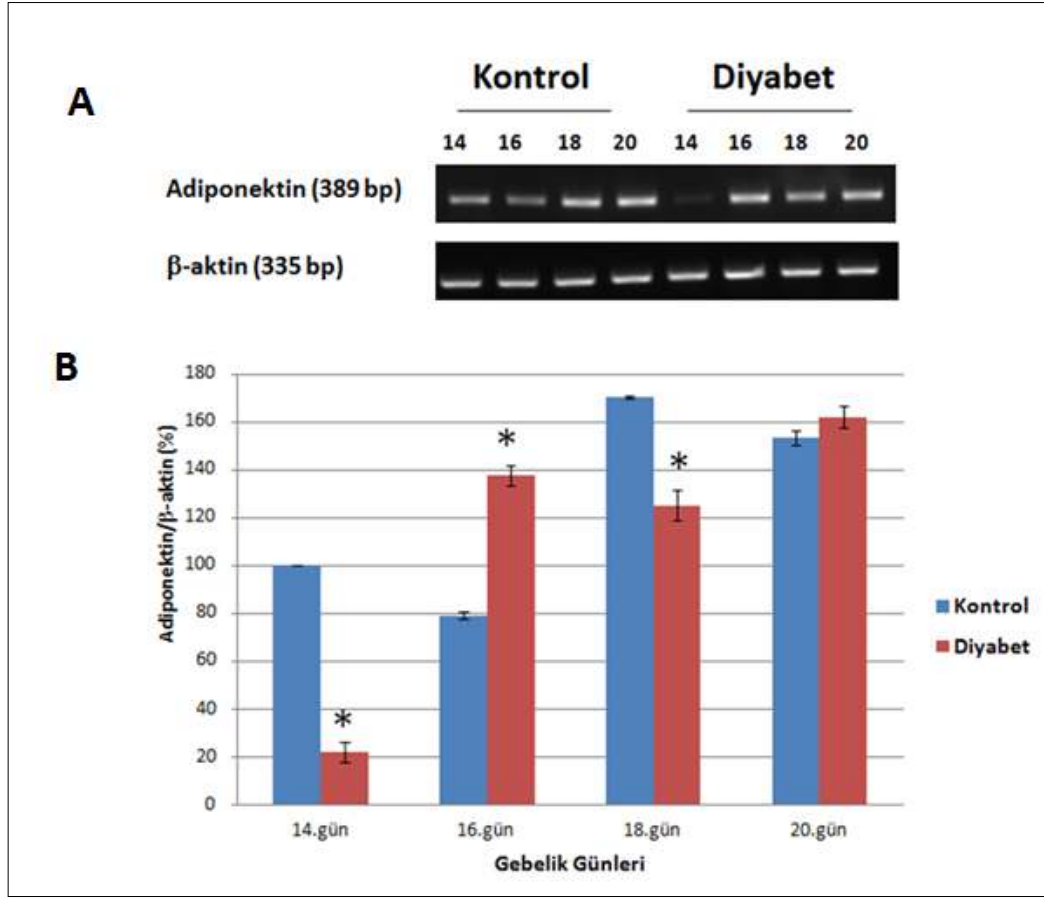


Şekil 32. Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait fosfo-p38 MAPK ve p38 MAPK protein ekspresyonları. **A.** Kontrol ve diyabet gruplarında 14-20. günlerdeki fosfo-p38 MAPK, p-38 MAPK ve internal kontrol olarak β -aktin proteinlerinin western blot sonucuna ait bantlar gösterilmektedir. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. **B.** Western blot sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması sonucu elde edilen veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Hata değerleridir. *, Günlere göre kontrol ve diyabet grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$, $n=3$).

4.4. PCR Bulguları

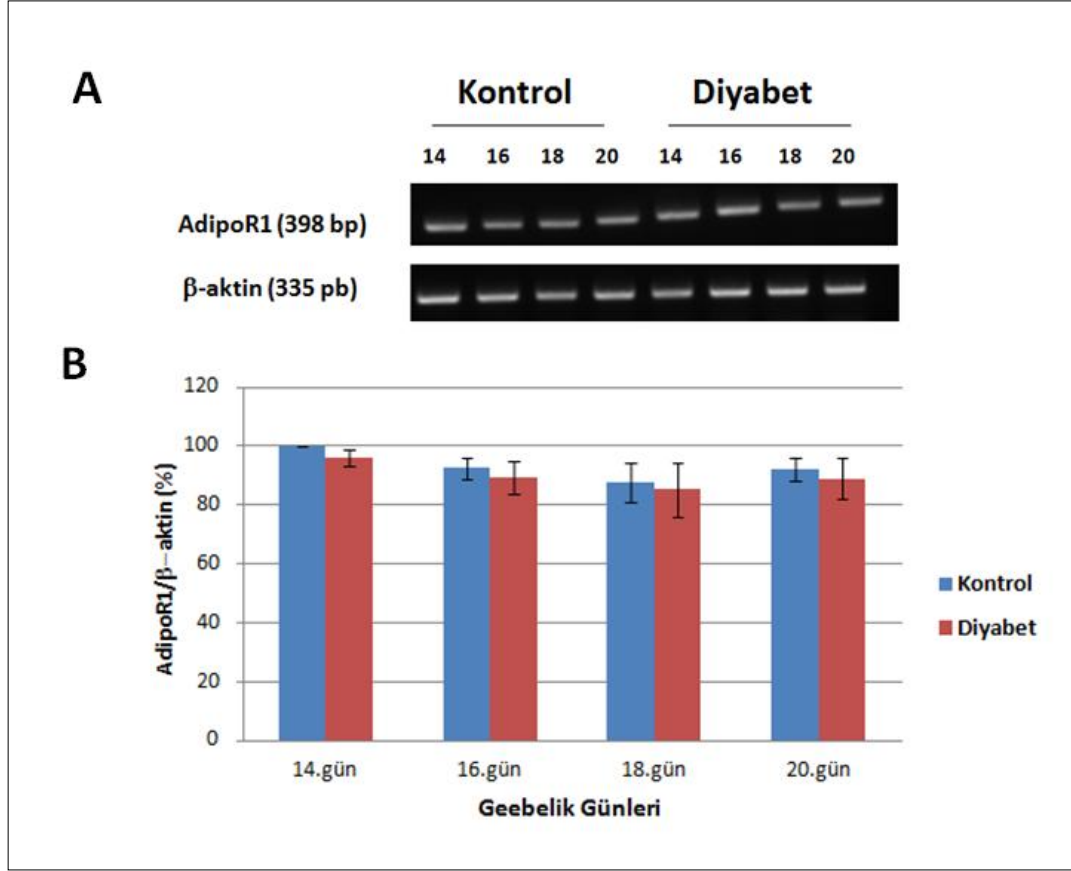
4.4.1. Adiponektin mRNA Ekspresyonu

Gebeliğin 14-20. günleri arasında plasentada Adiponektin mRNA ekspresyonları değerlendirildiğinde 14 ve 18. ($p \leq 0,001$) günlerde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi. Gebeliğin 16. ($p \leq 0,001$) gününde plasentadaki adiponektin mRNA ekspresyonunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi. Gebeliğin 20. ($p = 0,178$) gününde Adiponektin mRNA düzeyinde meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 33).



Şekil 33. Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait adiponektin mRNA düzeyleri. **A.** Kontrol ve deney gruplarında 14-20. günlerdeki adiponektin ve internal kontrol olarak β -aktin genlerinin RT-PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin jel elektroforezinde (%1,5 agaroz jel) gözlenen bantları gösterilmektedir. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. **B.** RT-PCR sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması sonucu elde edilen veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Hata değerleridir. *, Günlere göre kontrol ve diyabet grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$, $n=3$).

4.4.2. AdipoR1 mRNA Ekspresyonu

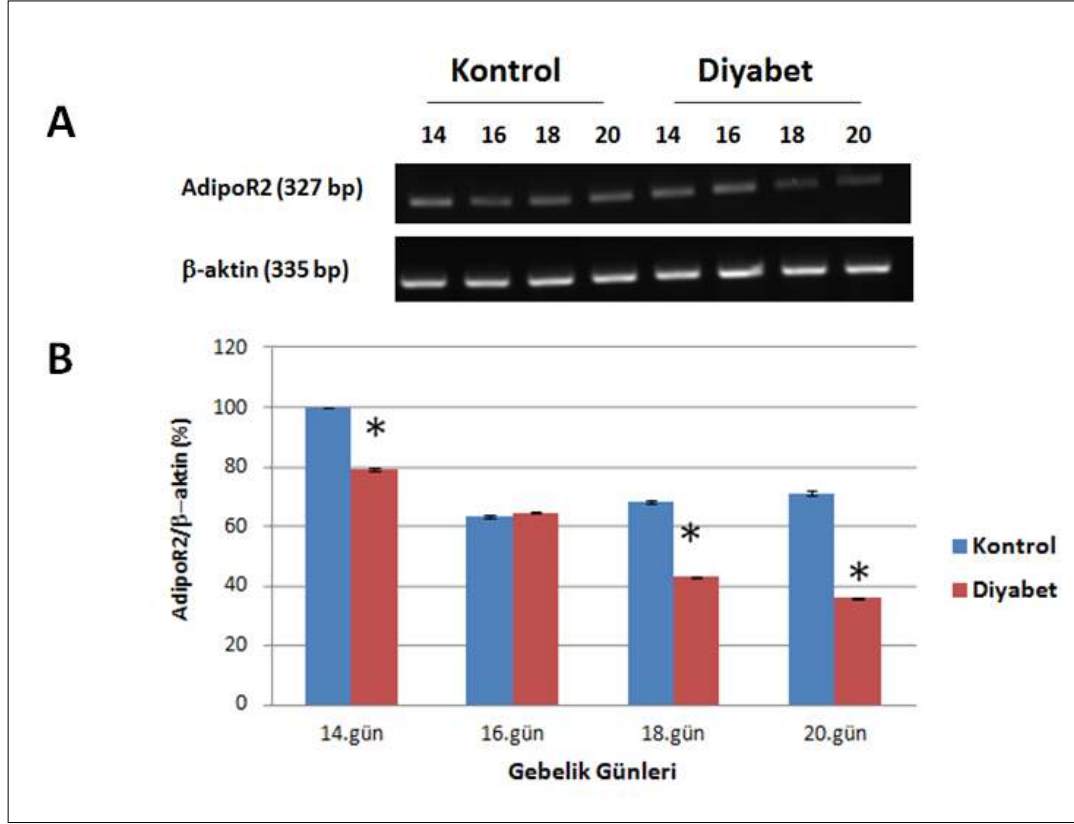


Şekil 34. Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait AdipoR1 mRNA düzeyleri.

A. Kontrol ve deney gruplarında 14-20. günlerdeki AdipoR1 ve internal kontrol olarak β -aktin genlerinin RT-PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin jel elektroforezinde (%1,5 agaroz jel) gözlenen bantları gösterilmektedir. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. **B.** RT-PCR sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması sonucu elde edilen veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Hata değerleridir. *, Günlere göre kontrol ve diyabet grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$, $n=3$).

Gebeliğin ilerleyen günlerinde kontrol ve diyabet grupları arasında AdipoR1 mRNA düzeyinde meydana gelen değişimler anlamlı bulunmamıştır. Gebeliğin 14-20. günleri arasında kontrol grubu ile kıyaslandığında diyabet grubunda AdipoR1 mRNA ekspresyonları düşük bulundu fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 34).

4.4.3. AdipoR2 mRNA Ekspresyonu

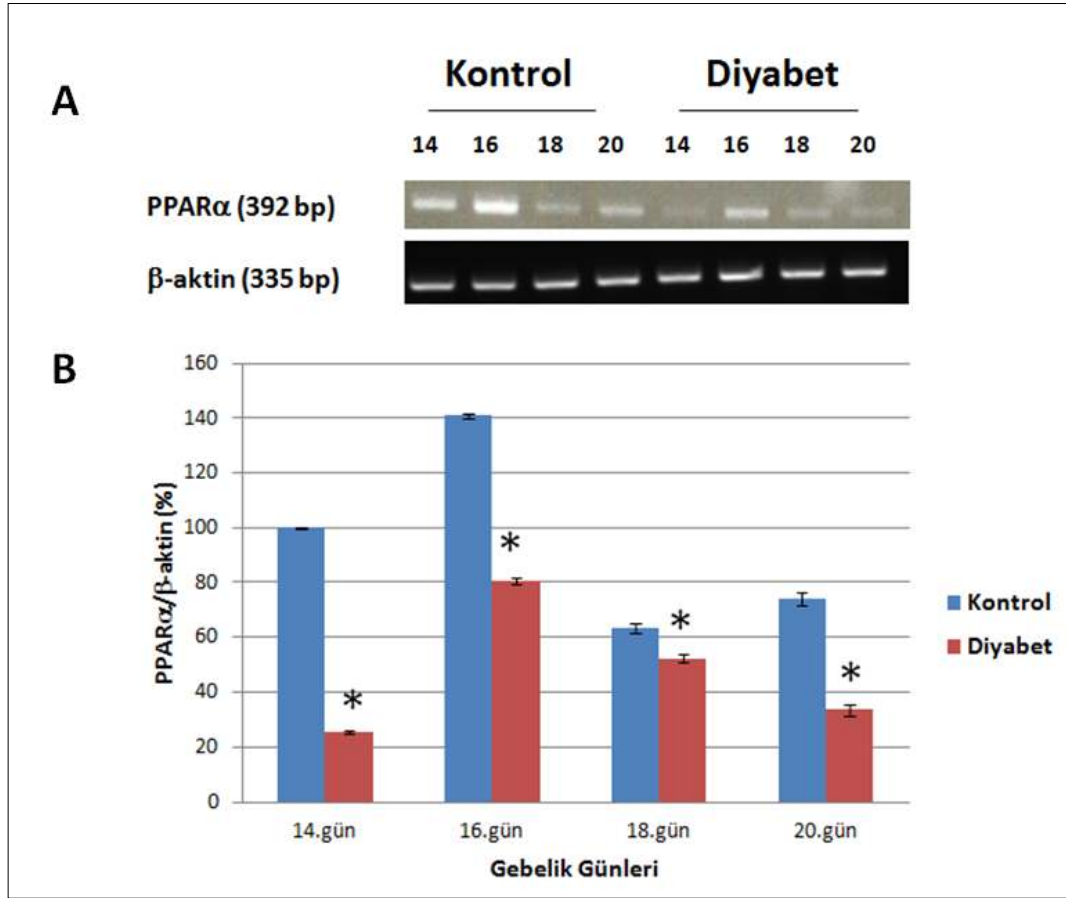


Şekil 35. Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait AdipoR2 mRNA düzeyleri.

A. Kontrol ve deney gruplarında 14-20. günlerdeki AdipoR2 ve internal kontrol olarak β -aktin genlerinin RT-PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin jel elektroforezinde (%1,5 agaroz jel) gözlenen bantları gösterilmektedir. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. **B.** RT-PCR sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması sonucu elde edilen veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Hata değerleridir. *, Günlere göre kontrol ve diyabet grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$, $n=3$).

Gebeliğin 14-20. günleri arasında AdipoR2 mRNA ekspresyonunda azalma olduğu tespit edildi. Gebeliğin 14,18 ve 20. ($p \leq 0,001$) günlerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında diyabetik grupta meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Gebeliğin 16. ($p = 0,169$) gününde diyabet ve kontrol plasenta dokusundaki mRNA ekspresyonları arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 35).

4.4.4. PPAR α mRNA Ekspresyonu

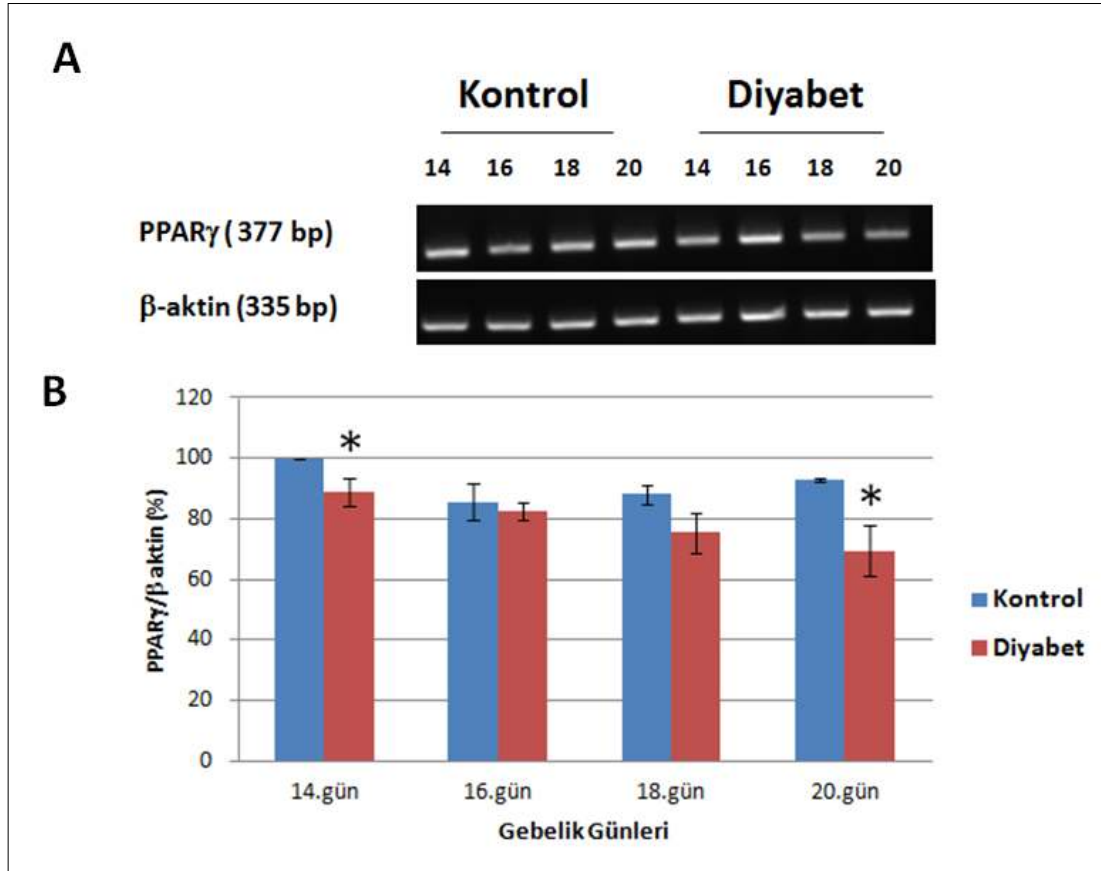


Şekil 36. Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait PPAR α mRNA düzeyleri.

A. Kontrol ve deney gruplarında 14-20. günlerdeki PPAR α ve internal kontrol olarak β -aktin genlerinin RT-PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin jel elektroforezinde (%1,5 agaroz jel) gözlenen bantları gösterilmektedir. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. **B.** RT-PCR sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması sonucu elde edilen veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Hata değerleridir. *, Günlere göre kontrol ve diyabet grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$, $n=3$).

Gebeliğin 14-20. günleri arasındaki plasentalarda PPAR α mRNA ekspresyonu değerlendirildiğinde, diyabet grubunda kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p \leq 0.001$) (Şekil 36).

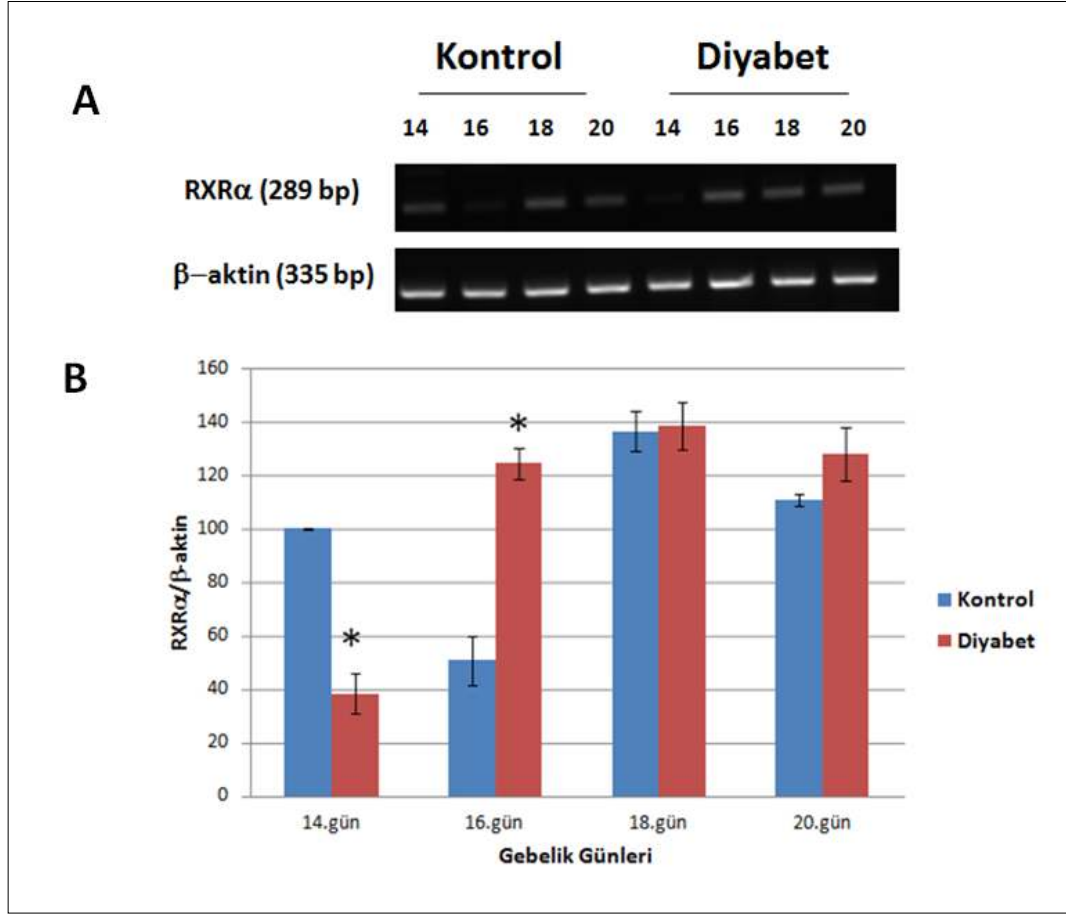
4.4.5. PPAR γ mRNA Ekspresyonu



Şekil 37. Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait PPAR γ mRNA düzeyleri. **A.** Kontrol ve deney gruplarında 14-20. günlerdeki PPAR γ ve internal kontrol olarak β -aktin genlerinin RT-PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin jel elektroforezinde (%1,5 agaroz jel) gözlenen bantları gösterilmektedir. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. **B.** RT-PCR sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması sonucu elde edilen veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Hata değerleridir. *, Günlere göre kontrol ve diyabet grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$, $n=3$).

Gebeliğin ilerlemesi ile diyabetik plasenta dokusunda PPAR γ mRNA ekspresyonunun azaldığı tespit edildi. Bu azalma diyabet ve kontrol grubu kıyaslandığında gebeliğin 14. ve 20. gününde anlamlı bulunurken, gebeliğin 16 ve 18. günlerindeki azalma, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 37).

4.4.6. RXR α mRNA Ekspresyonu



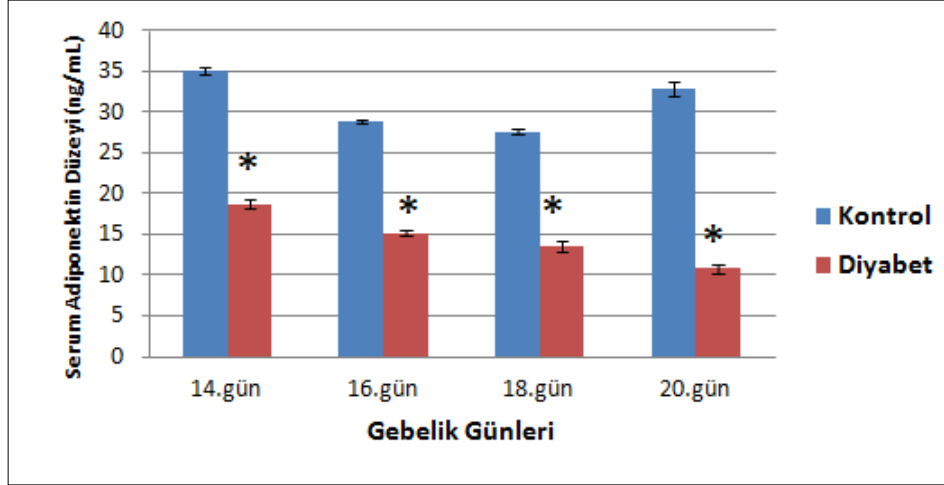
Şekil 38. Gebeliğin 14-20. günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait RXR α mRNA düzeyleri.

A. Kontrol ve deney gruplarında 14-20. günlerdeki RXR α ve internal kontrol olarak β -aktin genlerinin RT-PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin jel elektroforezinde (%1,5 agaroz jel) gözlenen bantları gösterilmektedir. Şekildeki sonuç en az 3 tekrardan birini temsil etmektedir. **B.** RT-PCR sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması sonucu elde edilen veriler sütun grafik şekline dönüştürüldü. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Hata değerleridir. *, Günlere göre kontrol ve diyabet grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$, $n=3$).

Diyabetik plasenta dokusunda RXR α mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman diyabetik grupta gebelik gününe bağlı olarak artma ve azalma gözlemlendi. Bu artış gebeliğin 16. gününde anlamlı iken 18 ve 20. günlerinde meydana gelen değişim ise istatistiksel olarak anlamlı değildi. 14. gündeki azalma ise istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 38).

4.5. Serum Adiponektin ELISA Sonuçları

Gebeliğin ilerlemesi ile birlikte diyabetik grupta serum Adiponektin düzeyinin düştüğü tespit edildi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında diyabetik grupta gebeliğin 14-20. günleri arasında serum Adiponektin düzeyindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 39, Tablo 5).



Şekil 39. Gebeliğin 14-20. Günleri arası kontrol ve diyabet gruplarına ait serum Adiponektin düzeyi.

Tablo 5. Gebeliğin 14-20.günler arası gruplara ait serum Adiponektin düzeyleri (Ortalama ± Standart Hata, p değerleri)

Serum adiponektin düzeyi (ng/mL)			
Gebelik Günleri	Kontrol grubu	Diyabet Grubu	
14	35,243 ± 0,468	18,805 ± 0,530	(p≤0,001)*
16	28,868 ± 0,258	15,214 ± 0,322	(p≤0,001)*
18	27,701 ± 0,383	13,551 ± 0,604	(p≤0,001)*
20	32,847 ± 0,889	10,830 ± 0,562	(p≤0,001)*

(Ortalama ± Standart Hata, p değeri)

TARTIŞMA

Adiponektin, apM1 geni tarafından üretilir [73] ve dolaşımında farklı formlarda bulunur. Adiponektinin plazmadaki konsantrasyonu 5 ve 30 µg/mL arasında değişmektedir [76]. Leptin ve TNF-α gibi adipokinlerin aksine plazma adiponektin seviyesi vücut kitle indeksi, intraabdominal yağ ve insülin rezistansı belirtileri ile ters orantılı olarak değişmektedir. Adiponektin konsantrasyonundaki düşüş hiperinsülinemi ve insülin rezistansı gelişimi ile ilişkilendirilmektedir [79]. Genom analizleri, insanda diyabete duyarlı lokusun aynı zamanda adiponektin gen bölgesi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu gen, adipoz dokuda yüksek miktarda işlevseldir ve adiposit biyolojisinde önemli görevler üstlenir. Adiponektin, yağ asidi oksidasyonunu stimüle eder, plazma trigliserid miktarını düşürür ve insülin duyarlılığını artırarak glukoz metabolizmasını olumlu yönde etkiler. Böylece adiponektin diyabet oluşum riskini düşürür. Adiponektin anti-diyabetik etkilerinin altında yatan mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Adiponektin sinyal yolağında, PPARα, p38 MAPK, AdipoR1 ve AdipoR2 adiponektin etkilerine aracılık eden proteinlerdir. Ayrıca PPARγ ve PPARα hem adiponektinin biyolojik etkilerine yardımcı olmakta hem de sekresyonunu etkilemektedir. Çalışmamızda tüm bu proteinlerin diyabetik sıçanların plasenta dokusundaki ekspresyonları ve adiponektin arasındaki ilişki değerlendirildi.

Gebelik anne ve fetüs arasında fonksiyonel ve anatomik etkileşimlerin gerçekleştiği kompleks bir süreçtir. Bu süreçte, sağlıklı bir gebelik için önemli kriterlerden biri plasentanın gelişimidir. Yeterli plasental gelişimin olmadığı durumlarda diyabet, intrauterin büyüme geriliği ve preeklampsi gibi klinik komplikasyonlar gelişebilir [15]. Son yapılan çalışmalar diyabet ve insülin direnci ile ilgili yeni medyatörler üzerinde durmaktadır. Adiponektin diyabet patolojisinde insülin duyarlaştırıcı etkilere sahiptir. Adiponektinin, hem insanların hem de hayvanların insüline duyarlı dokularında glukoz ve lipid metabolizmasını düzenleyerek bu etkisini gösterdiği kabul edilmektedir. Diyabetik durumlarda adiponektin disregüle olmaktadır [151]. Bundan dolayı yapılan çalışmalar adiponektinin tip 2 diyabet tanısında tedavi edici bir araç olarak kullanılabileceğini rapor etmektedir [156]. Diyabetik durumda adiponektinin plasentadaki ekspresyonları hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Bu çalışmada diyabetik sıçanların plasenta dokularında gebeliğin 14-20. günler arasında kontrol grubuna göre adiponektinin protein miktarının düşük olduğu tespit edildi. Ayrıca maternal kandan

elde edilen serumlarda da benzer şekilde adiponektin miktarının düşük olduğu gösterildi.

Diyabette, maternal glukoz, plasental bariyeri geçer ve fetal pankreastan insülin salınımına neden olarak hiperinsülinemiye neden olur [157]. Glukoz miktarını düşürmek diyabetin olumsuz etkilerini ortadan kaldıracaktır. Adiponektin AMPK aracılığı ile iskelet kasına glukoz alımını stimüle eder ve hepatik glukoz üretimini azaltır [158]. Tip 1 diyabet hastalarında yapılan çalışmalarda yüksek adiponektin konsantrasyonunun düşük plazma glukoz seviyesi ile ilişkili olduğu rapor edilmektedir [156]. Bu durum diyabet oluşumu ve düşük adiponektin seviyesi arasında bir ilişki olduğu düşüncesini desteklemektedir. Adiponektin, diyabet ve plasenta gelişimi arasındaki ilişkiyi aydınlatmak için çalışmamızda adiponektin sinyalizasyonuna aracılık eden reseptörlerin diyabetik plasenta dokusundaki ekspresyonları değerlendirildi. Adiponektin reseptörlerinin sıçan plasentasında eksprese olduğunu ve diyabetik sıçanların plasenta dokusunda AdipoR1 ve AdipoR2 mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre düşük olduğu tespit edildi.

Diyabetik sıçanlarda yağ miktarı azalmaktadır, bunun sonucu olarak adipositlerden sekrete edilen adiponektin miktarı azalmış olabilir. Çünkü adiponektinin sekresyonunun gerçekleştiği temel yer adiposit hücreleridir. Ayrıca, sıçanlar STZ'ye maruz bırakıldıkları zaman hiperglisemi oluşur ve insülin, adiponektin ve resistin eksikliği gözlenmektedir [158]. Bu çalışmada diyabet modeli STZ kullanarak gerçekleştirildi. STZ'ye maruz kalan sıçanların insülin direncine sahip olduğu kabul edilmektedir. Bundan dolayı tip 2 diyabete benzerdir. Yapılan çalışmalarda tip 2 diyabet hastalarında adiponektin konsantrasyonunun iki kat azaldığı fakat tip 1 diyabet hastalarında ise adiponektin konsantrasyonunun arttığı rapor edilmektedir [158].

Bunlara ek olarak; PPAR α ve PPAR γ 'nin lipid ve karbohidrat metabolizması üzerinde etkili olduğu ve adiponektin sekresyonunu etkilediği bilinmektedir. Diyabette adiponektin seviyesinin düşüklüğünde bir diğer etken de PPAR'lar olabilir. Bu iki izoformun hem mRNA hem de protein ekspresyonları diyabetik sıçanların plasentalarında değerlendirildi.

PPAR'lar ligandla aktive olan transkripsiyon faktörleridirler. Metabolizmada yer alan birçok genin ekspresyonunu regüle ederler, inflamatuvar ve plasental gelişim süreçlerinde rol alırlar [159, 160]. PPAR γ ve PPAR α lipid metabolizmasında ve adiposit fonksiyonunda önemli görevler üstlenir. PPAR γ adipogenezde ve olgun adiposidin yaşamını devam ettirmesinde, yağ asidi alımında ve depolanmasında görev alır [159, 161]. Ayrıca PPAR γ adipositlerden sekrete edilen ve insülin duyarlaştırıcı etkilere sahip olan adiponektin sekresyonunu da olumlu yönde etkiler.

PPAR γ , adiponektinin postranslasyonel modifikasyonunda ve transkripsiyonunda yer alan gerekli genlerin ekspresyonunu regüle eder. PPAR γ adiponektinin post-translasyonel modifikasyonlarını endoplazmik retikulumda bulunan şaperonları üzerinden gerçekleştirir. ERp44 şaperonu adiponektin ile kovalent olarak bağlanarak endoplazmik retikulum içinde alıkoyar [88, 154]. PPAR γ ERp44'ün promotor bölgesinde PPRE'ye bağlanarak transkripsiyonunu direkt olarak baskılar. Böylece hücreden daha fazla adiponektin salınımı gerçekleşir [162]. Antidiyabetik ilaçlar olan TZD'ler ile tedavi sonrasında ve PPAR γ ekspresyonunun arttığı durumlarda ERp44 transkripsiyonu down regüle olur ve bu durum adiponektin sekresyonunu artırır. Dolayısıyla TZD'lerin anti-diyabetik etkisini PPAR γ 'yı aktive edip adiponektin sekresyonunu artırarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir. PPAR γ agonistleri aynı zamanda endoplazmik retikulumda bulunan endoplazmik retikulum oksidoredüktaz 1-L α (Ero1-L α) şaperonunun hücresel düzeyini önemli derecede artırır. Ero1-L α , HMW adiponektinin sekresyonunu artırır [89]. HMW adiponektin, adiponektinin diyabet ile ilişkili formudur. Ero1-L α adiponektinin yapısındaki disülfid bağlarının oluşmasını sağlamaktadır. Böylece HMW adiponektin sekresyona hazır hale gelir. Sekrete edilen HMW adiponektin insülin duyarlaştırıcı olarak davranarak diyabetik durumu iyileştirir. HMW adiponektin yağ asidi oksidasyonunu stimüle eder, enerji dengesini düzenler, hepatik glikoneogenezi baskılar ve insülin duyarlılığını artırır. Diyabetik koşullarda PPAR γ 'nın ekspresyonu dolayısıyla adiponektin ekspresyonu düşer. Bu çalışmada diyabetik plasenta dokusundaki PPAR γ protein ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi.

PPAR γ , poliansatüre yağ asitleri ve prostoglandin D2 metabolitleri tarafından aktive edilir [163]. Diyabette lipid metabolizmasında değişimler meydana gelir ve oluşan ürünlerin değişir. Lipid metabolizmasında meydana gelen değişimler PPAR γ aktivasyonu olumsuz yönde etkileyerek adiponektin ekspresyonunu azaltmış olabilir.

Diyabette, maternal sirkülasyondaki aşırı glukoz ve lipid, intrauterin dokulara ulaşır ve inflamasyona neden olarak embriyonik, fetal ve plasental gelişime zarar verir. PPAR'lar regülatör sinyal yollarını uyararak maternal diyabet indüklü intrauterin gelişim hasarının ortadan kaldırılmasına yardımcı olur [159]. Hem PPAR α hem de PPAR γ trofoblast hücrelerinde eksprese olur ve plasental gelişimde önemli görevler üstlenir. Ayrıca PPAR γ , insülin metabolizması, trofoblast farklılaşması ve anti-inflamatuar süreçlerde de önemli roller oynar [164]. PPAR γ 'sı olmayan farelerde trofoblast farklılaşması hasar görür ve plasental damarlanma değişir. Trofoblast farklılaşmasındaki görevine ek olarak PPAR γ spongiotrofoblast tabakasının kalınlığını ve trofoblast olgunlaşmasını da düzenlemektedir [165]. PPAR γ 'sı olmayan (mutasyon veya farklı nedenlerden dolayı) farelerin gebeliğin 9.5 gününde anormal plasenta gelişiminden dolayı öldükleri gözlenmiştir [166]. Embriyo ölümlerine plasentada meydana gelen gelişimsel defektlerin sonucunda ortaya çıkan embriyo gelişim defektleri neden olmaktadır [167]. Yapılan çalışmalarda PPAR'ların

gebeliğin devamı için önemli roller üstlenebileceği vurgulanmaktadır [168-171]. PPAR γ plasentanin sinsisyotrofoblast ve sitotrofoblast hücrelerinde eksprese olmaktadır. Bu da plasental besin transferinde PPAR γ 'nın önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca, PPAR γ aktivasyonu gebelik ve fetal gelişim esnasında gerekli olan hormon ve ürünlerin sekresyonu ve üretimini stimüle eder [149], embriyonun endometriyuma tutunmasında/gelişmesinde ve plasental fonksiyonda önemli görevler üstlenir [149]. Bundan dolayı; PPAR γ fonksiyonel plasentanin olgunlaşması için esansiyeldir [150]. Bu çalışmada STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanların bazılarında embriyolar ölü bulundu ve bazılarında ise bir veya iki embriyo mevcuttu. Ayrıca bazı sıçanlarda hem embriyonik hemde plasental gelişimde defektler gözlemlendi. Sıçanların normal gebeliklerinde tek seferde Ortalama 7-8 embriyo oluşmaktadır. Diyabetik sıçanların embriyo sayısında meydana gelen azalmanın nedeni PPAR α , PPAR γ ve adiponektin ekspresyonunda meydana gelen değişimler olabilir. Diyabetik sıçan plasentalarında PPAR γ ekspresyonu değerlendirildiğinde hem protein hem de mRNA düzeyinde ekspresyonlarının kontrol grubuna göre düşük olduğu tespit edildi.

PPAR'lar implantasyon, trofoblast farklılaşması, plasenta, fetal ve embriyonel gelişimde önemli görevler üstlenir. Dolayısıyla PPAR'ların sinyalizasyonunda veya ekspresyonundaki değişimler gebelik komplikasyonlarına yol açar [172]. Normal bir gebelik süreci için gerekli olan diğer bir PPAR izoformu da PPAR α 'dır. PPAR α izoformu fetal ve plasental lipid metabolizmasında önemli rol oynar. PPAR α *de novo* lipid sentezini azaltarak ve lipid katabolizmasını artırarak lipid konsantrasyonunu azaltır. Maternal diyabette PPAR α sinyalizasyonu bozulur [173]. Bununla tutarlı olarak diyabetik sıçanların plasenta ve fetüslerinde lipid metabolizması hasar görür [69]. Lipid metabolizmasında meydana gelen diyabet indüklü değişimler hem anne hem de fetüsün yaşamını olumsuz yönden etkiler. Gebelik öncesi ve gebelik diyabeti makrozomi, plasentomegali ve birçok perinatal hastalık riskini arttırmaktadır [18, 174]. Ayrıca hem gebelik öncesi diyabet hem de gebelik sonrası diyabet yetişkinin daha sonra tip 2 diyabet oluşturma riskini artırır. Yapılan çalışmalar tip 2 diyabet hastaların plasentalarında PPAR α ve PPAR γ konsantrasyonlarının düştüğünü rapor etmektedir [160]. Ayrıca, genetik çalışmalar PPAR γ 'nın ligand bağlayıcı bölgesinde meydana gelen mutasyonların insanlarda tip 2 diyabet ve insülin direnci ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır [27, 175]. Bu çalışmada diyabetik sıçanların plasentalarında PPAR γ ve PPAR α 'nın hem protein hemde mRNA ekspresyonlarının azaldığı tespit edildi.

Özetle; Adiponektin lipid ve karbohidrat metabolizmasını etkileyerek diyabet oluşum riskini düşürür. Adiponektin bu etkisini PPAR α ve PPAR γ üzerinden gerçekleştiriyor olabilir. Bu iki PPAR izoformu lipid ve karbohidrat metabolizmasında önemli görevler üstlenir. PPAR α özellikle lipid metabolizması üzerinde olumlu etkiler göstererek diyabetik durumu iyileştirir. PPAR γ ise insülin

duyarlılığı yüksek olan küçük adipositlerin oluşmasını sağlar. Ayrıca diyabet tedavisinde kullanılan TZD'ler sentetik PPAR γ ligandlarıdır [176]. TZD'ler PPAR γ üzerinden fonksiyon gösterip adiponektinin transkripsiyonunu artırır. Bu çalışmada STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanların plasenta dokusunda PPAR α , PPAR γ ve adiponektinin hem mRNA hem de protein düzeyinde ekspresyonları kontrol grubuna kıyasla düşük bulundu. Benzer şekilde adiponektinin serum konsantrasyonu da kontrol grubundan düşük bulundu. Ayrıca bu çalışmada plasental gelişimde defektler gözlemlendi. Diyabetik plasental gelişim anormalliklerinde bu proteinlerin ekspresyonlarında düşüş gözlemlenmiştir. Adiponektin, diyabette plasental gelişim anormallikleri ile ilişkili olabilir. Bu mekanizmanın daha iyi aydınlatılabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

Bu çalışmada gebeliğin 14, 16, 18 ve 20. günlerindeki kontrol ve diyabetik sıçan plasentalarında adiponektin, AdipoR1, AdipoR2, PPAR α , PPAR γ ve RXR α protein miktarları Western Blot tekniği ile mRNA miktarları ise RT-PCR tekniği ile belirlendi. p38 MAPK fosforilasyonu western blot tekniği ile ve serum adiponektin düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi ve aşağıdaki sonuçlara varıldı:

- 1) Diyabet grubunda plasenta ağırlıklarının kontrol grubundan daha büyük olduğu,
- 2) Diyabetik grupta embriyo ağırlıklarının kontrol grubundan düşük olduğu,
- 3) Kontrol grubuna kıyasla diyabetik grupta adiponektin, AdipoR1, AdipoR2, PPAR α , PPAR γ ve RXR α 'nın hem mRNA hem de protein miktarlarının düştüğü,
- 4) Kontrol grubuna kıyasla p38 MAPK fosforilasyonunun diyabetik grupta yükseldiği,
- 5) Serum adiponektin düzeyinin diyabetik grupta azaldığı sonuçlarına varıldı.

KAYNAKLAR

1. Oh, D.K., T. Ciaraldi, and R.R. Henry, Adiponectin in health and disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2007. 9(3): p. 282-289.
2. Kadowaki, T. and T. Yamauchi, Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*, 2005. 26(3): p. 439-51.
3. Heiker, J.T., D. Kosel, and A.G. Beck-Sickinger, Molecular mechanisms of signal transduction via adiponectin and adiponectin receptors. *Biol Chem*, 2010. 391(9): p. 1005-18.
4. Thundyil, J., et al., Adiponectin receptor signalling in the brain. *Br J Pharmacol*, 2012. 165(2): p. 313-27.
5. Kadowaki, T., et al., Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 2006. 116(7): p. 1784-92.
6. Wong, G.W., et al., A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(28): p. 10302-7.
7. Simpson, F. and J.P. Whitehead, Adiponectin—It's all about the modifications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010. 42(6): p. 785-788.
8. Pajvani, U.B., et al., Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem*, 2003. 278(11): p. 9073-85.
9. Waki, H., et al., Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem*, 2003. 278(41): p. 40352-63.
10. Lara-Castro, C., et al., Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes*, 2006. 55(1): p. 249-59.
11. Hu E, L.P., Spiegelman BM., AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.*, 1996.
12. Weyer, C., et al., Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(5): p. 1930-5.
13. Steffes, M.W., et al., Serum adiponectin in young adults—interactions with central adiposity, circulating levels of glucose, and insulin resistance: the CARDIA study. *Ann Epidemiol*, 2004. 14(7): p. 492-498.
14. Yamauchi, T., et al., The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*, 2001. 7(8): p. 941-946.
15. Holdsworth-Carson, S.J., et al., Peroxisome proliferator-activated receptors are altered in pathologies of the human placenta: Gestational diabetes mellitus, intrauterine growth restriction and preeclampsia. *Placenta*, 2010. 31(3): p. 222-229.

16. McCarthy, F.P., et al., PPAR-gamma -- a possible drug target for complicated pregnancies. *Br J Pharmacol*, 2013. 168(5): p. 1074-85.
17. Buchanan TA, X.A., Kjos SL, Watanabe R., What Is Gestational Diabetes? 2007.
18. Leiva, A., et al., Fetoplacental vascular endothelial dysfunction as an early phenomenon in the programming of human adult diseases in subjects born from gestational diabetes mellitus or obesity in pregnancy. *Exp Diabetes Res*, 2011. 2011: p. 349286.
19. Yamauchi, T. and T. Kadowaki, Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases. *Int J Obes (Lond)*, 2008. 32 Suppl 7: p. S13-8.
20. Hutter, S., et al., The Role of PPARs in Placental Immunology: A Systematic Review of the Literature. *PPAR Res*, 2013. 2013: p. 970276.
21. Spiegelman, B.M., PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, 1998. 47(4): p. 507-14.
22. Schmidt, M.V., et al., The Nuclear Hormone Receptor PPAR γ as a Therapeutic Target in Major Diseases. *ScientificWorldJournal*, 2010. 10: p. 2181-2197.
23. Seok, H. and B.S. Cha, Refocusing Peroxisome Proliferator Activated Receptor-alpha: A New Insight for Therapeutic Roles in Diabetes. *Diabetes Metab J*, 2013. 37(5): p. 326-332.
24. Ferre, P., The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 2004. 53 Suppl 1: p. S43-50.
25. Guerre-Millo, M., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem*, 2000. 275(22): p. 16638-42.
26. Lehmann JM, M.L., Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA., An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* , 1995.
27. Floyd, Z.E. and J.M. Stephens, Controlling a master switch of adipocyte development and insulin sensitivity: Covalent modifications of PPAR γ . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2012. 1822(7): p. 1090-1095.
28. Wang, Q., H. Fujii, and G.T. Knipp, Expression of PPAR and RXR isoforms in the developing rat and human term placentas. *Placenta*, 2002. 23(8-9): p. 661-71.
29. Benirschke, K., Kaufmann, P., Baergen, R. N. , pathology of the human placenta in normal and abnormal pregnancies. fifth edition ed2006, New York.
30. <http://www.motifolio.com/devbiology.html>.
31. Suwaki, N., et al., Expression and potential role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the placenta of diabetic pregnancy. *Placenta*, 2007. 28(4): p. 315-23.
32. Garnica, A.D. and W.Y. Chan, The role of the placenta in fetal nutrition and growth. *J Am Coll Nutr*, 1996. 15(3): p. 206-22.

33. Benirsch, K.a.K., Patholgy of the Human Placenta2006.
34. <http://www.embryology.ch/anglais/fplacenta/physio06.html>.
35. <http://cnx.org/content/m46319/latest/?collection=col11496/latest>.
36. Baergen, K.B.P.K.R.N., pathology of the human placenta. Fifth edition ed.
37. Moffett, A. and C. Loke, Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(8): p. 584-594.
38. Montiel, J.F., H. Kaune, and M. Maliqueo, Maternal-fetal unit interactions and eutherian neocortical development and evolution. *Front Neuroanat*, 2013. 7: p. 22.
39. Castellucci, M., et al., Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Hum Reprod Update*, 2000. 6(5): p. 485-94.
40. Sebire, H.F.N.J., Pathology of the placenta, major problems in pathology. Third edition ed.
41. Soares, M.J., et al., Rat placentation: An experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta*, 2012. 33(4): p. 233-243.
42. Damodaram, M., et al., Early adverse perinatal complications in preterm growth-restricted fetuses. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2011. 51(3): p. 204-209.
43. Lager, S. and T.L. Powell, Regulation of nutrient transport across the placenta. *J Pregnancy*, 2012. 2012: p. 179827.
44. Carter, A.M., Evolution of factors affecting placental oxygen transfer. *Placenta*, 2009. 30 Suppl A: p. S19-25.
45. Baumann, M., S. Deborde, and N. Illsley, Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine*, 2002. 19(1): p. 13-22.
46. Haggarty, P., Fatty acid supply to the human fetus. *Annu Rev Nutr*, 2010. 30: p. 237-55.
47. A. Ericsson, B.H., T. L. Powell, and T. Jansson, "Glucose transporter isoform 4 is expressed in the syncytiotrophoblast of first trimester human placenta". *Human Reproduction*, 2005. vol. 20: p. 521-530.
48. Larque, E., et al., Omega 3 fatty acids, gestation and pregnancy outcomes. *Br J Nutr*, 2012. 107 Suppl 2: p. S77-84.
49. Biron-Shental, T., et al., Hypoxia regulates the expression of fatty acid-binding proteins in primary term human trophoblasts. *Am J Obstet Gynecol*, 2007. 197(5): p. 516 e1-6.
50. Magnusson, A.L., et al., Triglyceride hydrolase activities and expression of fatty acid binding proteins in the human placenta in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(9): p. 4607-14.
51. Al-Maweri, S.A., et al., Prevalence of oral mucosal lesions in patients with type 2 diabetes attending hospital universiti sains malaysia. *Malays J Med Sci*, 2013. 20(4): p. 39-46.
52. Yasavul, P.D.Ü., Hacettepe İç Hastalıkları Kitabı 2003.
53. Dong, J.-Y., et al., Vitamin D Intake and Risk of Type 1 Diabetes: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients*, 2013. 5(9): p. 3551-3562.
54. Weir, G.C. and S. Bonner-Weir, Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013. 1281(1): p. 92-105.

55. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med*, 2006. 23(8): p. 857-66.
56. Jensen, P.E. and Z. Zhou, Structural characteristics of HLA-DQ that may impact DM editing and susceptibility to Type-1 diabetes. *Frontiers in Immunology*, 2013. 4.
57. Nokoff, N. and M. Rewers, Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013. 1281(1): p. 1-15.
58. Haller, M.J., M.A. Atkinson, and D. Schatz, Type 1 Diabetes Mellitus: Etiology, Presentation, and Management. *Pediatric Clinics of North America*, 2005. 52(6): p. 1553-1578.
59. Gujral, U.P., et al., Type 2 diabetes in South Asians: similarities and differences with white Caucasian and other populations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013. 1281(1): p. 51-63.
60. Phillips, C., Nutrigenetics and Metabolic Disease: Current Status and Implications for Personalised Nutrition. *Nutrients*, 2013. 5(1): p. 32-57.
61. Pansuria, M., et al., Insulin resistance, metabolic stress, and atherosclerosis. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2012. 4: p. 916-31.
62. Vrachnis, N., et al., Role of adipokines and other inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus and previous gestational diabetes mellitus. *Int J Endocrinol*, 2012. 2012: p. 549748.
63. McCormack, S. and S.F. Grant, Genetics of obesity and type 2 diabetes in African Americans. *J Obes*, 2013. 2013: p. 396416.
64. Nanri, A., Nutritional epidemiology of type 2 diabetes and depressive symptoms. *J Epidemiol*, 2013. 23(4): p. 243-50.
65. Kostoglou-Athanassiou, I., et al., Vitamin D and glycemic control in diabetes mellitus type 2. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2013. 4(4): p. 122-8.
66. Lim, S., et al., Association of vitamin D deficiency with incidence of type 2 diabetes in high-risk Asian subjects. *Am J Clin Nutr*, 2013. 97(3): p. 524-30.
67. Muller-Wieland, D., et al., Insulin-regulated transcription factors: molecular link between insulin resistance and cardiovascular risk factors. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001. 25 Suppl 1: p. S35-7.
68. Thule, P.M., Mechanisms of current therapies for diabetes mellitus type 2. *Adv Physiol Educ*, 2012. 36(4): p. 275-83.
69. Arck, P., et al., Nuclear receptors of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family in gestational diabetes: from animal models to clinical trials. *Biol Reprod*, 2010. 83(2): p. 168-76.
70. Mayorga, M.E., et al., Simulated Estimates of Pre-Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus in the US: 1980 to 2008. *PLoS One*, 2013. 8(9): p. e73437.
71. Dabelea, D., et al., Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. *Diabetes*, 2000. 49(12): p. 2208-11.
72. Retnakaran, R., et al., Low adiponectin concentration during pregnancy predicts postpartum insulin resistance, beta cell dysfunction and fasting glycaemia. *Diabetologia*, 2010. 53(2): p. 268-76.
73. Adamczak, M. and A. Wiecek, The Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Seminars in Nephrology*, 2013. 33(1): p. 2-13.

74. Feng, B., T. Zhang, and H. Xu, Human adipose dynamics and metabolic health. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013. 1281(1): p. 160-177.
75. Scherer, P.E., et al., A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*, 1995. 270(45): p. 26746-9.
76. Ziemke, F. and C.S. Mantzoros, Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr*, 2010. 91(1): p. 258S-261S.
77. Shehzad, A., et al., Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones (Athens)*, 2012. 11(1): p. 8-20.
78. Wang, C., et al., Adiponectin sensitizes insulin signaling by reducing p70 S6 kinase-mediated serine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem*, 2007. 282(11): p. 7991-6.
79. Williams, M.A., et al., Plasma Adiponectin Concentrations in Early Pregnancy and Subsequent Risk of Gestational Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004. 89(5): p. 2306-2311.
80. Shapiro, L. and P.E. Scherer, The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol*, 1998. 8(6): p. 335-8.
81. Goldstein, B.J., R.G. Scalia, and X.L. Ma, Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2009. 6(1): p. 27-35.
82. Luo, X.-H., et al., Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Experimental Cell Research*, 2005. 309(1): p. 99-109.
83. Rossi, A. and J. Lord, Adiponectin inhibits neutrophil phagocytosis of *Escherichia coli* by inhibition of PKB and ERK 1/2 MAPK signalling and Mac-1 activation. *PLoS One*, 2013. 8(7): p. e69108.
84. Wang, Y., et al., Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J*, 2008. 409(3): p. 623-33.
85. Liu, M. and F. Liu, Up- and down-regulation of adiponectin expression and multimerization: mechanisms and therapeutic implication. *Biochimie*, 2012. 94(10): p. 2126-30.
86. Combs, T.P., et al., Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology*, 2002. 143(3): p. 998-1007.
87. Yu, J.G., et al., The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes*, 2002. 51(10): p. 2968-74.
88. Sweeney, G., Adiponectin action: a combination of endocrine and autocrine/paracrine effects. *Frontiers in Endocrinology*, 2011. 2.
89. Liu, M. and F. Liu, Up- and down-regulation of adiponectin expression and multimerization: Mechanisms and therapeutic implication. *Biochimie*, 2012. 94(10): p. 2126-2130.
90. Kadowaki, T., et al., Adiponectin and adiponectin receptors in obesity-linked insulin resistance. *Novartis Found Symp*, 2007. 286: p. 164-76; discussion 176-82, 200-3.
91. Yamauchi, T., et al., Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 2003. 423(6941): p. 762-769.

92. Goldstein, B.J. and R. Scalia, Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(6): p. 2563-8.
93. Xin, X., et al., APPL1 mediates adiponectin-stimulated p38 MAPK activation by scaffolding the TAK1-MKK3-p38 MAPK pathway. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 2010. 300(1): p. E103-E110.
94. Mao, X., et al., APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol*, 2006. 8(5): p. 516-523.
95. Guo, Z., et al., Cardiac expression of adiponectin and its receptors in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism*, 2007. 56(10): p. 1363-71.
96. Sattar, A.A. and R. Sattar, Insulin-regulated expression of adiponectin receptors in muscle and fat cells. *Cell Biol Int*, 2012. 36(12): p. 1293-7.
97. Hu E, L.P., Spiegelman BM., AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.*, 1996 May 3.
98. Lindsay, R.S., et al., Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet*, 2002. 360(9326): p. 57-8.
99. Daimon, M., et al., Decreased serum levels of adiponectin are a risk factor for the progression to type 2 diabetes in the Japanese Population: the Funagata study. *Diabetes Care*, 2003. 26(7): p. 2015-20.
100. Spranger, J., et al., Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet*, 2003. 361(9353): p. 226-8.
101. Hotta, K., et al., Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*, 2001. 50(5): p. 1126-33.
102. Ryo M, N.T., Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, Nagai M, Matsuzawa Y, Funahashi T., Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J.*, 2004.
103. Yatagai, T., et al., Hypoadiponectinemia is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance in Japanese men with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 2003. 52(10): p. 1274-1278.
104. Yamamoto, Y., et al., Adiponectin, an Adipocyte-Derived Protein, Predicts Future Insulin Resistance: Two-Year Follow-Up Study in Japanese Population. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004. 89(1): p. 87-90.
105. Cnop, M., et al., Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*, 2003. 46(4): p. 459-69.
106. Combs, T.P., et al., Sexual Differentiation, Pregnancy, Calorie Restriction, and Aging Affect the Adipocyte-Specific Secretory Protein Adiponectin. *Diabetes*, 2003. 52(2): p. 268-276.
107. Xu, A., et al., Testosterone Selectively Reduces the High Molecular Weight Form of Adiponectin by Inhibiting Its Secretion from Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(18): p. 18073-18080.
108. Nagasawa, A., et al., Effects of soy protein diet on the expression of adipose genes and plasma adiponectin. *Horm Metab Res*, 2002. 34(11-12): p. 635-9.
109. Flachs, P., et al., Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*, 2006. 49(2): p. 394-7.

110. Nagao, K., et al., Conjugated linoleic acid enhances plasma adiponectin level and alleviates hyperinsulinemia and hypertension in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 310(2): p. 562-6.
111. Pischon T, G.C., Rifai N, Hotamisligil GS, Rimm EB., Association between dietary factors and plasma adiponectin concentrations in men *Am J Clin Nutr.*, 2005 Apr: p. 81(4):780-6.
112. Furukawa, S., et al., Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 2004. 114(12): p. 1752-1761.
113. Yki-Järvinen, H., Thiazolidinediones. *New England Journal of Medicine*, 2004. 351(11): p. 1106-1118.
114. Iwaki, M., et al., Induction of Adiponectin, a Fat-Derived Antidiabetic and Antiatherogenic Factor, by Nuclear Receptors. *Diabetes*, 2003. 52(7): p. 1655-1663.
115. Kubota, N., et al., PPAR³ Mediates High-Fat Diet Induced Adipocyte Hypertrophy and Insulin Resistance. *Molecular cell*, 1999. 4(4): p. 597-609.
116. Olefsky, J.M. and A.R. Saltiel, PPAR³ and the Treatment of Insulin Resistance. *Trends Endocrinol Metab*, 2000. 11(9): p. 362-368.
117. Kubota, N., et al., Pioglitazone Ameliorates Insulin Resistance and Diabetes by Both Adiponectin-dependent and -independent Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. 281(13): p. 8748-8755.
118. Tsuchida, A., et al., Insulin/Foxo1 Pathway Regulates Expression Levels of Adiponectin Receptors and Adiponectin Sensitivity. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(29): p. 30817-30822.
119. Fruebis, J., et al., Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(4): p. 2005-10.
120. Yoon, M.J., et al., Adiponectin Increases Fatty Acid Oxidation in Skeletal Muscle Cells by Sequential Activation of AMP-Activated Protein Kinase, p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α . *Diabetes*, 2006. 55(9): p. 2562-2570.
121. Gulick, T., et al., The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(23): p. 11012-6.
122. Tugwood, J.D., et al., The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J*, 1992. 11(2): p. 433-9.
123. Hommes, D.W., M.P. Peppelenbosch, and S.J. van Deventer, Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut*, 2003. 52(1): p. 144-51.
124. Hausman, G.M.C.R.E., HÜCRE moleküler yaklaşım.
125. Whyte, J., et al., Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Res*, 2009. 11(5): p. 209.
126. Lim, A.K. and G.H. Tesch, Inflammation in diabetic nephropathy. *Mediators Inflamm*, 2012. 2012: p. 146154.

127. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiological Reviews*, 2001. 81(2): p. 807-869.
128. Aouadi, M., et al., Inhibition of p38MAPK Increases Adipogenesis From Embryonic to Adult Stages. *Diabetes*, 2006. 55(2): p. 281-289.
129. Wagner, E.F. and A.R. Nebreda, Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(8): p. 537-549.
130. Yan, J., et al., Adiponectin decreases lipids deposition by p38 MAPK/ATF2 signaling pathway in muscle of broilers. *Mol Biol Rep*, 2013. 40(12): p. 7017-7025.
131. Roux, P.P. and J. Blenis, ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004. 68(2): p. 320-44.
132. Gibala, M.J., et al., Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1alpha in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), 2009. 106(3): p. 929-34.
133. Poulsen, L., M. Siersbaek, and S. Mandrup, PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin Cell Dev Biol*, 2012. 23(6): p. 631-9.
134. Christodoulides, C. and A. Vidal-Puig, PPARs and adipocyte function. *Mol Cell Endocrinol*, 2010. 318(1-2): p. 61-8.
135. Lee, C.H., P. Olson, and R.M. Evans, Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology*, 2003. 144(6): p. 2201-7.
136. Froment, P., et al., Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *Journal of Endocrinology*, 2006. 189(2): p. 199-209.
137. Aleman, G., N. Torres, and A.R. Tovar, [Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in obesity and insulin resistance development]. *Rev Invest Clin*, 2004. 56(3): p. 351-67.
138. Issemann, I. and S. Green, Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 1990. 347(6294): p. 645-650.
139. Kota, B.P., T.H. Huang, and B.D. Roufogalis, An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*, 2005. 51(2): p. 85-94.
140. Kota, B.P., T.H.-W. Huang, and B.D. Roufogalis, An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*, 2005. 51(2): p. 85-94.
141. Berger, J.P., T.E. Akiyama, and P.T. Meinke, PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci*, 2005. 26(5): p. 244-51.
142. Schopfer, F.J., et al., Covalent peroxisome proliferator-activated receptor gamma adduction by nitro-fatty acids: selective ligand activity and anti-diabetic signaling actions. *J Biol Chem*, 2010. 285(16): p. 12321-33.
143. Li, Y., M.H. Lambert, and H.E. Xu, Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure*, 2003. 11(7): p. 741-6.
144. Palomer, X., et al., An overview of the crosstalk between inflammatory processes and metabolic dysregulation during diabetic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*, 2013.

145. Floyd, Z.E. and J.M. Stephens, Controlling a master switch of adipocyte development and insulin sensitivity: covalent modifications of PPARgamma. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1822(7): p. 1090-5.
146. Lehmann, J.M., et al., An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ). *Journal of Biological Chemistry*, 1995. 270(22): p. 12953-12956.
147. Janesick, A. and B. Blumberg, Minireview: PPAR γ as the target of obesogens. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011. 127(1–2): p. 4-8.
148. Sugii, S., et al., PPAR γ activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. 106(52): p. 22504-22509.
149. Froment, P., et al., Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J Endocrinol*, 2006. 189(2): p. 199-209.
150. Suwaki, N., et al., Expression and Potential Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in the Placenta of Diabetic Pregnancy. *Placenta*, 2007. 28(4): p. 315-323.
151. Lappas, M., et al., Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *J Endocrinol*, 2005. 186(3): p. 457-65.
152. Tontonoz, P. and B.M. Spiegelman, Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem*, 2008. 77: p. 289-312.
153. Olga Astapova, T.L., Adiponectin and PPARg: Cooperative and Interdependent Actions of Two Key Regulators of Metabolism, in *adiponectin2012: USA*.
154. Wang, Z.V., et al., Secretion of the adipocyte-specific secretory protein adiponectin critically depends on thiol-mediated protein retention. *Mol Cell Biol*, 2007. 27(10): p. 3716-31.
155. Lowry, O.H., et al., PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 1951. 193(1): p. 265-275.
156. Blaslov, K., et al., Relationship between Adiponectin Level, Insulin Sensitivity, and Metabolic Syndrome in Type 1 Diabetic Patients. *Int J Endocrinol*, 2013. 2013: p. 6.
157. Ategbob, J.M., et al., Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. 91(10): p. 4137-43.
158. Chabrolle, C., et al., Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 2008. 6: p. 11.
159. Jawerbaum, A. and E. Capobianco, Review: Effects of PPAR activation in the placenta and the fetus: implications in maternal diabetes. *Placenta*, 2011. 32 Suppl 2: p. S212-7.
160. Capobianco, E., et al., PPAR activation as a regulator of lipid metabolism, nitric oxide production and lipid peroxidation in the placenta from type 2 diabetic patients. *Mol Cell Endocrinol*, 2013. 377(1–2): p. 7-15.

161. Ali, A.T., et al., Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol*, 2013. 92(6-7): p. 229-36.
162. Long, Q., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma increases adiponectin secretion via transcriptional repression of endoplasmic reticulum chaperone protein ERp44. *Endocrinology*, 2010. 151(7): p. 3195-203.
163. Forman, B.M., et al., 15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell*, 1995. 83(5): p. 803-812.
164. Knabl J, H.R., Hutter S, Günthner-Biller M, Vrekoussis T, Karl K, Friese K, Kainer F, Jeschke U., Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) is down regulated in trophoblast cells of gestational diabetes mellitus (GDM) and in trophoblast tumour cells BeWo in vitro after stimulation with PPAR γ agonists. 2013.
165. Barak, Y., Y. Sadovsky, and T. Shalom-Barak, PPAR Signaling in Placental Development and Function. *PPAR Res*, 2008. 2008.
166. Holdsworth-Carson, S.J., et al., Peroxisome Proliferator-activated Receptors and Retinoid X Receptor-alpha in Term Human Gestational Tissues: Tissue Specific and Labour-associated Changes. *Placenta*, 2009. 30(2): p. 176-186.
167. Barak, Y., et al., PPAR γ Is Required for Placental, Cardiac, and Adipose Tissue Development. *Molecular cell*, 1999. 4(4): p. 585-595.
168. Lappas, M., et al., Regulation of Proinflammatory Cytokines in Human Gestational Tissues by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ : Effect of 15-Deoxy- Δ 12,14-PGJ2 and Troglitazone. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2002. 87(10): p. 4667-4672.
169. Wieser, F., et al., PPAR Action in Human Placental Development and Pregnancy and Its Complications. *PPAR Res*, 2008. 2008: p. 527048.
170. Berry, E.B.E., et al., Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Isoform Expression Changes in Human Gestational Tissues with Labor at Term. *Molecular Pharmacology*, 2003. 64(6): p. 1586-1590.
171. Dunn-Albanese, L.R., et al., Reciprocal expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and cyclooxygenase-2 in human term parturition. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. 190(3): p. 809-816.
172. Jawerbaum, A. and E. Capobianco, Review: Effects of PPAR activation in the placenta and the fetus: Implications in maternal diabetes. *Placenta*, 2011. 32: p. S212-S217.
173. Martinez, N., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation regulates lipid metabolism in the feto-placental unit from diabetic rats. *Reproduction*, 2008. 136(1): p. 95-103.
174. Melamed, N. and M. Hod, Perinatal mortality in pregestational diabetes. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 2009. 104: p. S20-S24.
175. Barroso, I., et al., Dominant negative mutations in human PPAR[gamma] associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature*, 1999. 402(6764): p. 880-883.
176. Larsen, T.M., S. Toubro, and A. Astrup, PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy? *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000. 27(2): p. 147-161.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Batman’da doğdu. 2002 yılında Kütükçü İlkokulu’ndan, 2002 ve 2005 yıllarında Karatay Anadolu Lisesi’nden mezun oldu. 2010 yılında Adnan Mendres Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden mezun olarak lisans eğitimini tamamladı. 2011 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Akdeniz Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsünde Tezsiz Yüksek Lisans eğitimini tamamlayarak Ortaöğretim Alan Öğretmenliği diplomasını aldı. Halen Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.